

Universidad Peruana Cayetano Heredia
Facultad de Ciencias y Filosofía “Alberto Cazorla Talleri”



MicroRNAs de *T. solium* como moduladores de la respuesta inmune cerebral en la neurocisticercosis

Trabajo de Investigación para optar el Grado Académico de Bachiller en Ciencias con
mención en Biología

Autoras:

Valeria Fátima Adrianzén Castillo

Camila Valeria Bravo Poémape

Asesora:

Cristina Guerra Giraldez, PhD.

Laboratorio de Proliferación Celular y Regeneración

Lima – Perú

2022

Tabla de Contenidos

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
ESTADO DEL ARTE	3
1. Neurocisticercosis e inmunidad cerebral	3
1.1. Inflamación cerebral e inmunidad.....	3
1.2. Evasión de la inmunidad cerebral por <i>T. solium</i>	5
2. Productos derivados de helmintos (HDP)	5
2.1. Vesículas extracelulares (EVs) en helmintos.....	6
2.2. Moléculas transportadoras por EVs: microRNAs (miRNAs).....	6
2.3. Rutas cerebrales que utilizan miRNAs.....	6
3. Inmunomodulación del hospedero por miRNAs de helmintos parásitos	8
3.1. Mecanismo conservado de miRNAs como medio de comunicación interespecífica.....	8
3.2. Evidencia en género <i>Taenia</i>	9
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	9
ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN	11
REFERENCIAS	13

RESUMEN

La neurocisticercosis (NCC) es una enfermedad causada por la presencia de cisticercos (larvas) de *Taenia solium* en el cerebro por la ingesta de huevos de este helminto parásito (García et al., 2020). La NCC provoca sintomatología neurológica como epilepsia, presión intracraneal e incluso la muerte (Son et al., 2019). Los cisticercos pueden mantenerse viables por varios meses o años sin producir inflamación ni síntomas (Gutierrez-Loli et al., 2017). No se ha logrado explicar qué le permite a la larva viable de *T. solium* evadir la respuesta inmune de su hospedero.

T. solium libera productos-derivados-de-helminos (HDP por sus siglas en inglés), entre ellos RNA y proteínas, a través de vesículas extracelulares (EVs) (Zakeri et al., 2018). Los HDP incluyen microRNAs (miRNAs), RNAs regulatorios muy cortos con una función conservada en la regulación postranscripcional en eucariotas (Paul et al., 2020). Su presencia en las EVs de *T. solium* sugiere un papel regulatorio sobre el hospedero.

Un análisis de predicción de blancos de miR-10-5p y let-7-5p, los miRNAs más abundantes identificados en el cisticercos de *T. solium*, demostró que están asociados con rutas inmunorreguladoras de mamíferos (Landa et al., 2019). Este y otros estudios sobre miRNAs en helmintos parásitos respaldan la transferencia interespecífica de RNA como control de la respuesta inmune del hospedero. Por ello se plantea que los miRNAs secretados por el cisticercos viable de *T. solium* alojado en el cerebro podrían modular la respuesta inmune del hospedero.

Este estudio propone (1) identificar miRNAs presentes en EVs derivadas de *T. solium*; (2) realizar ensayos *in vitro* para comprobar el efecto de las EVs sobre las microglías,

propias del sistema nervioso central, y otras células inmunes; (3) comparar las secuencias de miRNAs con datos transcriptómicos de líneas celulares de cerebro humano para encontrar posibles moléculas blanco y (4) evaluar *in vivo* la inmunoregulación de los miRNAs candidatos utilizando cerdos, el hospedero natural de *T. solium*.

Palabras clave: *Taenia solium*, miRNA, neurocisticercosis, inmunomodulación

ABSTRACT

Neurocysticercosis (NCC) is a disease caused by the presence of cysticerci (larvae) of *Taenia solium* in the brain due to the ingestion of eggs of this parasitic helminth (García et al., 2020). NCC causes neurological symptoms such as epilepsy and even death (Son et al., 2019). Cysticerci can remain viable for several months or years without producing inflammation or symptoms (Gutierrez-Loli et al., 2017). It has not been possible to explain what allows the viable larva of *T. solium* to evade the immune response of its host.

T. solium releases helminth-derived-products (HDP), including RNA and protein, through extracellular vesicles (EVs) (Zakeri et al., 2018). HDPs include microRNAs (miRNAs), very short regulatory RNAs with a conserved role in post-transcriptional regulation of eukaryotes (Paul et al., 2020). Its presence in the EVs of *T. solium* suggests a regulatory role on the host.

A target prediction analysis of miR-10-5p and let-7-5p, the most abundant miRNAs identified in the cysticerci of *T. solium*, showed that they are associated with mammalian immunoregulatory pathways (Landa et al., 2019). This and other studies on miRNAs in

parasitic helminths support interspecific RNA transfer as a control of the host immune response. For this reason, it is suggested that the miRNAs secreted by the viable cysticercus of *T. solium* housed in the brain could modulate the host's immune response.

This study proposes (1) to identify miRNAs present in EVs derived from *T. solium*; (2) carry out *in vitro* tests to check the effect of EVs on microglia, typical of the central nervous system, and other immune cells; (3) compare miRNA sequences with transcriptomic data from human brain cell lines to find possible target molecules and (4) evaluate *in vivo* immunoregulation of candidate miRNAs using pigs, the natural host of *T. solium*.

Keywords: *Taenia solium*, miRNA, neurocysticercosis, immunomodulation

ESTADO DEL ARTE

1. Neurocysticercosis e inmunidad cerebral

La neurocysticercosis (NCC) es una enfermedad ocasionada por la presencia de larvas del helminto *Taenia solium* (cisticercos) en el cerebro. Esto resulta de la ingesta de los huevos del parásito, presentes en las heces de un humano infectado con el gusano adulto intestinal (Garcia et al., 2020).

1.1 Inflamación cerebral e inmunidad

Un proceso inflamatorio frente a un patógeno implica la actividad de células inmunes como los macrófagos, células natural killer (NK), neutrófilos, entre otras, con el fin de proteger al organismo de daños. El cerebro constituye una entidad inmune aparte de la inmunidad periférica, en donde la microglía, las células inmunes propias del sistema

nervioso central (SNC), cumple funciones similares a las de los macrófagos de la periferia (Forrester et al., 2018). De no haber un agente inflamatorio, estas células se mantienen confinadas en el tejido cerebral y los componentes de la inmunidad periférica que circulan en la sangre permanecen aislados del SNC gracias a la barrera hematoencefálica (BHE) (Forrester et al., 2018). Sin embargo, tras un estímulo como la presencia de parásitos, las células de la microglía actúan como primera línea de defensa expresando citoquinas proinflamatorias, entre ellas, TNF- α (Peng et al., 2021). Posteriormente, la inflamación conduce a la disrupción de la BHE por un aumento de la permeabilidad vascular, lo que permite a células del sistema inmune periférico infiltrarse en el tejido cerebral (Ní Chasaide & Lynch, 2020).

De alguna manera, la presencia del parásito en el cerebro conduce a una respuesta periférica. Si bien el sistema glinfático retira los restos metabólicos cerebrales desde el líquido cefalorraquídeo hacia el fluido intersticial (Mogensen et al., 2021), conectando el SNC y la periferia, la literatura que vincula a este sistema y la respuesta a patógenos se limita a infecciones virales (Plog & Nedergaard, 2018; Natale et al., 2021).

Se sabe que en la progresión de la NCC ocurre la disrupción de la BHE, lo que marca dos situaciones diferentes relacionadas con la sintomatología de la infección. Por un lado, la NCC sintomática está asociada a una BHE comprometida, mientras que en la NCC asintomática, la BHE está intacta y no hay inflamación cerebral a pesar de la presencia del parásito (Carmen-Orozco et al., 2019).

1.2 Evasión de la inmunidad cerebral por *T. solium*

A grandes rasgos, un organismo reacciona con respuestas diferentes ante patógenos, estas pueden de tipo 1 (Th1), tipo 2 (Th2), tipo 9 (Th9), tipo 17 (Th17), tipo 22 (Th22), etc., cada una asociada a un perfil de expresión de citoquinas (Raphael et al., 2015). Ante una infección helmíntica, la respuesta inmune del hospedero se inclina a una de tipo 2, regulatoria, asociada a la expresión de citoquinas antiinflamatorias (Motran et al., 2018).

Una respuesta regulatoria es compatible con la NCC, como se observó en el perfil inmunológico de pacientes con NCC asintomática, que mostraron mayor expresión de citoquinas antiinflamatorias como IL-4, IL-5 e IL-13 que voluntarios sanos (Chavarría et al., 2003). Por otro lado, los cisticercos de *T. solium* pueden permanecer viables por varios meses antes de la disfunción de la BHE, evidenciando su capacidad inmunomoduladora y de evadir la inmunidad del hospedero (Gutierrez-Loli et al., 2017).

2. Productos derivados de helmintos (HDP)

Las moléculas que los helmintos parásitos liberan al exterior se conocen con el nombre general de “productos derivados de helmintos”, o HDP, por sus siglas en inglés. Los HDP comprenden proteínas, derivados de glucanos y ácidos nucleicos (Zakeri et al., 2018).

2.1 Vesículas extracelulares (EVs) en helmintos

Por lo general los HDP son transportados a células receptoras a través de vesículas extracelulares (EVs). Se ha reconocido a las EVs como elementos importantes en la comunicación intercelular debido a que transportan moléculas de célula a célula. Un ensayo *in vitro* reportó que células epiteliales murinas internalizan las EVs liberadas por el nemátodo parásito *Heligmosomoides polygyrus* (Buck et al., 2014). Se ha sugerido que los HDP transportados por EVs pueden polarizar la respuesta inmune a través de vías intracelulares (Zakeri et al., 2018).

2.2 Moléculas transportadas por EVs: microRNAs (miRNAs)

Las EVs liberadas por helmintos parásitos, al igual que EVs de organismos no parásitos, contienen miRNAs, entre otros ácidos nucleicos (Sotillo et al., 2020). Los miRNAs son RNAs no codantes de secuencia corta (en promedio 21 bases) que se unen a RNAs mensajeros de manera específica, e inhiben o silencian su expresión. Este mecanismo para regular diversas vías celulares a nivel postranscripcional se ha demostrado vastamente en eucariotes, incluso unicelulares (Paul et al., 2020).

2.3 Rutas cerebrales que utilizan miRNAs

Las EVs secretadas por neuronas se utilizan como medio de comunicación y son capaces de atravesar la BHE (Saint-Pol et al., 2020). Como parte de sus funciones relacionadas a comunicación intercelular, las EVs regulan la actividad de microglías y controlan la respuesta inflamatoria. Los mecanismos de esta regulación no se han esclarecido totalmente, pero Peng y colaboradores (2021) proporcionan evidencia consistente de que los miRNAs son responsables de este efecto. Debido a la intensidad

y abundancia de estudios en enfermedades del SNC, cerca del 50% de los miRNAs identificados se expresan en el cerebro de mamíferos (O'Carroll & Schaefer, 2013). Algunos miRNAs de primates han sido asociados a esquizofrenia, discapacidad intelectual, fisiopatología de la depresión y riesgo de desarrollar el mal de Alzheimer (Prodromidou & Matsas, 2019). Por otro lado, existe una relación entre la incapacidad de generar miRNAs maduros y malformaciones severas en el SNC de peces cebra (Giraldez et al., 2005).

Las vías reguladas por miRNAs que tienen mayor relevancia en el estudio de interacciones parásito-hospedero son aquellas relacionadas a la respuesta inmune que se desata para contrarrestar la presencia de agentes extraños. Hay un gran número de miRNAs implicados en señalización inmune cerebral, como miR-146a, let-7, miR-155, miR-223, miR-122, miR-203, etc. Por ejemplo, en la enfermedad de Alzheimer se encontró que let-7 está relacionado con la activación de receptores Toll-like (TLRs), propios del sistema inmune (Cardoso et al., 2016). Del mismo modo, en la neurodegeneración inducida por priones, miR-146a regula la activación de la microglía y la expresión de NF-kB y vías JAK-STAT implicados en la respuesta inmune (Thounaojam et al., 2013).

Asimismo, hay miRNAs cerebrales que forman parte de la respuesta inmune ante una infección parasitaria, como es el caso del nemátodo *Angiostrongylus cantonensis*, capaz de infectar las meninges, conduciendo a eosinofilia. Se demostró que al inhibir miR-155 en el hospedero, la eosinofilia disminuye significativamente (Zhou et al., 2020). Estos

descubrimientos demuestran que los miRNAs cumplen funciones importantes en el control de señales y la comunicación célula-célula en el cerebro.

3. Inmunomodulación del hospedero por miRNAs de helmintos parásitos

3.1 Mecanismo conservado de miRNAs como medio de comunicación interespecífica

Los filos *Nematoda* y *Platyhelminthes* incluyen numerosos helmintos parásitos, y este último contiene a las clases *Trematoda* y *Cestoda*. *T. solium* es un platelminto que pertenece a la clase *Cestoda*. Por tanto, las evidencias dentro de estos grupos taxonómicos son de especial interés.

En primer lugar, un estudio *in vitro* del tremátodo *Schistosoma japonicum* (Zhu et al., 2016) reportó que las células murinas de hígado internalizan las EVs del parásito. Se encontró que la exposición de los cultivos celulares a EVs del parásito disminuía significativamente la expresión de tres genes del hospedero, lo que respalda la comunicación interespecífica e intercelular a través de los miRNAs. En general, los autores concluyen que las EVs y miRNAs asociados juegan un papel importante en la interacción parásito-hospedero y en la patogénesis de la schistosomiasis.

Por otro lado, el empaquetamiento y transporte de miRNAs desde el parásito hacia células hospederas también se ha demostrado en la infección con el cestodo *Echinococcus multilocularis*. Se observó que transfectando macrófagos de ratón con el

miRNA emu-miR.4989-3p de *E. multilocularis*, estos aumentaron su expresión de la citoquina proinflamatoria TNF α (Ding et al., 2019).

3.2 Evidencia en género *Taenia*

Wang et al. (2021) evaluaron la expresión de citoquinas en macrófagos tratados con EVs del estadio larval de *Taenia pisiformis*, que infecta el hígado de algunos mamíferos. Se encontró que miR-let-7-5p, presente en EVs del parásito, contribuyó a la activación de macrófagos M2 del hospedero. Además, otros experimentos del mismo estudio sugieren que miR-let-7-5p podría inducir este efecto teniendo como blanco a (C/EBP)- δ , una proteína importante en la inducción de citoquinas proinflamatorias (Wang et al., 2021).

El estudio de Landa et al. (2019) evidenció que *T. solium* libera EVs que contienen miRNAs. Encontraron que los más abundantes de *T. solium* y *T. crassiceps*, miR-10-5p y let-7-5p, se relacionan con rutas inmunorreguladoras de mamíferos. Además, encontraron que ambos miRNAs liberados por estos cestodos pueden regular negativamente la expresión de citoquinas proinflamatorias en macrófagos, potencialmente favoreciendo una respuesta Th2 sobre una Th1 (Landa et al., 2019).

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La neurocisticercosis representa una preocupación clínica porque involucra sintomatología neurológica como dolores de cabeza, presión intracraneal, epilepsia y en casos más severos, la muerte (Son et al., 2019). Estos síntomas son solo perceptibles en

un estado disfuncional de la barrera hematoencefálica (BHE) en el que los componentes del sistema inmune periférico se infiltran en el cerebro (Prodjinotho et al., 2020); sin embargo se desconocen los mecanismos mediante los cuales se alerta a la inmunidad periférica de la presencia del parásito. Por otro lado, la evidencia sugiere que el parásito evade de alguna forma la respuesta inmune del hospedero. La búsqueda de factores parasitarios que contribuyan con la evasión del sistema inmune se ha extendido por años. Diversos autores han utilizado el término “factor metacestode” para referirse a los factores de naturaleza desconocida que permiten que el cisticerco viable de *T. solium* regule la respuesta del hospedero (Giorgio et al., 2020).

La ruta por la que EVs humanas atraviesan la BHE podría ser aprovechada por las EVs de los parásitos alojados en el cerebro. De acuerdo con las evidencias, los HDPs presentes en las EVs podrían estimular o inhibir vías en el hospedero para favorecer la permanencia de los cisticercos. No obstante, lo encontrado no especifica qué moléculas contenidas en las EVs son las responsables de tales alteraciones. En la búsqueda de candidatos que puedan cumplir esta función, los miRNAs resaltan por su papel conservado en la regulación postranscripcional de vías celulares (Sotillo et al., 2020). Puesto que también se ha demostrado la existencia de miRNAs en la señalización de rutas cerebrales y, más importante, en señalización inmune, son muy buenos candidatos para la comunicación entre *Taenia solium* y su hospedero. Landa et al. (2019) han demostrado que las larvas de *T. solium* secretan EVs cargadas de miRNAs, lo que apoya la hipótesis de inmunomodulación mediada por miRNAs.

En síntesis, dadas las evidencias de (1) inflamación cerebral en la NCC y papel de la inmunidad local y periférica, (2) la secreción de componentes como miRNAs en EVs, (3) la capacidad de miRNAs de regular rutas inmunes cerebrales y (4) la inmunomodulación mediante miRNAs por helmintos en otros tejidos, es posible plantear que el cisticerco de *T. solium* alojado en el cerebro secreta miRNAs capaces de afectar la respuesta inmune de su hospedero, y proponer la identificación de estas moléculas regulatorias.

ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

A pesar de que Landa et al. (2019) demostraron que *T. solium* produce miRNAs que afectan al hospedero, lo que los convierte en los candidatos responsables de la inmunomodulación en NCC, aún es necesario verificar si existen subpoblaciones de miRNAs secretados en EVs con este potencial. Para poder recrear las condiciones cerebrales en las que se desarrolla el parásito, las cuales podrían influir en su producción de determinados miRNAs, se emplearán cocultivos de microglía y el estadio larval de *T. solium*. Después, se aislarán las EVs a partir del sobrenadante de los cocultivos para extraer los miRNAs. Con estos se hará el RNA-seq que permita construir el miRNoma vesicular. En segundo lugar, se compararán las secuencias de miRNAs obtenidas con datos transcriptómicos de líneas celulares del cerebro humano para encontrar posibles blancos moleculares. Como tercer objetivo se propone una serie de ensayos *in vitro* que evalúen la función moduladora de los miRNAs sobre células cerebrales del sistema inmune. Se tendrán cinco grupos experimentales. Se expondrán los cultivos de microglías humanas (línea celular comercial) (1) al parásito, (2) a las

EVs colectadas, (3) a las EVs e inhibidor específico (ácidos nucleicos de cadena simple o ssNAs) de los miRNAs candidatos, y (4) a los miRNAs. Además (5) se tendrá un cultivo control de microglías sin exposición a tratamiento alguno. Luego de los tratamientos se medirá la expresión de las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β y antiinflamatoria, IL-4, para evaluar si los miRNAs elegidos alteran la respuesta inmune (Walker & Lue, 2015). Estos tratamientos se repetirán con linfocitos T para evaluar si los miRNAs actúan sobre células inmunes de la periferia. Si bien los ensayos *in vitro* son una buena aproximación para responder la pregunta, podrían carecer de factores desconocidos propios del sistema vivo, lo que supone una limitante en las conclusiones que se desprenden de ellos. Por lo tanto, como cuarto objetivo se propone evaluar *in vivo* la inmunoregulación de los miRNAs en cerdos, el hospedero natural de *T. solium*. El ensayo consistirá en cinco grupos experimentales. Se inyectarán directamente en el cerebro de cerdos jóvenes no infectados (1) los miRNAs candidatos, (2) las EVs obtenidas de cultivos de cisticercos, y (3) las EVs de cisticerco *KO* de las secuencias que codifican a los miRNAs candidatos con el fin de comprobar que los efectos observados se deben a los miRNAs y no a las EVs que los transportan. Se tendrán controles (4) en los que se simulará el estrés de la inyección y (5) controles sin inyección para comprobar que los niveles de citoquinas basales no se alteran por el estrés de la inyección. Posteriormente, se medirán los niveles de citoquinas TNF- α , IL-1 β e IL-4 en el líquido cefalorraquídeo y suero con el fin de evaluar el efecto *in vivo* de los miRNAs candidatos sobre el sistema inmune del hospedero. La alteración de la expresión de citoquinas podría constituir evidencia de la inmunomodulación del parásito hacia el hospedero.

REFERENCIAS

Buck, A. H., Coakley, G., Simbari, F., McSorley, H. J., Quintana, J. F., Le Bihan, et al. (2014). Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity. *Nature communications*, 5(1), 1-12.

Cardoso, A. L., Guedes, J. R., & de Lima, M. C. P. (2016). Role of microRNAs in the regulation of innate immune cells under neuroinflammatory conditions. *Current opinion in pharmacology*, 26, 1-9.

Carmen-Orozco, R. P., Dávila-Villacorta, D. G., Cauna, Y., Bernal-Teran, E. G., Bitterfeld, L., Sutherland, G. L., et al. (2019). Blood–brain barrier disruption and angiogenesis in a rat model for neurocysticercosis. *Journal of neuroscience research*, 97(2), 137-148.

Chavarría, A., Roger, B., Fragoso, G., Tapia, G., Fleury, A., Dumas, M., et al. (2003). TH2 profile in asymptomatic *Taenia solium* human neurocysticercosis. *Microbes and infection*, 5(12), 1109-1115.

Ding, J., He, G., Wu, J. E., Yang, J., Guo, X., Yang, X., et al. (2019). miRNA-seq of *Echinococcus multilocularis* extracellular vesicles and immunomodulatory effects of miR-4989. *Frontiers in microbiology*, 10, 2707.

Forrester, J. V., McMenamin, P. G., & Dando, S. J. (2018). CNS infection and immune privilege. *Nature Reviews Neuroscience*, 19(11), 655-671.

Garcia, H. H., Gonzalez, A. E., & Gilman, R. H. (2020). *Taenia solium* cysticercosis and its impact in neurological disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(3), e00085-19.

Giorgio, S., Gallo-Francisco, P. H., Roque, G. A. S., & e Silva, M. F. (2020). Granulomas in parasitic diseases: the good and the bad. *Parasitology Research*, 1-16.

Giraldez, A. J., Cinalli, R. M., Glasner, M. E., Enright, A. J., Thomson, J. M., Baskerville, S., et al. (2005). MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science*, *308*(5723), 833-838.

Gutierrez-Loli, R., Orrego, M. A., Sevillano-Quispe, O. G., Herrera-Arrasco, L., & Guerra-Giraldez, C. (2017). MicroRNAs in *Taenia solium* neurocysticercosis: insights as promising agents in host-parasite interaction and their potential as biomarkers. *Frontiers in microbiology*, *8*, 1905.

Landa, A., Navarro, L., Ochoa-Sánchez, A., & Jiménez, L. (2019). *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*: miRNomes of the larvae and effects of miR-10-5p and let-7-5p on murine peritoneal macrophages. *Bioscience reports*, *39*(11), BSR20190152.

Mogensen, F. L. H., Delle, C., & Nedergaard, M. (2021). The Glymphatic System (En) during Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(14), 7491.

Motran, C. C., Silvane, L., Chiapello, L. S., Theumer, M. G., Ambrosio, L. F., Volpini, X., et al. (2018). Helminth infections: recognition and modulation of the immune response by innate immune cells. *Frontiers in immunology*, *9*, 664.

Natale, G., Limanaqi, F., Busceti, C. L., Mastroiacovo, F., Nicoletti, F., Puglisi-Allegra, S., & Fornai, F. (2021). Glymphatic System as a Gateway to Connect Neurodegeneration From Periphery to CNS. *Frontiers in Neuroscience*, *15*, 92.tice

Ní Chasaide, C., & Lynch, M. A. (2020). The role of the immune system in driving neuroinflammation. *Brain and neuroscience advances*, *4*, 2398212819901082.

O'Carroll, D., & Schaefer, A. (2013). General principals of miRNA biogenesis and regulation in the brain. *Neuropsychopharmacology*, *38*(1), 39-54.

Paul, S., Ruiz-Manriquez, L. M., Serrano-Cano, F. I., Estrada-Meza, C., Solorio-Diaz, K. A., & Srivastava, A. (2020). Human microRNAs in host–parasite interaction: a review. *3 Biotech, 10*(12), 1-16.

Peng, H., Harvey, B. T., Richards, C. I., & Nixon, K. (2021). Neuron-Derived Extracellular Vesicles Modulate Microglia Activation and Function. *Biology, 10*(10), 948.

Plog, B. A., & Nedergaard, M. (2018). The glymphatic system in central nervous system health and disease: past, present, and future. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 13*, 379-394.

Prodjinotho, U. F., Lema, J., Lacorcica, M., Schmidt, V., Vejzagic, N., Sikasunge, C., et al. (2020). Host immune responses during *Taenia solium* Neurocysticercosis infection and treatment. *PLoS neglected tropical diseases, 14*(4), e0008005.

Prodromidou, K., & Matsas, R. (2019). Species-specific miRNAs in human brain development and disease. *Frontiers in cellular neuroscience, 13*, 559.

Raphael, I., Nalawade, S., Eagar, T. N., & Forsthuber, T. G. (2015). T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine, 74*(1), 5-17.

Saint-Pol, J., Gosselet, F., Duban-Deweert, S., Pottiez, G., & Karamanos, Y. (2020). Targeting and crossing the blood-brain barrier with extracellular vesicles. *Cells, 9*(4), 851.

Son, H. J., Kim, M. J., Jung, K. H., Choi, S., Jung, J., Chong, Y. P., et al. (2019). Neurocysticercosis: clinical characteristics and changes from 26 years of experience in an University Hospital in Korea. *The Korean journal of parasitology, 57*(3), 265.

Sotillo, J., Robinson, M. W., Kimber, M. J., Cucher, M., Ancarola, M. E., Nejsum, P., et al. (2020). The protein and microRNA cargo of extracellular vesicles from parasitic helminths-current status and research priorities. *International Journal for Parasitology*, 50(9), 635-645.

Thounaojam, M. C., Kaushik, D. K., & Basu, A. (2013). MicroRNAs in the brain: it's regulatory role in neuroinflammation. *Molecular neurobiology*, 47(3), 1034-1044.

Walker, D. G., & Lue, L. F. (2015). Immune phenotypes of microglia in human neurodegenerative disease: challenges to detecting microglial polarization in human brains. *Alzheimer's research & therapy*, 7(1), 1-9.

Wang, L., Liu, T., Chen, G., Li, Y., Zhang, S., Mao, L., et al.(2021). Exosomal microRNA let-7-5p from *Taenia pisiformis* Cysticercus Prompted Macrophage to M2 Polarization through Inhibiting the Expression of C/EBP δ . *Microorganisms*, 9(7), 1403.

Zakeri, A., Hansen, E. P., Andersen, S. D., Williams, A. R., & Nejsum, P. (2018). Immunomodulation by helminths: intracellular pathways and extracellular vesicles. *Frontiers in immunology*, 9, 2349.

Zhou, X., Zhang, J., Liu, J., Guo, J., Wei, Y., Li, J., et al. (2021). MicroRNA miR-155-5p knockdown attenuates *Angiostrongylus cantonensis*-induced eosinophilic meningitis by downregulating MMP9 and TSLP proteins. *International Journal for Parasitology*, 51(1), 13-22.

Zhu, L., Liu, J., Dao, J., Lu, K., Li, H., Gu, H., et al. (2016). Molecular characterization of *S. japonicum* exosome-like vesicles reveals their regulatory roles in parasite-host interactions. *Scientific reports*, 6(1), 1-14.