

Efecto de la sobreexpresión de CCL1 (I-309) en las espinas dendríticas de neuronas del hipocampo

Effect of CCL1 (I-309) overexpression on dendritic spines of hippocampal neurons

Lorena L. Adames-Torres

Universidad de Panamá, Facultad de Medicina, Panamá.

lorenaadamest09@gmail.com

<https://orcid.org/0009-0004-1518-5404>

Alanna S. Madrid L

INDICASAT AIP, Centro de Neurociencias, Panamá.

amadrid@indicasat.gob.pa

<https://orcid.org/0009-0000-4564-9960>

Kevin G. Mata A.

INDICASAT AIP, Centro de Neurociencias, Panamá.

kmata@indicasat.org.pa

<https://orcid.org/0009-0006-6799-040X>

Julio A. Flores-Cuadra

INDICASAT AIP, Centro de Neurociencias, Panamá

floresjulio27@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0003-2129-4581>

Gabrielle B. Britton

INDICASAT AIP, Centro de Neurociencias, Panamá
Sistema Nacional de Investigación- SENACYT, Panamá

gbritton@indicasat.org.pa

<https://orcid.org/0000-0002-1758-2495>

Alcibiades E. Villarreal

INDICASAT AIP, Centro de Neurociencias, Panamá
Sistema Nacional de Investigación- SENACYT, Panamá

avillarreal@indicasat.org.pa

<https://orcid.org/0000-0002-6684-0593>

María B. Carreira F.INDICASAT AIP, Centro de Neurociencias, Panamá
Sistema Nacional de Investigación- SENACYT, Panamá.mcarreira@indicat.gob.pa<https://orcid.org/0000-0001-5306-0021>Recibido
22/07/2024Aceptado
18/11/2024DOI <https://doi.org/10.48204/j.scientia.v35n1.a6658>

Resumen

La acumulación irregular de la proteína β -amiloide ($A\beta$), la proteína tau hiperfosforilada y la neuroinflamación son factores que afectan la función neuronal en la Enfermedad de Alzheimer (EA). La neuroinflamación asociada a la EA podría causar el daño sináptico por sí mismo o exacerbar el daño causado por la acumulación de $A\beta$. Se ha detectado un aumento de la citocina CCL1 (I-309) en el suero de sangre periférica de personas con Deterioro Cognitivo Leve (DCL) y con la EA, por lo que se propone que puede ser útil como un biomarcador diagnóstico del DCL y la EA. El objetivo general de este estudio fue evaluar el efecto de la sobreexpresión de la proteína CCL1 (I-309) en las espinas dendríticas de las neuronas localizadas en el hipocampo. Se utilizó ratas Sprague Dawley (N=6) como modelo animal, a quienes se les realizó cirugías estereotáxicas para inocular la sobreexpresión de CCL1. Se realizó la tinción de Golgi a los cerebros de las ratas, se utilizó un criostato para realizar los cortes histológicos y se evaluó la densidad de las espinas dendríticas mediante microscopía óptica. El ANOVA de una vía no mostró diferencias significativas ($p>0.05$) entre el grupo con sobreexpresión de CCL1 al compararlo con el grupo control y con el grupo con sobreexpresión $A\beta_{1-42}$ +CCL1. Se concluyó que la sobreexpresión de CCL1 no modifica significativamente la densidad de espinas dendríticas en el hipocampo.

Palabras clave. CCL1 (I-309), enfermedad de Alzheimer, espinas dendríticas, hipocampo, modelo animal

Abstract

Abnormal accumulation of β -amyloid ($A\beta$), hyperphosphorylated tau protein, and neuroinflammation are factors that affect neuronal function in Alzheimer's Disease (AD). AD-associated neuroinflammation could cause synaptic damage itself or exacerbate the damage caused by $A\beta$ accumulation. The cytokine CCL1 (I-309) has been detected increased in the peripheral blood serum of people with Mild Cognitive Impairment (MCI) and AD, so it is proposed that it may be useful as a biomarker for the diagnosis of MCI and AD. The general objective of this study was to evaluate the effect of overexpression of the CCL1(I-309) in the dendritic spines of neurons located in the hippocampus. Sprague Dawley (N=6) were used as an animal model, in which stereotaxic surgeries were performed to inoculate CCL1 overexpression. Golgi staining was performed on the brains of the rats, a cryostat was used to make the histological sections and the density of dendritic spines was evaluated by optical microscopy. The one-way ANOVA did not show significant differences ($p>0.05$) between the CCL1 overexpression group when compared to the control group and the $A\beta_{1-42}$ + CCL1 overexpression group. It was concluded that CCL1 overexpression does not significantly modify the density of dendritic spines in the hippocampus.

Keywords: CCL1 (I-309), Alzheimer's disease, dendritic spines, hippocampus, animal model

Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia a nivel mundial e inicia con una disfunción de la función sináptica que causa la pérdida de la memoria y de las habilidades mentales de la persona que la padece de manera progresiva hasta provocar su muerte (Breijyeh & Karaman, 2020; World Health Organization, 2017). La EA es multifactorial, es producto de varios procesos fisiopatológicos, principalmente por la acumulación de la proteína β -amiloide ($A\beta$), por la proteína tau hiperfosforilada y por la neuroinflamación que afectan la función neuronal. Se ha propuesto que la inflamación del cerebro ocurre tempranamente en los estadios preclínicos de la EA y puede jugar un papel en la patología de la enfermedad (Monson et al., 2014).

Las neuronas tienen la capacidad única de comunicarse entre ellas a través de espinas dendríticas o gémulas que son diminutas proyecciones especializadas de la superficie de las dendritas, que representan los sitios de contacto sináptico con terminales del axón de otras neuronas (Splittgerber, 2019). Si ocurren cambios en el número y forma de las espinas dendríticas se puede alterar su dinámica, como ocurre cuando se acumula oligómeros de $A\beta$ en la EA (Borbély et al., 2014; Dorostkar et al., 2015; Kasza et al., 2017; Ramírez et al., 2018). La neuroinflamación asociada a la EA también puede causar el daño sináptico por sí mismo o exacerbar el daño causado por la acumulación de $A\beta$ (Dorostkar et al., 2015; McGeer & McGeer, 1999).

La neuroinflamación asociada a la EA se ha descrito parcialmente; de particular interés, estudios proteómicos han identificado biomarcadores inflamatorios de los cuáles poco se conoce en relación a su función en sistema nervioso y rol en enfermedades como la EA (Brosseron et al., 2021; Gupta et al., 2017; O'Bryant et al., 2011). Nuestro grupo, Panama Aging Research Initiative (PARI-HD), identificó la proteína I-309 (CCL1) diferencialmente expresada en una cohorte panameña de personas mayores sanos (control), con diagnóstico de Deterioro Cognitivo Leve (DCL) y con la EA (Villarreal et al., 2016). Asimismo, en el meta-análisis realizado por Zhou et al. (2023) sobre las quimiocinas detectadas en la sangre y el fluido cerebroespinal de personas con DCL y EA, concluyeron que varias quimiocinas, entre ellas la CCL1, tuvieron diferencias significativas por lo que

concluyeron que las quimiocinas podrían servir como marcadores moleculares de deterioro cognitivo.

La CCL1 (I-309) es miembro de la familia de quimiocinas CC cuya función es atraer células inmunes a los sitios donde ocurre injuria o infección y es producida por los linfocitos T (Ito et al., 2019). En relación al sistema nervioso, estudios han demostrado que la activación de las células gliales producen la neuroinflamación como una respuesta para combatir los cambios que ocurren en la fase preclínica de la EA, pero que a medida que progresa la EA la respuesta inmune aumenta y puede producir mayor daño en la función sináptica (Al-Ghraiya et al., 2022). Los astrocitos inducidos por mediadores inflamatorios (ejemplo: TNF α , IL-1 α , C1q) secretan varias quimiocinas que se unen a receptores específicos para cumplir un rol en la patología de la EA (Liu et al., 2014), como la CCL1 que se une al receptor CCR8 que se expresa en neuronas, astrocitos, y en la microglía aumenta su proliferación y capacidad fagocítica (Akimoto et al., 2013), como también en células T y monocitos-macrófagos para atraerlas al sitio de inflamación (Ito et al., 2019).

Estos hallazgos proponen que la CCL-1 es una quimiocina regulada en la EA, con una función neuroinflamatoria. Evaluamos la acción de la citocina CCL1 en la estructura sináptica de las neuronas del hipocampo mediante sobreexpresión de la proteína CCL1 (I-309) utilizando administración intracerebral. Reportamos que la sobreexpresión de la CCL1 no causó cambios significativos en el número de espinas dendríticas comparado con el grupo control. Este hallazgo sugiere que la sinapsis no se afecta ante la sobreexpresión de la CCL1 (I-309).

Materiales y métodos

Se realizó un estudio experimental controlado con ratas Sprague Dawley de aproximadamente 250 g como modelo animal de la EA. Las ratas jóvenes se mantuvieron bajo condiciones estándares con libre acceso a agua y comida en un ciclo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad siguiendo las normas establecidas por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de INDICASAT AIP (estudio aprobado el 8 de julio de 2019 mediante la nota CICUA19-006) para garantizar los aspectos éticos de las investigaciones con animales.

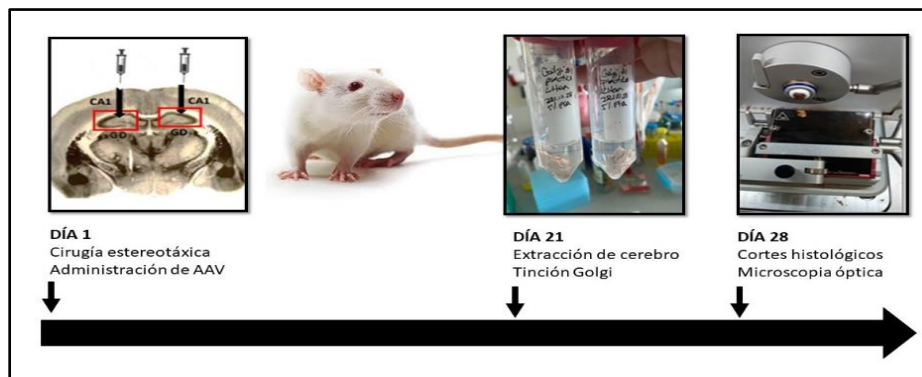
Para evaluar las espinas dendríticas de las neuronas del giro dentado del hipocampo, Cada grupo experimental contó con dos ratas y se evaluaron tres neuronas piramidales del hipocampo dorsal por cada animal (n=6 por grupo).

Las ratas fueron anestesiadas con una inyección intraperitoneal de una mezcla de ketamina y xilazina. Los animales fueron colocados en un aparato estereotáxico (Stoelting, USA) se les realizó una incisión en la línea media del cuero cabelludo, luego la piel y los músculos fueron cuidadosamente abiertos para exponer el cráneo, y se perforó un agujero sobre el área objetivo siguiendo las coordenadas Bregma: AP -3.8, ML +/-2, DV -4.2.

Se utilizó micro-inyectores para infusión del vector AAV-GFP + mCherry, AAV CCL1-mCherry y AAV-A β ₁₋₄₂-GFP+ CCL1-mCherry (Vector Biolabs) en el área CA1 del giro dentado del hipocampo. El animal se recuperó con cuidados postoperatorios por una semana, se esperó tres semanas para la expresión del vector AAV; transcurrido ese tiempo, se realizó la extracción del cerebro, se realizó la Tinción rápida de Golgi y por último se observó al microscopio (Figura 1).

Figura 1

Estrategia experimental para evaluar el efecto de la sobreexpresión de CCL1 en las espinas dendríticas de las neuronas del giro dentado del hipocampo.



El procedimiento de Tinción Rápida de Golgi (Pilati et al., 2008), con modificaciones menores, fue el siguiente: las ratas fueron anestesiadas con una sobredosis de ketamina/xilazina antes de remover los cerebros de sus cráneos. Los cerebros se retiraron de los cráneos, cortados por la mitad, y fijados inmediatamente en paraformaldehído al 5% (Sigma) en PBS con un pH 7.6 durante 2 días a 21°C; después de la fijación inicial, los cerebros se incubaron en una solución cromatada recién preparada conteniendo 3% de dicromato de potasio (MERCK) y 5% de paraformaldehído en PBS con pH 7.6, con cambios diarios de solución recién preparadas.

Después de 48 horas de cromación, los cerebros se lavaron varias veces con una solución de nitrato de plata al 2% (AppliChem) en agua destilada antes de la incubación en nitrato de plata durante otras 48 horas para que se produjera la precipitación de metales pesados. Los cerebros se cubrieron con papel de aluminio, para evitar la exposición a la luz, y se guardaron a 4°C.

Se cortaron secciones de cerebro en un criostato rotatorio de alta gama MNT (Slee, Alemania) a 5°C con un grosor de 80 micrómetros. Se colocaron a temperatura ambiente en portaobjetos cubiertos con gelatina y montados utilizando DPX (Sigma).

Las secciones Golgi fueron estudiadas por microscopía óptica de luz Leica DM 3000 LED usando el objetivo de 100x de inmersión. Se contaron un total de 3 neuronas piramidales del hipocampo dorsal por cada animal. Se analizó la densidad de las espinas proximales apicales (mínimo 100 micrómetros de soma). Cada neurona fue examinada y se eligió un segmento de 10 micrómetros de longitud de una dendrita de segundo o tercer orden (que sobresaliera de su dendrita apical original) para la cuantificación de la densidad de la columna (Ramírez et al., 2018). Todos los análisis por microscopía se hicieron ciego a condición experimental.

Las imágenes de las dendritas apicales seleccionadas se capturaron a través de una cámara fotográfica Leica MC170 HD conectada al microscopio óptico Leica (origen: Alemania). Se capturaron imágenes en serie de cada dendrita en todo el segmento analizado (Z-stack) utilizando el Programa Leica Application Suite versión 4.12.0. Las microfotografías de una dendrita se apilaron en un solo archivo. En la configuración manual del Programa se estableció un límite máximo de 40 capturas con un intervalo aproximado de dos micrómetros entre cada una. La cantidad de fotografías se tomaban hasta lograr captar toda la profundidad de la dendrita de interés.

Se utilizó el Programa ImageJ para Windows (ImageJ blunded with 64-bit Java 8) para la evaluación de las secciones con tinción rápida de Golgi.

Se tabularon los datos con gráficos utilizando el promedio y el Error Estándar de la Media. El análisis estadístico se completó utilizando Prism GraphPad (versión 10) en donde se realizó la prueba de análisis de la varianza (ANOVA) de una vía y la prueba múltiple de comparación de Tukey.

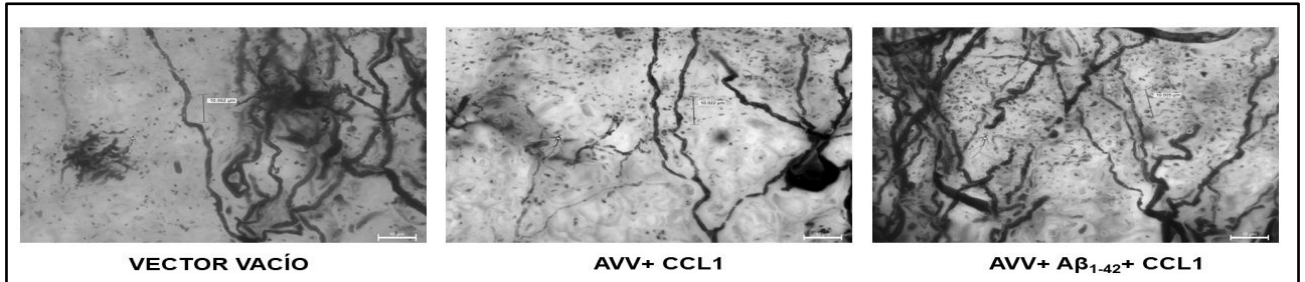
Resultados

Se observaron y contabilizaron el número de espinas dendríticas de las neuronas del giro dentado del hipocampo de un segmento de 10 μm de longitud teñidas con la tinción Golgi según condición experimental.

En la Figura 2 se muestran las imágenes fotográficas representativas de los tres grupos experimentales: **A.** AAV-GFP + mCherry (Vector vacío/Control), **B.** AAV-CCL1-mCherry y **C.** AAV-A β_{1-42} + CCL1-mCherry.

Figura 2

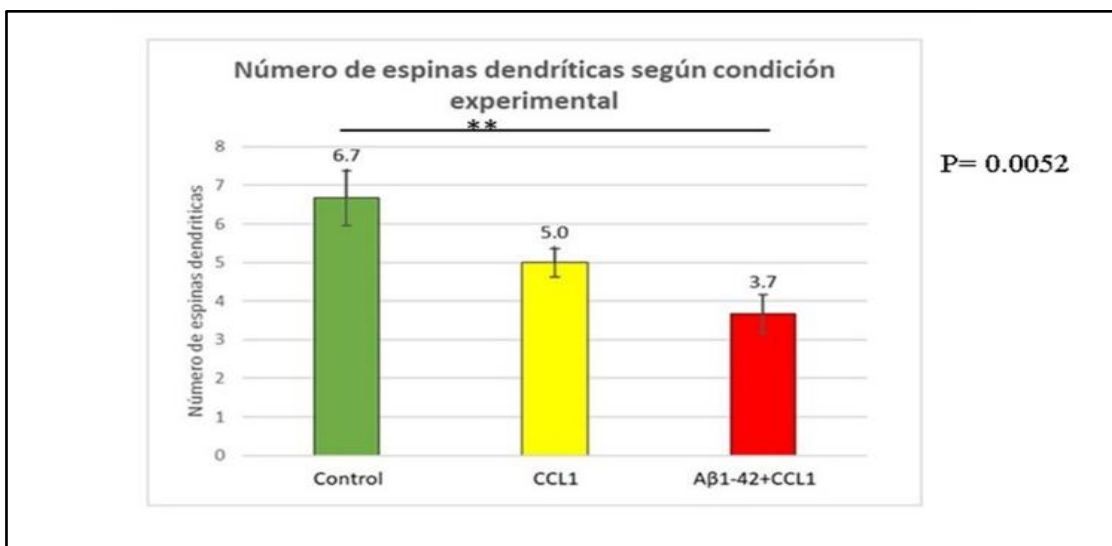
Microscopia óptica de las espinas dendríticas de las neuronas maduras del giro dentado según condición experimental, magnificación con objetivo de 100X.



En la Figura 3, reportamos diferencia significativa ($F(2, 15) = 7.625$ y una $P = 0.00520$), específicamente entre el grupo Control (vector vacío) y el grupo experimental $AVV + A\beta_{1-42} + CCL1$ ($p = 0.0038$), mientras no hubo diferencias significativas entre el grupo Control versus el grupo experimental ($p = 0.1102$) ni entre el grupo experimental $AVV + CCL1$ versus el grupo experimental $AVV + A\beta_{1-42} + CCL1$ ($p = 0.2261$).

Figura 3.

Gráfico de número de espinas dendríticas de las neuronas del giro dentado del hipocampo de cerebro de rata según condición experimental.



Discusión

La neuroinflamación juega un papel importante en la EA, ya que sus efectos se pueden evidenciar en todas las etapas de la enfermedad (Götz et al., 2018; McLarnon, 2014; Xia et al., 2017). Recientes estudios preclínicos y clínicos han demostrado que la respuesta inflamatoria inicia muchos años antes que se formen las placas seniles y los ovillos neurofibrilares, durante el estadio preclínico de la EA, como un método de defensa y búsqueda de la homeostasis celular (Leng & Edison, 2021; Monson et al., 2014).

La EA se caracteriza por la acumulación anómala del péptido A β y la proteína tau fosforilada que conducen a una respuesta inflamatoria de la microglía que libera moléculas, como citocinas proinflamatorias, que pueden causar daño neuronal y degeneración (Petrália et al., 2020). Las quimiocinas en la EA regulan la migración microglial y el reclutamiento de los linfocitos al área de la inflamación que se produce por el depósito de A β .

En el estudio realizado por Ito et al. (2019) determinaron que la proteína CCL1 (I-309) promueve la infiltración de linfocitos T reguladores en el cerebro de ratones que suprime la astrogliosis, posibilitando la recuperación neurológica después de un accidente isquémico. La quimiocina I-309 atrae y recluta células inflamatorias al sitio de la lesión y su aumento constante en pacientes con deterioro cognitivo leve puede indicar un aumento de la lesión cerebral o bien un mecanismo para promover la neurogénesis, que es un proceso que se ha propuesto como compensatorio en la EA (Taupin, 2009; Zhou et al., 2023).

Se ha podido corroborar mediante estudios de la actividad electrofisiológica que las neuronas están hiperactivas en los estadios iniciales de la EA producto de la acumulación de A β y tau fosforilada, y progresivamente van perdiendo función

sináptica (Tzavellas et al., 2024). Se ha evidenciado que las espinas dendríticas pueden reorganizarse, cambiar de números y de formas durante la plasticidad sináptica (Chidambaram et al., 2019). Estudios han descrito una disminución de las espinas dendríticas en presencia de $A\beta_{1-42}$ (como el de Ramírez et al. (2018) Borbély et al. (2014) y Kasza et al. (2017)). En nuestro estudio, la sobreexpresión de la proteína CCL1 no disminuyó el número de espinas dendríticas de manera significativa, pero sí disminuyó significativamente el número de dendritas en el grupo con el vector $A\beta_{1-42}$ + CCL1 comparado con el grupo control, lo que coincide con estudios anteriores.

La neurotoxicidad producida por la $A\beta$ en el hipocampo provoca neuroinflamación y neurodegeneración, evidenciado por pérdida de sinapsis. Proponemos que estos cambios subyacen el deterioro cognitivo asociado a amiloide (Facchinetti et al., 2018) y sugieren que, en el contexto de la acumulación del péptido $A\beta$, la CCL1 no juega un rol modulador en la densidad sináptica.

El estudio de los mecanismos que producen la pérdida de sinapsis puede ayudar a comprender mejor la enfermedad, y en un futuro prevenir su aparición y el progreso mediante la fabricación de medicamentos y/o terapias específicas. Por ello, son importantes los estudios en modelos animales para comprender el rol de todas las proteínas involucradas (Bale et al., 2019).

Este estudio tuvo limitaciones importantes a tomar en consideración. La técnica de tinción por Golgi varía considerablemente, y es posible que el método que estandarizamos en este estudio sea menos conducente a evaluación de espinas (Ramírez et al., 2018). Aunque la unidad de análisis es la neurona, y se obtienen múltiples neuronas por cada animal, el estudio se basa en pocos animales por grupo. Futuros estudios podrán confirmar y ampliar los hallazgos de este estudio.

Conclusión

La citocina CCL1 (I-309) ha sido útil como biomarcador para detectar los estadios preclínicos de la EA como se reportó en el estudio de Villarreal et al., (2016) y en nuestro estudio se observó que la sobreexpresión de la citocina no disminuyó significativamente el número de espinas dendríticas de las neuronas en el hipocampo, pero sí se evidenció la fragilidad de las espinas dendríticas ante la sobreexpresión del péptido $A\beta_{1-42}$, involucrado en la neurodegeneración como se ha observado en otros estudios.

En base a los resultados obtenidos recomendamos que para futuros estudios se confirme la observación en muestras adicionales evaluando la morfología de las espinas dendríticas utilizando microscopía confocal.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT) bajo el contrato N°178-2019 a raíz de la Convocatoria Pública de Nuevos Investigadores 2019. A la doctora Maricela Urroz, directora del Departamento de Histología Humana y a la magister Hildauro Acosta de Patiño, directora del CIIMET, de la Facultad de Medicina, Universidad de Panamá por autorizar el uso de los equipos de microscopía óptica con cámara Leica para la captura de las imágenes. Al licenciado Andrés Salazar, especialista en equipos de ALPHA MEDIQ, S.A quien capacitó y asesoró en el uso del programa Leica Application Suite (LAS) versión 4.12.0 para la captura de imágenes.

Referencias bibliográficas

- Akimoto, N., Ifuku, M., Mori, Y., & Noda, M. (2013). Effects of chemokine (C-C motif) ligand 1 on microglial function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 436(3), 455–461. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.05.126>
- Al-Ghraiyyah, N. F., Wang, J., Alkhalifa, A. E., Roberts, A. B., Raj, R., Yang, E., & Kaddoumi, A. (2022). Glial Cell-Mediated Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 18). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms231810572>
- Bale, T. L., Abel, T., Akil, H., Carlezon, W. A., Moghaddam, B., Nestler, E. J., Ressler, K. J., & Thompson, S. M. (2019). The critical importance of basic animal research for neuropsychiatric disorders. *Neuropsychopharmacology*, 44(8), 1349–1353. <https://doi.org/10.1038/s41386-019-0405-9>
- Borbély, E., Horváth, J., Furdan, S., Bozsó, Z., Penke, B., & Fülöp, L. (2014). Simultaneous changes of spatial memory and spine density after intrahippocampal administration of fibrillar β 1-42 to the rat brain. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/345305>
- Brejyeh, Z., & Karaman, R. (2020). Comprehensive Review on Alzheimer ' s Disease : *Molecules*, 25(24).
- Brosseron, F., Kleemann, K., Kolbe, C. C., Santarelli, F., Castro-Gomez, S., Tacik, P., Latz, E., Jessen, F., & Heneka, M. T. (2021). Interrelations of Alzheimer's disease candidate biomarkers neurogranin, fatty acid-binding protein 3 and ferritin to neurodegeneration and neuroinflammation. *Journal of Neurochemistry*, 157(6), 2210–2224. <https://doi.org/10.1111/jnc.15175>
- Chidambaram, S. B., Rathipriya, A. G., Bolla, S. R., Bhat, A., Ray, B., Mahalakshmi, A. M., Manivasagam, T., Thenmozhi, A. J., Essa, M. M., Guillemin, G. J., Chandra, R., & Sakharkar, M. K. (2019). Dendritic spines: Revisiting the physiological role. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 92, 161–193. <https://doi.org/10.1016/J.PNPBP.2019.01.005>
- Dorostkar, M. M., Zou, C., Blazquez-Llorca, L., & Herms, J. (2015). Analyzing dendritic spine pathology in Alzheimer's disease: problems and opportunities. In *Acta Neuropathologica* (Vol. 130, Issue 1). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1449-5>

- Facchinetti, R., Bronzuoli, M., & Scudei, C. (2018). An animal model disease based on the intrahippocampal injection of amyloide B-peptido (1- 42). In *Neurotrophic Factors: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*.
- Götz, J., Bodea, L. G., & Goedert, M. (2018). Rodent models for Alzheimer disease. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 19, Issue 10, pp. 583–598). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0054-8>
- Gupta, V. B., Hone, E., Pedrini, S., Doecke, J., O'Bryant, S., James, I., Bush, A. I., Rowe, C. C., Villemagne, V. L., Ames, D., Masters, C. L., & Martins, R. N. (2017). Altered levels of blood proteins in Alzheimer's disease longitudinal study: Results from Australian Imaging Biomarkers Lifestyle Study of Ageing cohort. *Alzheimer's and Dementia: Diagnosis, Assessment and Disease Monitoring*, 8, 60–72. <https://doi.org/10.1016/j.dadm.2017.04.003>
- Ito, M., Komai, K., Mise-Omata, S., Iizuka-Koga, M., Noguchi, Y., Kondo, T., Sakai, R., Matsuo, K., Nakayama, T., Yoshie, O., Nakatsukasa, H., Chikuma, S., Shichita, T., & Yoshimura, A. (2019). Brain regulatory T cells suppress astrogliosis and potentiate neurological recovery. *Nature*, 565(7738), 246–250. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0824-5>
- Kasza, Á., Penke, B., Frank, Z., Bozsó, Z., Szegedi, V., Hunya, Á., Németh, K., Kozma, G., & Fülöp, L. (2017). Studies for improving a rat model of Alzheimer's disease: ICV administration of well-characterized β -amyloid 1-42 oligomers induce dysfunction in spatial memory. *Molecules*, 22(11). <https://doi.org/10.3390/molecules22112007>
- Leng, F., & Edison, P. (2021). Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? In *Nature Reviews Neurology* (Vol. 17, Issue 3, pp. 157–172). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-00435-y>
- Liu, C., Cui, G., Zhu, M., Kang, X., & Guo, H. (2014). Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Chemokines produced by astrocytes and chemokine receptors. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(12), 8342–8355. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8342-8>
- McGeer, P. L., & McGeer, E. G. (n.d.). *Inflammation of the brain in Alzheimer's disease: implications for therapy*. <http://www.jleukbio.org>
- McLarnon, J. G. (2014). Correlated inflammatory responses and neurodegeneration in peptide-injected animal models of Alzheimer's disease. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/923670>
- Monson, N. L., Ireland, S. J., Ligocki, A. J., Chen, D., Rounds, W. H., Li, M.,

- Huebinger, R. M., Munro Cullum, C., Greenberg, B. M., Stowe, A. M., & Zhang, R. (2014). Elevated CNS inflammation in patients with preclinical Alzheimer's disease. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 34(1), 30–33. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.183>
- O'Bryant, S. E., Xiao, G., Barber, R., Huebinger, R., Wilhelmsen, K., Edwards, M., Graff-Radford, N., Doody, R., & Diaz-Arrastia, R. (2011). A blood-based screening tool for Alzheimer's disease that spans serum and plasma: Findings from TARC and ADNI. *PLoS ONE*, 6(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028092>
- Paxinos, G., & Watson, C. (2006). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (6th Edition). Academic Express.
- Petralia, M. C., Battaglia, G., Bruno, V., Pennisi, M., Mangano, K., Lombardo, S. D., Fagone, P., Cavalli, E., Saraceno, A., Nicoletti, F., & Basile, M. S. (2020). The role of macrophage migration inhibitory factor in Alzheimer's disease: Conventionally pathogenetic or unconventionally protective? In *Molecules* (Vol. 25, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules25020291>
- Pilati, N., Barker, M., Panteleimonitis, S., Donga, R., & Hamann, M. (2008). A rapid method combining Golgi and Nissl staining to study neuronal morphology and cytoarchitecture. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 56(6), 539–550. <https://doi.org/10.1369/jhc.2008.950246>
- Ramírez, E., Mendieta, L., Flores, G., & Limón, I. D. (2018). Neurogenesis and morphological-neural alterations closely related to amyloid β -peptide (25–35)-induced memory impairment in male rats. *Neuropeptides*, 67, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2017.11.001>
- Splittgerber, R. (2019). Neurons and neuroglia. In *Snell's Clinical Neuroanatomy* (8th ed., pp. 48–51). Wolters Kluwer.
- Taupin, P. (2009). Adult Neurogenesis, Neural Stem Cells and Alzheimer's Disease: Developments, Limitations, Problems and Promises. In *Current Alzheimer Research* (Vol. 6).
- Tzavellas, N. P., Tsamis, K. I., Katsenos, A. P., Davri, A. S., Simos, Y. V., Nikas, I. P., Bellos, S., Lekkas, P., Kanellos, F. S., Konitsiotis, S., Labrakakis, C., Vezyraki, P., & Peschos, D. (2024). Firing Alterations of Neurons in Alzheimer's Disease: Are They Merely a Consequence of Pathogenesis or a

Pivotal Component of Disease Progression? In *Cells* (Vol. 13, Issue 5).
<https://doi.org/10.3390/cells13050434>

Villarreal, A. E., O'Bryant, S. E., Edwards, M., Grajales, S., & Britton, G. B. (2016). Serum-based protein profiles of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment in elderly Hispanics. *Neurodegenerative Disease Management*, 6(3), 203–213. <https://doi.org/10.2217/nmt-2015-0009>

World Health Organization. (n.d.). *Global action plan on the public health response to dementia*. <http://apps.who.int/bookorders>.

Xia, Z., Peng, W., Cheng, S., Zhong, B., Sheng, C., Zhang, C., Gong, W., Cheng, S., Li, J., & Wang, Z. (2017). Naoling decoction restores cognitive function by inhibiting the neuroinflammatory network in a rat model of Alzheimer's disease. In *Oncotarget* (Vol. 8, Issue 26). www.impactjournals.com/oncotarget/

Zhou, F., Sun, Y., Xie, X., & Zhao, Y. (2023). Blood and CSF chemokines in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a systematic review and meta-analysis. In *Alzheimer's Research and Therapy* (Vol. 15, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13195-023-01254-1>