



Regeneració a partir de cèl·lules mare en les malalties neurodegeneratives

Jordi Alberch, Josep M. Canals

Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica,
Facultat de Medicina, IDIBAPS, Universitat de Barcelona, Barcelona
Correspondència: alberch@ub.edu. Tel. 93-4035285. Fax 93-4021907

És el moment de trencar dogmes, però no de fer miracles. En els darrers anys s'acaba de trencar un dels dogmes científics més establerts: les neurones no es divideixen i no es poden substituir, per tant, no hi ha capacitat de regeneració en el sistema nerviós central. Estudis recents indiquen que, realment, les neurones madures segueixen sense dividir-se, però sí que, en condicions molt determinades, es poden substituir gràcies a l'existència de cèl·lules mare neurals que poden donar lloc a noves neurones en el nostre sistema nerviós. Aquest descobriment ha obert l'esperança de trobar nous tractaments per a les malalties neurodegeneratives. Aquestes malalties, com són la malaltia d'Alzheimer, la corea de Huntington, la malaltia de Parkinson o l'esclerosi lateral amiotròfica, es caracteritzen per la mort selectiva d'un grup de neurones en el cervell o en la medul·la espinal. Els tractaments farmacològics per a aquestes malalties han fracassat, són únicament simptomàtics i no eviten la progressió de la neurodegeneració. Per aquest motiu, la recerca biomèdica en els darrers anys s'ha centrat en dos punts: *a*) prevenir la mort neuronal selectiva de les neurones afectades en aquestes malalties; i *b*) substituir les neurones degenerades amb el trasplantament de noves neurones. La trobada de cèl·lules mare amb capacitat de formar noves neurones dins del nostre sistema nerviós adult podria fer possible la substitució de neurones del sistema nerviós, concepte fins ara impensable.

Què són les cèl·lules mare neurals i per què no les trobàvem?

Les cèl·lules mare són cèl·lules que es van autorenovant i són multipotencials amb capacitat de formar qualsevol tipus cel·lular de l'organisme. Dins del nostre organisme existeixen diferents tipus de cèl·lules mare amb diversos potencials de diferenciació. Les cèl·lules embrionàries del blastòcit (fase inicial del desenvolupament) són les cèl·lules amb més potencialitat, ja que es diferencien en tots els tipus cel·lulars del nostre cos per a formar tot un organisme sencer. Aquestes cèl·lules poden ser aïllades i, *a priori*, es poden diferenciar en el tipus cel·lular que ens interessa substituir. Per causa de la seva enorme potencialitat, les cèl·lules embrionàries són difícils de controlar. Petites desviacions en el procés de diferenciació poden donar lloc a un creixement incontrolat d'aquestes cèl·lules formant teratomes (tumor de cèl·lules embrionàries que donen lloc a molts tipus cel·lulars diferents). Per contra, les cèl·lules mare que trobem als diferents òrgans en l'adult també mantenen la capacitat de formar noves cèl·lules, però amb un potencial de diferenciació més restringit.

La majoria de cèl·lules del nostre organisme té capacitat de regeneració a partir de cèl·lules mare. Qualsevol ferida en la pell es pot cicatritzar, el fetge també es regenera i el moll de l'os està constantment fent cèl·lules sanguínies noves. Per què les estructures més importants del nostre organisme, com són el cervell i el cor, tenen tants problemes per regenerar-se? Potser és, justament, perquè són importants. Dins de l'escala evolutiva, els mamífers són els únics animals amb problemes en la regeneració del seu sistema nerviós central. Els rèptils, amfibis i ocells tenen capacitat de regenerar algunes zones del seu cervell. S'ha de destacar el cas dels ocells cantaires, com els canaris, que degeneren i regeneren quasi completament el lòbul del cant cada any durant l'època d'aparellament [18]. Això implica que aquests ocells estiguin sotmesos a un nou aprenentatge cada any. Els cervells més evolucionats com el nostre han renunciat a la regeneració, almenys parcialment.

Per què hem trigat tant a trobar cèl·lules mare en el nostre cervell? Santiago Ramón y Cajal, al principi del segle xx, ja va establir que en el sistema nerviós central adult estava tot fixat, era immutable i no hi havia regeneració [21]. Aquesta creença ha arribat fins als nostres dies. Però en la dècada de 1960, Joseph Altman i Gopal D. Das, de l'Institut Tecnològic de Massachusetts, van descriure neurogènesi en l'hipocamp de rates adultes [3]. La manca de marcadors específics va fer que aquesta idea no

prosperés. La identificació de cèl·lules mare sempre ha estat complicada. Són cèl·lules indiferenciades i no es coneixen gaires marcadors específics. Quan es diferencien en un llinatge específic comencen a expressar marcadors propis que indiquen en quin tipus cel·lular es diferenciarà. Fins ara ha estat difícil poder identificar les cèl·lules mare multipotencials. Actualment es comença a disposar de marcadors de cèl·lules mare en fases molt inicials. També podem utilitzar marcadors de proliferació cel·lular, com la bromodeoxiuridina, que permet fer un seguiment de les cèl·lules que s'han dividit i en què es transformen. De fet, emprant aquest darrer marcador per al seguiment de processos tumorals en pacients, es va detectar la presència de cèl·lules mare en el cervell humà. En el sistema nerviós central, només s'han identificat unes poques cèl·lules mare en algunes zones cerebrals, com són la zona subventricular de la paret dels ventricles laterals i en la capa subgranular del gir dentat de l'hipocamp. Aquestes cèl·lules estan formant petits grups amb característiques molt similars a un tipus de cèl·lules gials, els astròcits, però amb una potencialitat semblant a les cèl·lules precursoras. Arturo Alvarez-Buylla i els seus col·laboradors de la Universitat de Califòrnia han demostrat l'existència de diferents tipus cel·lulars amb diferents graus de diferenciació en la zona subventricular [4]. Aquestes cèl·lules mare posteriorment migraran cap al bulb olfatori on formaran noves neurones. Excepte aquesta renovació de les neurones del bulb olfatori, la producció de noves neurones en les altres zones cerebrals és molt limitada, però hi és. Els treballs del grup de Fred H. Gage de l'Institut Salk (Califòrnia) han demostrat que ratolins estabulats en un hàbitat amb molts estímuls presentaven un major nombre de neurones noves a partir de les cèl·lules mare del gir dentat de l'hipocamp en comparació amb animals estabulats en caixes buides [15]. Aquests estudis varen despertar un gran interès, ja que l'hipocamp és una zona que participa en els processos d'aprenentatge i de memòria. Els resultats suggerien que es podrien corregir els dèficits de memòria o aprenentatge si sabéssim estimular la neurogènesi en l'hipocamp adult.

Utilització terapèutica de les cèl·lules mare en el tractament de les malalties neurodegeneratives

La terapèutica cel·lular substitutiva pretén reemplaçar les cèl·lules que han degenerat mitjançant el trasplantament de cèl·lules noves. Aquest tipus d'aproximació terapèutica ja s'ha utilitzat en el tractament de diferents

malalties neurodegeneratives, com són la malaltia de Parkinson [10,11,19,20] o la corea de Huntington [6,12,23]. En pacients amb aquestes malalties, s'han realitzat trasplantaments de cèl·lules fetals del mesencèfal o del nucli caudat en les zones afectades, respectivament. Encara que alguns treballs han presentat resultats esperançadors, la millora dels pacients ha estat discreta. A part de les diferents dificultats metodològiques (lloc del trasplantament, nombre i manipulació de les cèl·lules, etc.) la utilització de cèl·lules fetals comporta altres problemes, com són l'heterogeneïtat de la mostra (hi ha molts tipus neuronals diferents; en canvi, en aquestes malalties només hi ha un sol tipus cel·lular afectat), la dificultat per aconseguir el material i la supervivència de les neurones. A més dels problemes científics, utilitzar cèl·lules de fetus humans també comporta problemes ètics. Malgrat aquests inconvenients, aquests primers treballs han servit per demostrar la viabilitat dels trasplantaments en el sistema nerviós central com a futura possibilitat per al tractament d'aquestes malalties neurològiques. L'aparició de les cèl·lules mare en aquest camp ha donat un tomb important en la recerca de noves metodologies que poden evitar alguns dels problemes que s'han observat amb la utilització de les cèl·lules fetals, però també obre nous reptes científics de difícil solució.

La terapèutica cel·lular substitutiva que utilitza cèl·lules mare per reemplaçar neurones mortes en malalties neurodegeneratives consta de diferents fases (figura 1):

1. Aïllament. Les cèl·lules mare poden ser embrionàries o adultes. Les cèl·lules embrionàries tenen una gran potencialitat, però poden originar teratomes. Les cèl·lules mare adultes es poden aconseguir de diferents teixits. El sistema nerviós central és de difícil accés i hi ha molt poques cèl·lules mare neurals. Una alternativa són els teixits perifèrics. Les cèl·lules hematopoètiques són uns excel·lents candidats. Els coneixements i l'experiència que ja es té sobre les cèl·lules mare hematopoètiques poden ser de gran utilitat per a l'aplicació de les cèl·lules mare en el sistema nerviós i en altres teixits. Treballs recents han demostrat que les cèl·lules mare hematopoètiques poden diferenciar-se en cèl·lules nervioses. A més, el fet que les cèl·lules es puguin treure del mateix individu, també evitaria el rebuig immunitari en el trasplantament.

2. Amplificació. Les cèl·lules mare es poden cultivar en el laboratori i, aprofitant la seva capacitat d'autorenovació, se'n pot obtenir una quantitat suficient per a realitzar els trasplantaments.

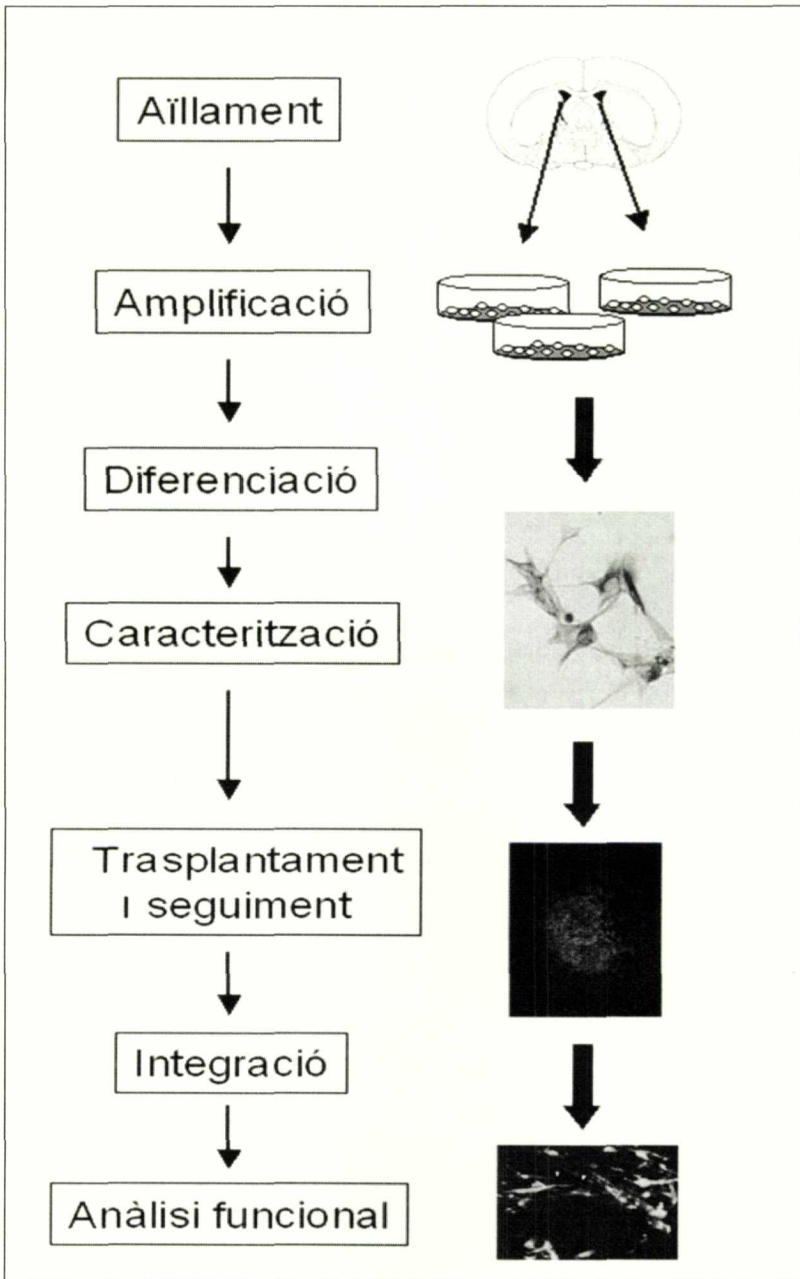


Fig. 1. Fases del protocol de manipulació i trasplantament de les cèl·lules mare.

3. Diferenciació. Un dels principals reptes és saber com dirigir una cèl·lula multipotencial a la neurona diferenciada que volem trasplantar. La manipulació genètica, activació de factors de transcripció i el tractament amb altres factors pot orientar aquestes cèl·lules amb una direcció o una altra.

4. Caracterització. El repte no és només obtenir neurones, sinó que s'ha d'aconseguir que tinguin el fenotip específic de les neurones afectades en les malalties neurodegeneratives. S'ha d'analitzar que les neurones diferenciades tinguin unes característiques morfològiques, neuroquímiques i electrofisiològiques similars a les neurones degenerades.

5. Trasplantament. Les cèl·lules diferenciades en cultiu poden ser trasplantades en la zona afectada mitjançant tècniques estereotàxiques.

6. Integració. Passar d'una condició en cultiu a la condició que les cèl·lules trobaran després del trasplantament no implica necessàriament que les cèl·lules es comportin de la mateixa manera. A més, en tractar-se de malalties cròniques, és important controlar i millorar la supervivència de les cèl·lules trasplantades.

7. Recuperació funcional. S'ha d'analitzar la formació de contactes sinàptics en les zones correctes i cal que es restableixin els circuits neuronals per aconseguir la recuperació funcional.

Aplicació de les cèl·lules mare en el tractament de la malaltia de Parkinson i la corea de Huntington

Per a utilitzar les cèl·lules mare en el tractament de les malalties neurodegeneratives cal que es donin una sèrie de condicions. Principalment, la degeneració ha d'estar localitzada en una zona ben definida anatòmicament i la zona de regeneració ha de ser relativament curta. Aquestes premisses fan complicat aplicar la terapèutica cel·lular a qualsevol malaltia neurodegenerativa. Majoritàriament, en aquestes malalties hi ha diversos grups neuronals afectats i les distàncies a regenerar són llargues. Malgrat això, la malaltia de Parkinson i la corea de Huntington són les que tenen més expectatives amb aquest tipus de terapèutica substitutiva. Actualment tenim bastants coneixements de la fisiopatologia d'aquestes malalties gràcies a la informació de què disposem sobre l'anatomia dels ganglis basals, els seus circuits i també la seva funcionalitat. Tot això fa més assequible dissenyar nous abordatges terapèutics.

La malaltia de Parkinson. La malaltia de Parkinson es caracteritza per una degeneració de les neurones dopaminèrgiques de la substància negra *pars compacta* que es projecten als nuclis caudat i putamen. Aquesta degeneració produeix tremolor, rigidesa i bradicinèsia. L'objectiu de la terapèutica cel·lular és aconseguir neurones dopaminèrgiques per trasplantar. El lloc de trasplantament més adient és els nuclis caudat o putamen, ja que les neurones de la *substantia nigra pars compacta* tenen un alliberament tònic de dopamina en aquests nuclis. Treballs anteriors han demostrat que trasplantant cèl·lules que alliberin dopamina en els nuclis caudat i putamen es pot aconseguir una millora funcional en models experimentals parkinsonians [9,22,24]. Fins ara s'han utilitzant diferents tipus cel·lulars per alliberar dopamina, com són les cèl·lules de la medul·la adrenal, del cos carotidi o les cèl·lules mesencefàliques fetals. El principal problema és l'heterogeneïtat cel·lular i el poc nombre de cèl·lules dopaminèrgiques que hi ha en aquestes mostres. La diferenciació de cèl·lules mare en neurones dopaminèrgiques pot resoldre aquests problemes [5,16]. Una primera aproximació seria estimular la neurogènesi endògena. Un estudi recent proposa que hi ha formació de noves neurones en la substància negra adulta [27]. Però altres treballs només observen la formació de cèl·lules gials després de lesions en la substància negra [14,17]. Independentment d'aquestes diferències, la regeneració de la via nigroestriatal en un cervell adult seria realment difícil. La segona aproximació, més esperançadora, és expandir cèl·lules mare i diferenciar-les en neurones dopaminèrgiques per trasplantar-les posteriorment. Recentment s'han descrit alguns factors que augmenten el nombre de neurones dopaminèrgiques en un cultiu de cèl·lules mare, com són el factor de transcripció Nur-1, FGF-2 i el medi condicionat d'astròcits mesencefàlic [13,26]. Tot i que actualment s'ha millorat el rendiment de les neurones dopaminèrgiques en cultiu, i que en alguns models s'ha observat una recuperació conductual després del trasplantament [13], encara s'ha de millorar la supervivència d'aquestes neurones *in vivo*.

Una altra alternativa és una terapèutica neuroprotectora que utilitza les cèl·lules mare com a bombes d'administració de factors tròfics. Aquestes cèl·lules es poden modificar genèticament per alliberar quantitats importants de factors tròfics i posteriorment poden ser trasplantades per millorar la supervivència de les neurones que encara no han degenerat. El GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*) és un potent factor neurotròfic per a les neurones dopaminèrgiques; s'ha demostrat que utilitzar cèl·lules modificades per alliberar GDNF produeix un augment de la supervivència de les neurones dopaminèrgiques en models experimentals de la malaltia de Parkinson [1].

La malaltia de Huntington. La corea de Huntington és una malaltia hereditària causada per la mutació del gen de la huntingtina. Això produeix una degeneració de les neurones GABAèrgiques (que segreguen o transmeten àcid γ -aminobutíric) de projecció dels nuclis caudat i putamen que provoquen uns moviments hiperkinètics involuntaris del tronc i les extremitats. El trasplantament de cèl·lules fetals d'aquestes zones ha aportat alguns resultats discrets, però esperançadors. Augmentar el nombre de neurones GABAèrgiques per al trasplantament i millorar la supervivència és un dels objectius principals de la recerca en el tractament d'aquesta malaltia. En el nostre laboratori, hem aconseguit diferenciar cèl·lules precursoras neurals en cultiu en neurones GABAèrgiques amb un alt rendiment mitjançant un tractament seqüencial d'àcid retinoic i clorur de potassi [7]. Aquestes neurones sobreviuen durant períodes llargs de temps i formen connexions amb les neurones endògenes del nucli caudat/putamen quan són trasplantades en un model excitotòxic de malaltia de

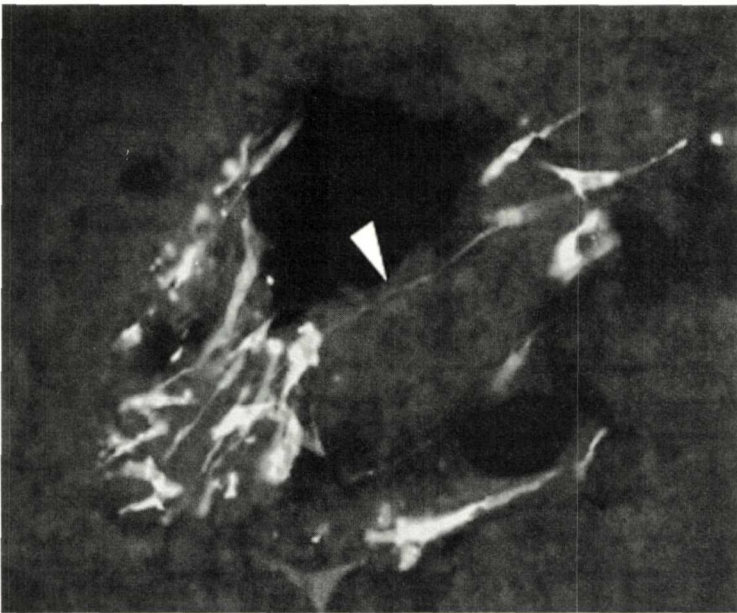


Fig. 2. Neurones GABAèrgiques (marcades amb la proteïna verda fluorescent, que en la fotografia en blanc i negre es veuen en un to més clar) diferenciades en cultiu i trasplantades en el nucli caudat/putamen de rates tractades amb àcid quinolínic com a model de malaltia de Huntington. La punta de fletxa indica les projeccions de les neurones trasplantades.

Huntington (fig. 2). El següent pas serà l'anàlisi funcional per observar la recuperació conductual en models transgènics amb huntingtina mutada.

També s'ha de considerar la formació de noves neurones a partir de cèl·lules mare endògenes. S'ha descrit que hi ha neurogènesi en el nucli caudat/putamen adult [25]. La proximitat de la zona subventricular productora de cèl·lules mare pot ser una bona font per produir noves neurones. Treballs recents han detectat la formació de noves neurones en el nucli caudat/putamen després de la lesió excitotòxica amb àcid quinolínic. Aquest treballs indiquen que conèixer la regulació de la neurogènesi en l'adult podria afavorir el processos de regeneració.

En la terapia neuroprotectora per a la malaltia de Huntington els factors neurotròfics més idonis serien els BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) i l'esmentat GDNF. Estudis previs indiquen que aquest dos factors neurotròfics protegeixen les neurones del nucli caudat/putamen en models experimentals de malaltia de Huntington [2,8]. Especialment el BDNF hi estaria principalment implicat, ja que la huntingtina regula la seva expressió [28] i la disminució de BDNF empitjora el dèficit motor en animals transgènics amb huntingtina mutada [8].

Conclusions

La terapèutica cel·lular en les malalties neurodegeneratives és una aposta de futur. Hem d'aprendre de l'experiència d'altres teixits, principalment de les cèl·lules hematopoètiques, que ja fa molts anys que s'utilitzen per renovar el moll d'os en pacients amb alteracions hematopoètiques. El teixit nerviós es molt més complicat. A més de diferenciar neurones amb un fenotip adequat, cal que encaixin perfectament en el seu entorn i que estableixin les connexions adients. En els darrers anys s'han fet avanços importants en la identificació dels mecanismes que regulen la proliferació i la diferenciació de les cèl·lules mare en tipus cel·lulars concrets, obrint l'esperança de poder renovar les cèl·lules mortes en malalties degeneratives. La malaltia de Parkinson i la corea de Huntington són les malalties neurogeneratives amb més possibilitats per poder aplicar-hi aquestes noves terapèutiques a mig o llarg termini.

Bibliografia

1. Akerud P, Canals JM, Snyder EY, Arenas E. 2001. Neuroprotection through delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor by neural stem cells in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 21:8108-8118
2. Alberch J, Perez-Navarro E, Canals JM. 2004. Neurotrophic factors in Huntington's disease. *Prog. Brain Res* 146:195-229
3. Altman J, Das GD. 1965. Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature* 207:953-956
4. Alvarez-Buylla A, Lim DA. 2004. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 41:683-686
5. Arenas E. 2002. Stem cells in the treatment of Parkinson's disease. *Brain Res Bull* 57:795-808
6. Bachoud-Levi AC, Remy P, Nguyen JP, Brugieres P, Lefaucheur JP, Bourdet C, Baudic S, Gaura V, Maison P, Haddad B, Boisse MF, Grandmougin T, Jeny R, Bartolomeo P, Dalla Barba G, Degos JD, Lisovski F, Ergis AM, Pailhous E, Cesaro P, Hantraye P, Peschanski M. 2000. Motor and cognitive improvements in patients with Huntington's disease after neural transplantation. *Lancet* 356:1975-1979
7. Bosch M, Pineda JR, Suñol C, Petriz J, Cattaneo E, Alberch J, Canals JM. 2004. The induction of GABA-ergic phenotype in a neural stem cell line for transplantation in an excitotoxic model of Huntington's disease. *Exp Neurol* (190):42-58
8. Canals JM, Pineda JR, Torres-Peraza JF, Bosch M, Martin-Ibanez R, Munoz MT, Mengod G, Ernfors P, Alberch J. 2004. Brain-derived neurotrophic factor regulates the onset and severity of motor dysfunction associated with encephalineric neuronal degeneration in Huntington's disease. *J Neurosci* 24:7727-7739
9. Curran EJ, Albin RL, Becker JB. 1993. Adrenal medulla grafts in the hemiparkinsonian rat: profile of behavioral recovery predicts restoration of the symmetry between the two striata in measures of pre- and postsynaptic dopamine function. *J Neurosci* 13:3864-3877
10. Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, Winfield H, Culver S, Trojanowski JQ, Eidelberg D, Fahn S. 2001. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 344:710-719
11. Hagell P, Piccini P, Bjorklund A, Brundin P, Rehncrona S, Widner H, Crabb L, Pavese N, Oertel WH, Quinn N, Brooks DJ, Lindvall O. 2002. Dyskinesias following neural transplantation in Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 5:627-628
12. Hauser RA, Sandberg PR, Freeman TB, Stoessl AJ. 2002. Bilateral human fetal striatal transplantation in Huntington's disease (author reply). *Neurology* 58:1704
13. Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, Nguyen J, Sanchez-Pernaute R, Bankiewicz K, McKay R. 2002. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 418:50-56
14. Lie DC, Dzieczapolski G, Willhoite AR, Kaspar BK, Shults CW, Gage FH. 2002. The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. *J Neurosci* 22:6639-6649
15. Lie DC, Song H, Colamarino SA, Ming GL, Gage FH. 2004. Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44:399-421
16. Lindvall O, Kokaia Z, Martinez-Serrano A. 2004. Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nat Med* 10 Suppl:S42-S50
17. Mao L, Lau YS, Petroske E, Wang JQ. 2001. Profound astrogenesis in the striatum of adult mice following nigrostriatal dopaminergic lesion by repeated MPTP administration. *Brain Res Dev* 131:57-65

18. Nottebohm F. 2004. The road we travelled: discovery, choreography, and significance of brain replaceable neurons. *Ann N Y Acad Sci* 1016:628-658
19. Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH, Stoessl AJ, Sossi V, Brin MF, Shannon KM, Nauert GM, Perl DP, Godbold J, Freeman TB. 2003. A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 54:403-414
20. Piccini P, Brooks DJ, Bjorklund A, Gunn RN, Grasby PM, Rimoldi O, Brundin P, Hagell P, Rehncrona S, Widner H, Lindvall O. 1999. Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. *Nat Neurosci* 2:1137-1140
21. Ramón y Cajal S. 1928. Degeneration and regeneration of the nervous system. Hafner, New York
22. Rioux L, Gaudin DP, Bui LK, Gregoire L, DiPaolo T, Bedard PJ. 1991. Correlation of functional recovery after a 6-hydroxydopamine lesion with survival of grafted fetal neurons and release of dopamine in the striatum of the rat. *Neuroscience* 40:123-131
23. Rosser AE, Barker RA, Harrower T, Watts C, Farrington M, Ho AK, Burnstein RM, Menon DK, Gillard JH, Pickard J, Dunnett SB. 2002. Unilateral transplantation of human primary fetal tissue in four patients with Huntington's disease: NEST-UK safety report ISRCTN no 36485475. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 73:678-685
24. Tang FI, Tien LT, Zhou FC, Hoffer BJ, Wang Y. 1998. Intranigral ventral mesencephalic grafts and nigrostriatal injections of glial cell line-derived neurotrophic factor restore dopamine release in the striatum of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Exp Brain Res* 119:287-296
25. Tattersfield AS, Croon RJ, Liu YW, Kells AP, Faull RL, Connor B. 2004. Neurogenesis in the striatum of the quinolinic acid lesion model of Huntington's disease. *Neuroscience* 127:319-332
26. Wagner J, Akerud P, Castro DS, Holm PC, Canals JM, Snyder EY, Perlmann T, Arenas E. 1999. Induction of a midbrain dopaminergic phenotype in Nurr1-overexpressing neural stem cells by type 1 astrocytes. *Nat Biotechnol* 17:653-659
27. Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlen M, Cassidy RM, Johansson CB, Brismar H, Shupliakov O, Frisen J, Janson AM. 2003. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:7925-7930
28. Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, Leavitt BR, Goffredo D, Conti L, MacDonald ME, Friedlander RM, Silani V, Hayden MR, Timmusk T, Sipione S, Cattaneo E. 2001. Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* 293:493-498