

# Estudio experimental sobre los efectos de la hiperfenilalaninemia materna en el sistema nervioso central y la conducta de ratas hijas

C. García Vera<sup>1</sup>, A. Baldellou Vázquez<sup>1</sup>, J. Gracia Romero<sup>2</sup>, P. Ventura Faci<sup>3</sup>, J. Pérez-González<sup>3</sup>

**Resumen. Objetivo:** Estudiar las alteraciones cerebrales en ratas hijas de madres hiperfenilalaninémicas, así como la posibilidad de prevenirlas mediante la administración durante la gestación, de suplementos dietéticos de valina, leucina e isoleucina.

**Métodos:** Estudio experimental en dos gestaciones consecutivas de 18 ratas Wistar. La primera gestación sirve como grupo control. En la segunda se provoca una hiperfenilalaninemia experimental, mediante inyección de fenilalanina y p-clorofenilalanina (inhibidor de fenilalanina-hidroxilasa). En la mitad de las ratas madres de esta segunda gestación se suplementa la dieta con aminoácidos de cadena ramificada. En las ratas crías se practica estudio histológico cerebral (microscopía electrónica convencional y estudio de sinaptosomas), y de conducta (laberinto de agua en T), en el nacimiento y a los 35 y 65 días de vida.

**Resultados y conclusiones:** Las ratas hijas del grupo sometido a hiperfenilalaninemia son microcéfalas ( $p = 0,0003$ ), presentan menos sinaptosomas, que son de superficie mayor ( $p = 0,0081$  en recién nacidas,  $p = 0,0028$  a los 35 días de vida) y de aspecto más inmaduro (menor contenido vesicular). Asimismo, se detectan alteraciones en la mielinización. En el test de conducta (65 días de vida), las ratas hijas del grupo de hiperfenilalaninemia, cometen significativamente más errores ( $p = 0,0167$ ), y necesitan más tiempo para su resolución ( $p = 0,059$ ). Ninguna de estas alteraciones se logra prevenir con la administración a la madre de suplementos de aminoácidos de cadena ramificada. Con ellos se consigue mejorar la paridad, pero se trata de crías afectas, por lo que su administración parece contraproducente.

*An Esp Pediatr 1998;48:11-16.*

**Palabras clave:** Hiperfenilalaninemia materna experimental; Ratas; Sinaptosomas; Conducta; Prevención.

## EXPERIMENTAL STUDY OF THE EFFECTS OF MATERNAL HYPERPHENYLALANINEMIA IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM AND ON THE BEHAVIOR OF OFFSPRING RATS

**Abstract. Objective:** This work attempts to study the cerebral alterations in rat offspring of hyperphenylalaninemic mothers, as well as the possibility of preventing them by means of administration of dietetic supplements of valine, leucine and isoleucine during the pregnancy.

**Patients and methods:** An experimental study in two consecutive pregnancies of 18 Wistar rats was carried out. The first pregnancy serves as the control group. In the second pregnancy, an experimental hyperphenylalaninemia was provoked by means of injection of phenylalanine and chlorophenylalanine (phenylalanine-hydroxylase

inhibitor). In half of the mothers during the second pregnancy the diet was supplemented with branched-chain amino acids. In the offspring rats, a histological cerebral study was performed (conventional electron microscopy and study of synaptosomes). A behavioral study (T-water maze) was also performed at birth and on the 35th and 65th days of life.

**Results:** The offspring of the group submitted to hyperphenylalaninemia were microcephalic ( $p = 0.0003$ ) and had fewer synaptosomes that had a larger surface area ( $p = 0.0081$  in newborn rats,  $p = 0.0028$  on the 35th day of life) and of a more immature aspect (less vesicular content). In addition, alteration in the myelinization were detected. In the behavior test (65th day of life), the offspring of the mothers with hyperphenylalaninemia make significantly more mistakes ( $p = 0.0167$ ) and they needed more time for their resolution ( $p = 0.059$ ). None of these alterations could be prevented by the administration of supplements of branched-chain amino acids to the mother. These supplements resulted in a higher fertility rate, but this action results in affected young rats, so their administration seems to be counter-productive.

**Key words:** Experimental maternal hyperphenylalaninemia; Rats; Synaptosomes; Behavior; Prevention.

## Introducción

En 1957, Dent identificó los primeros casos de retraso mental en hijos de madres con fenilcetonuria (PKU) no controlada durante el embarazo<sup>(1)</sup>. A partir de ese momento se suceden nuevas observaciones de distintos autores<sup>(2-6)</sup> y en el momento actual no hay dudas acerca de la relación existente entre las cifras de fenilalanina (Phe) en la madre y la presencia de microcefalia, retraso mental y cardiopatía en el recién nacido<sup>(5)</sup>.

La importancia epidemiológica del problema ha provocado diversas investigaciones<sup>(7-19)</sup>, pero en el momento actual no disponemos todavía de conocimientos suficientes acerca de la fisiopatología de la hiperfenilalaninemia materna. En el sistema nervioso central (SNC) de los hijos afectos se ha demostrado disminución de la actividad nucleótido-3-fosfohidrolasa cálcica; variación en los patrones de gangliósidos y sialoglicoproteínas<sup>(20)</sup> y formación anómala de agregados polirribosómicos<sup>(11,18)</sup>. Todo ello sugiere una alteración global en la melinización, en la síntesis proteica cerebral y en la producción de neurotransmisores<sup>(11)</sup>.

No obstante, pocos trabajos se han realizado acerca de las terminaciones sinápticas en la hiperfenilalaninemia experimental a pesar de que Niham encontró una menor densidad de terminales sinápticas en estos casos<sup>(21)</sup>. Sí que existen, sin embargo, estudios más recientes que investigan otros aspectos con-

<sup>1</sup>Departamento de Pediatría, <sup>2</sup>Departamento de Cirugía Infantil, Hospital Infantil «Miguel Servet». <sup>3</sup>Cátedra de Pediatría, Hospital Clínico Universitario «Lozano Blesa». Zaragoza.  
Correspondencia: César García Vera. C/ Argentina 1, 4º B. 44002 Teruel.  
Trabajo financiado por el F.I.S.S.S. (expte. nº 91/1025)  
Recibido: Enero 1997  
Aceptado: Junio 1997

ductuales y del desarrollo del SNC<sup>(10,15)</sup>, así como las posibilidades de prevenir las alteraciones en los recién nacidos, administrando a la gestante hiperfenilalaninémica una dieta suplementada con valina, leucina e isoleucina.

La sinaptogénesis es un proceso esencial para el normal desarrollo del SNC. Con los objetivos de investigar las alteraciones que morfológicamente pudieran detectarse en los sinaptosomas cerebrales de las crías de ratas con PKU experimental, y la posibilidad de prevenirlos con el empleo de suplementos dietéticos durante el embarazo de aminoácidos de cadena ramificada, se diseñó el siguiente estudio.

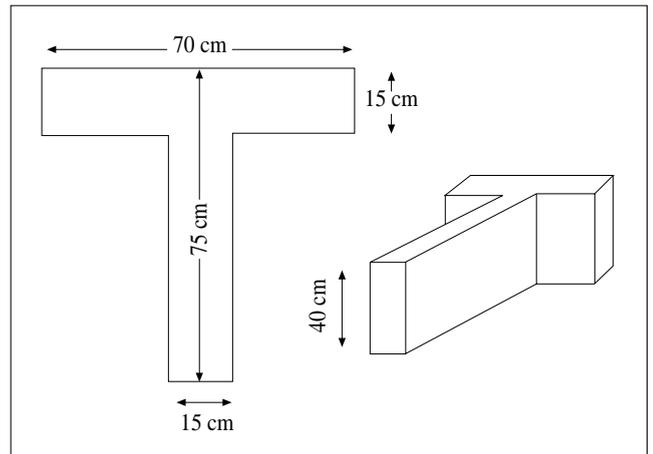
## Material y métodos

Dieciocho ratas Wistar hembras con valores de aminoácidos normales fueron sometidas a dos gestaciones consecutivas por los mismos machos. El primer embarazo (las ratas madres tenían 2 meses de vida) sirvió como grupo control (CONTR), mientras que durante toda la segunda gestación se reprodujo una hiperfenilalaninemia en las 18 ratas madres. En este segundo embarazo, 9 de las ratas gestantes fueron sometidas exclusivamente a la hiperfenilalaninemia (grupo EXPER), mientras que en las 9 restantes se suplementó, además, la dieta con valina, isoleucina y leucina (grupo VIL-EXPER).

Para reproducir la hiperfenilalaninemia en cifras similares a las que se producen en la PKU humana ( $\text{Phe} > 1.200 \text{ nmol/mL}$ ), se administraron inyecciones subcutáneas diarias de Phe y p-clo-rofenilalanina (inhibidor de la enzima fenilalanina-hidroxilasa) a las dosis recomendadas por Greengard ( $52 \text{ nmol/10 g}$  de peso y  $9 \text{ nmol/10 g}$  de peso, respectivamente)<sup>(22)</sup>, y preparadas para inyección según describe Baba<sup>(23)</sup>. Se comenzó a inyectar a las 18 madres el mismo día del segundo cruce y se finalizó el día del parto. Durante los mismos plazos de tiempo 9 de las anteriores ratas en este segundo embarazo recibieron, además, suplementos dietéticos (en el agua de bebida), de aminoácidos de cadena ramificada en cantidades de un 1% de la dieta total para valina e isoleucina y de un 1,33% para leucina<sup>(15)</sup>. Durante el embarazo se practicaron en todos los grupos, y mediante extracción de sangre de la vena del rabo del animal, dos determinaciones de aminoácidos mediante autoanalizador HPLC.

Tras el nacimiento, se pesó a cada una de las crías y un tercio de cada camada fue sacrificado para valorar el peso de cerebro y cerebelo (conjuntamente) y para estudio histopatológico. A los 35 días de vida otro tercio de cada camada fue sacrificado con los mismos fines tras obtener el peso corporal. A los 65 días de vida se sacrificaron el resto de los animales. El sacrificio de los animales, incluso recién nacidos, se realizó tras anestesia con éter.

Para el estudio de los sinaptosomas se ha utilizado la técnica de partición de fases según describe J.A. Enríquez<sup>(24)</sup>, y que permite utilizar muestras de cerebro de hasta un mínimo de 1 gramo. En las ratas de 0 días de vida se recogió el cerebro de tres animales de la misma camada y se procesaron conjuntamente. El estudio morfológico se practicó sobre 5 fotos de cada preparación a 10.000 aumentos cada una, valorándose todos los



**Figura 1.** Características y medidas del laberinto en T utilizado para realizar el test de conducta a las ratas hijas a los 65 días de vida.

sinaptosomas que aparecían completos. El área de los sinaptosomas se calculó mediante el producto de su diámetro mayor por el perpendicular a él.

De animales recién nacidos se procesaron 9 grupos (de tres cerebros cada uno) escogidos aleatoriamente, pero perteneciente cada grupo de tres a la misma camada (3 grupos de cerebros eran de camadas del grupo CONTR, 3 del grupo EXPER y 3 del VIL-EXPER). A los 35 y 65 días de vida el cerebro de cada animal (2 en el grupo CONTR, 2 en el grupo EXPER y 2 en el VIL-EXPER, en cada edad) se procesó individualmente. Un mismo número de muestras de cada grupo se procesó para microscopía electrónica convencional (JEOL 100S).

Para valorar la microcefalia se calculó el porcentaje del peso del cerebro y cerebelo (conjuntamente, denominado como peso del encéfalo) sobre el peso corporal.

Se practicó test de conducta a todas las ratas crías supervivientes a los 65 días de vida. Se utilizó el clásico laberinto en T de madera (Fig. 1), pero relleno de agua como propone Polidora para provocar la huida<sup>(25,26)</sup>. Se rellena de agua hasta 25 cm de altura, y se coloca una rampa de salida en el brazo corto izquierdo de la T. El test se realizó a los 65 días de edad, y los dos días anteriores todos los animales se sometieron a un entrenamiento cada día de lo que sería la prueba definitiva. Esta se practicó con agua a 20°C. Se depositaba al animal en la base de la T, y se medía el tiempo (segundos) que tardaba en incorporarse a la rampa de salida, así como el número de errores cometidos antes de llegar a la salida (optar por el brazo erróneo, girar sobre sí mismo, o intentar trepar la pared lisa en cualquier punto del laberinto).

Para cada variable cuantitativa se calcularon las medidas de tendencia central y de dispersión. Los test estadísticos aplicados según cumplieran o no las condiciones de aplicación fueron los siguientes: Chi cuadrado, t de Student, ANOVA, U de Mann-Whitney, T de Wilcoxon y coeficiente de correlación de Spearman.

Tabla I Valores medios de las cifras de Phe, tirosina, valina, isoleucina y leucina, obtenidos durante la gestación, en el conjunto de las ratas madres de cada uno de los tres grupos. (Los valores expresan medias  $\pm$  desviación estándar, y las unidades corresponden a nmol/mL)

	CONTR (n = 18)	EXPER (n = 9)	VIL-EXPER (n = 9)
Fenilalanina	64 $\pm$ 16	1.338 $\pm$ 178	1.480 $\pm$ 213
Tirosina	71 $\pm$ 27	103 $\pm$ 29	123 $\pm$ 21
Valina	207 $\pm$ 44	167 $\pm$ 24	233 $\pm$ 88
Isoleucina	92 $\pm$ 26	84 $\pm$ 12	109 $\pm$ 27
Leucina	152 $\pm$ 42	117 $\pm$ 13	148 $\pm$ 33

## Resultados

En las gestaciones, las cifras séricas de aminoácidos (media  $\pm$  sd) en las ratas madres fueron las consignadas en la tabla I. Las diferencias existentes en los valores de aminoácidos de cadena ramificada entre ambos grupos experimentales fueron estadísticamente significativas (U de Mann-Withney;  $p = 0,0152$ ,  $p = 0,0118$  y  $p = 0,038$ , respectivamente, para valina, leucina e isoleucina), con valores mayores en el grupo VIL-EXPER.

En conjunto, el número de crías en el grupo CONTR fue de 167, mientras que entre ambos grupos experimentales fue de 120 (57 en el EXPER y 63 en el VIL-EXPER). La paridad fue significativamente menor ( $p = 0,0074$ , T de Wilcoxon) en el grupo EXPER respecto al CONTR. El número de mortinatos fue significativamente mayor en el grupo EXPER (9 casos) que en el CONTR (1 caso), ( $p = 0,0394$ , T de Wilcoxon). En el grupo VIL-EXPER hubo igual número de mortinatos (3 casos) que en sus controles. La diferencia de paridad entre los grupos CONTR y VIL-EXPER no fue significativa ( $p = 0,1089$ , T de Wilcoxon).

El peso (m  $\pm$  sd) de las crías recién nacidas fue significativamente diferente al comparar los tres grupos entre sí: 5,42  $\pm$  0,66 g en el CONTR, 4,54  $\pm$  0,45 g en el EXPER y 4,98  $\pm$  0,83 en el VIL-EXPER ( $p = 0,0001$ , ANOVA). Al comparar los grupos experimentales entre sí, la diferencia se mostró significativa ( $p = 0,009$ , t-test).

En las ratas recién nacidas sacrificadas el peso del encéfalo en términos absolutos es significativamente menor en el conjunto de ambos grupos experimentales con respecto al control ( $p = 0,0004$ , t-test), pero no sucede lo mismo si lo que comparamos son los porcentajes del peso del encéfalo sobre el peso corporal total, no observándose entonces diferencias. A los 35 días de vida dicho porcentaje sí que difiere de forma significativa, al comparar el conjunto de experimentales con el control (1,44  $\pm$  0,34% vs 1,89  $\pm$  0,36%;  $p = 0,0003$ , t-test). A los 65 días de vida también se obtuvieron diferencias significativas al hacer el cálculo separado por sexos (a esta edad, el peso corporal en las ratas macho de la especie Wistar es significativa-

Tabla II Principales resultados obtenidos en el estudio de sinaptosomas en ratas recién nacidas y de 35 días de vida en el grupo control, en comparación con el conjunto de ambos experimentales (entre paréntesis se ofrecen también los datos para cada grupo experimental por separado)

Ratas recién nacidas	CONTR	EXPER + VIL-EXPER (EXPER; VIL-EXPER)	p
Número de sinaptosomas estudiados	52	74 (42; 32)	-
% vesiculares y mixtos	52,9%	50,8% (47,6%; 50%)	NS
Superficie (nm <sup>2</sup> ) (m $\pm$ sd)	365 $\pm$ 240	518 $\pm$ 379 (508 $\pm$ 360; 531 $\pm$ 409)**	0,0081*
Mitocondrias por sinaptosoma (m $\pm$ sd)	0,9 $\pm$ 0,8	1,6 $\pm$ 1,9 (1,8 $\pm$ 2,5; 1,4 $\pm$ 1,0)**	0,024*
Ratas de 35 días de vida	CONTR	EXPER + VIL-EXPER (EXPER; VIL-EXPER)	p
Número de sinaptosomas estudiados	48	47 (33; 14)	-
% vesiculares y mixtos	97,9%	91,5% (87,9%; 100%)	NS
Superficie (nm <sup>2</sup> ) (m $\pm$ sd)	149 $\pm$ 88	210 $\pm$ 117 (218 $\pm$ 125; 181 $\pm$ 97)**	0,0028*
Mitocondrias por sinaptosoma (m $\pm$ sd)	0,8 $\pm$ 0,9	1 $\pm$ 1 (0,9 $\pm$ 1,0; 1,2 $\pm$ 0,8)**	NS*

\*: U de Man-Withney; \*\*: Diferencia no significativa entre EXPER y VIL-EXPER, U de Mann-Withney; NS: No significativa, Chi cuadrado.

mente mayor) confirmándose la existencia de una menor proporción del peso del encéfalo sobre el corporal en los animales provenientes de madres de ambos grupos experimentales, al compararlos con los controles ( $p = 0,0011$  en machos y  $p = 0,0001$  en hembras; U de Mann-Withney). Son datos, por tanto, que sugieren la existencia de microcefalia en las crías de ambos grupos experimentales. Tanto en el nacimiento como a los 35 y 65 días de vida, dicho porcentaje fue algo mayor en el grupo VIL-EXPER que en el EXPER, pero sin significación estadística de la diferencia entre ellos.

Hay que hacer constar asimismo, que en las ratas recién nacidas de ambos grupos experimentales existe una correlación prácticamente significativa ( $Z = -1,955$ ,  $p = 0,0506$ ; coeficiente de correlación de Spearman) entre las cifras de Phe materna y el porcentaje peso encéfalo/peso corporal (en el sentido de que a mayor cifra de Phe menor era dicho porcentaje).

El estudio de sinaptosomas en las ratas recién nacidas reveló un mayor número de estas estructuras por preparación en el grupo CONTR, y además con un contenido más frecuentemente vesicular o mixto (se consideró mixto a aquel sinapto-

soma que aun siendo predominantemente granular, reticular o vacuolar, contenía algunas vesículas), lo que puede considerarse como signo de mayor madurez. Por el contrario, el área de los sinaptosomas a esta edad fue significativamente mayor en los de ambos grupos experimentales en conjunto y en comparación con los de los controles (Tabla II). El número de mitocondrias por sinaptosoma fue también significativamente mayor en ambos grupos experimentales con respecto al control. Entre ambos grupos experimentales no se apreciaron a esta edad diferencias, ni entre el número de sinaptosomas, ni en cuanto a sus áreas, ni en cuanto al número de mitocondrias por sinaptosoma.

Los estudios practicados a este nivel a los 35 (Fig. 2) y 65 días de vida dieron resultados similares, por lo que se exponen solamente los obtenidos a los 35 días de vida (Tabla II). A esta edad también se constata un mayor número de sinaptosomas por preparación en el grupo CONTR. Mayoritariamente eran sinaptosomas de contenido vesicular en los tres grupos, aunque en el grupo CONTR parecía existir una densidad mayor de vesículas por sinaptosoma. El área sinaptosomal media fue también significativamente mayor al comparar el conjunto de los experimentales con respecto al control, mientras que el número de mitocondrias también es más elevado pero sin significación estadística. No se constataron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales al comparar estos parámetros.

El número de complejos de unión sináptica observados fue similar en ambos grupos y siempre más frecuentes a los 35 y 65 días de vida en todos los grupos.

Los hallazgos en la microscopía electrónica convencional no revelan diferencias en los cerebros de ratas recién nacidas, pero en las de 35 y 65 días (adultas) la mielinización es más escasa, y la organización de sinapsis más anárquica en los cerebros de las ratas de ambos grupos experimentales.

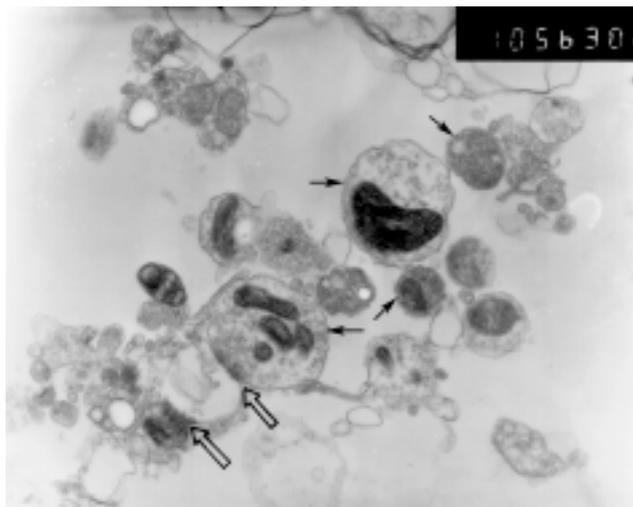
Los resultados del test de laberinto de agua en T quedan resumidos en la tabla III. Las ratas hijas de ambos grupos experimentales cometen significativamente más errores y necesitan mayor tiempo que las del CONTR para salir del laberinto.

## Comentarios

Hemos pretendido conocer el efecto que la hiperfenilalaninemia materna tiene sobre los terminales nerviosos en el cerebro de las ratas hijas de madres con PKU experimental, así como sus implicaciones en el comportamiento, estimulados por el escaso número de investigaciones que existen al respecto<sup>(21,27)</sup>.

Pese a las reservas de algunos autores<sup>(28-30)</sup> con respecto a la observación de sinaptosomas en ratas recién nacidas, nosotros creemos que lo observado tras aplicar nuestra técnica de partición de fases<sup>(24)</sup> son estructuras de forma y contenido concordante con el concepto de sinaptosoma, incluso a los 0 días de vida.

Aunque la interpretación de los resultados del estudio patológico es difícil, ya que trabajamos con una unidad (el sinaptosoma), neuroquímica más que morfológica<sup>(31)</sup>, podemos plantear ciertas hipótesis. Así, la presencia en ratas recién nacidas expuestas a hiperfenilalaninemia materna durante el embara-



**Figura 2.** Micrografía (10.000 aumentos), tomada tras aplicar la técnica de partición de fases a cerebros de ratas del grupo control de 35 días de vida. Las flechas oscuras señalan los sinaptosomas. Las flechas abiertas localizan dos engrosamientos sinápticos.

zo, de una menor densidad de estructuras sinaptosomales, con un tamaño significativamente mayor, con ciertos signos indirectos de mayor actividad celular (mayor número de mitocondrias), y con un contenido menor en vesículas, son datos que hacen suponer que en los cerebros de las ratas crías de ambos grupos experimentales se ha producido un fenómeno disruptivo en el proceso de maduración y desarrollo, considerando que el sinaptosoma al madurar se hace de tamaño más reducido, de contenido claramente vesicular y con menor número de mitocondrias<sup>(28)</sup>.

Para comprobar si los hallazgos detectados en las ratas recién nacidas eran reversibles o no (pues podía deberse a un retraso en el crecimiento intraútero), se practicó el mismo análisis morfológico a los 35 y 65 días de vida. El dato más llamativo es que a los 35 días de vida (rata ya adulta) el área de los sinaptosomas continúa siendo significativamente mayor en ambos grupos experimentales respecto al control, mientras que la proporción de sinaptosomas de contenido vesicular es mayor en este último. El número de mitocondrias no difiere de forma estadísticamente significativa, pero es algo mayor en los grupos experimentales.

Estas observaciones no difieren entre ambos grupos experimentales, por lo que parece que los suplementos de valina, isoleucina y leucina no tienen efecto beneficioso.

Nuestros resultados serían concordantes con los de Niham<sup>(21)</sup>, que demuestra una disminución de los terminales sinápticos a expensas de los más pequeños, en ratas expuestas en su caso a hiperfenilalaninemia posnatal. También como Okano<sup>(11)</sup>, encontramos alteraciones en la mielinización en el sistema nervioso central de las ratas hijas de madres sometidas a hiperfenilalaninemia experimental, en la observación con microscopio

Tabla III Resultados obtenidos en el test del laberinto de agua en T practicado a los 65 días de vida a las ratas hijas supervivientes. El valor de p se refiere al obtenido al comparar el grupo CONTR con el conjunto de ambos experimentales. No obstante, entre paréntesis se ofrecen también los datos para cada grupo experimental por separado

	CONTR	EXPER + VIL-EXPER (EXPER; VIL-EXPER)	p
n	54	69 (29; 40)	-
Número de errores (m ± sd)	1,7 ± 1,3	2,2 ± 1,4 (2,5 ± 1,5; 2,1 ± 1,3)**	0,0167*
Tiempo (sg) empleado (m ± sd)	11,2 ± 6,4	13,7 ± 8,4 (14,4 ± 9,4; 13,2 ± 7,6)**	0,059*

\*: U de Man-Withney; \*\*: Diferencia no significativa entre EXPER y VIL-EXPER, U de Mann-Withney.

pía electrónica a los 35 y 65 días de edad.

Asumimos la posible toxicidad del inhibidor empleado (p-clorofenilalanina), pero las dosis utilizadas, propuestas por Greengard<sup>(22)</sup>, podrían tener un efecto de retraso ponderal que sería reversible tras el nacimiento, mientras que la microcefalia y los hallazgos histológicos en los animales de los grupos experimentales de nuestro estudio, permanecen a los 35 y 65 días de vida.

En relación con la microcefalia, pensamos que el porcentaje peso encéfalo/peso total corporal utilizado es demostrativo en la rata adulta, pero poco fiable en la recién nacida (en la que no obtuvimos diferencias significativas), ya que el menor peso corporal en ambos grupos experimentales a esta edad, presupone una mayor desproporción a favor del encéfalo (dato incuestionable desde el punto de vista del desarrollo embriológico).

El estudio de conducta practicado apoya los hallazgos histológicos, ya que las ratas hijas de ambos grupos experimentales a los 65 días de vida son significativamente menos hábiles en el desarrollo del test que las del grupo control.

Importante parece también la conclusión de que el uso de suplementos de valina, leucina e isoleucina no ha mostrado tener efectos beneficiosos sobre el desarrollo de los terminales sinápticos ni sobre el comportamiento en el test de conducta. Además, la microcefalia está también presente a los 35 y 65 días de vida en las ratas hijas del grupo de madres que los recibieron. Su uso parece mejorar la paridad y disminuir el número de mortinatos, pero se trata de ratas hijas afectas, por lo que su utilización en estas situaciones podría ser, incluso, contraproducente, ya que mejorarían el número de crías, por camada, pero se trata de crías enfermas.

La incidencia de las hiperfenilalaninemias en nuestro medio

sigue estable<sup>(32)</sup>, por lo que debemos seguir estudiando estos temas. Nuevas investigaciones deben de ser emprendidas con el fin de profundizar en los hallazgos observados a nivel de terminales sinápticos, tanto en hiperfenilalaninemia materna como en PKU. Las alteraciones bioquímicas y morfológicas detectadas a este nivel pueden sugerir nuevos mecanismos lesionales que ayuden a comprender la fisiopatología de la deficiencia mental en éstas y otras entidades.

## Agradecimiento

La realización de este trabajo fue becada por el Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (expediente número 91/1025).

## Bibliografía

- DENT C. Discussion of Armstrong: relation of biochemical abnormality to development of mental defect in phenylketonuria. En: Phenylketonuria in etiological factors in mental retardation. Report of 23rd Ross Conf. Columbus, 1956.
- Denniston JC. Children of mothers with penylketonuria. *J Pediatr* 1963; **63**:461-462.
- Mabry CC, Denniston JC, Goldwell JG. Mental retardation in children of phenylketonuric mothers. *N Engl J Med* 1966; **275**:1331-1336.
- Lenke RR, Levy HL. Maternal phenylketonuria and hyperphenylalaninemia. *N Engl J Med* 1980; **303**:1202-1208.
- Lipson A, Beuhler B, Bartley J y cols. Maternal hyperphenylalaninemia fetal effects. *J Pediatr* 1984; **104**:216-220.
- Muller WD, Haidvogel M, Scheibenreiter S. Phenylalanininfetopathie bei zwillinger einer nicht diagnosizierten phenylketonurischen mutter. *Klin Padiatr* 1979; **191**:609-612.
- Butcher RE. Learning impairment associated with maternal phenylketonuria in rats. *Nature* 1970; **226**:555-556.
- Copenhaver JH, Vacanti JP, Carver MJ. Experimental maternal hyperphenylalaninemia: disaggregation of fetal brain ribosomes. *J Neurochem* 1973; **21**:273-280.
- Berry HK, Butcher RE, Kazmaier KJ, Poncet IB. Biochemical effects of induced phenylketonuria in rats. *Biol Neonate* 1975; **26**:88-101.
- Brunner RL, Vorhees CV, McLeans MS y cols. Beneficial effect of isoleucine on fetal brain development in induced phenylketonuria. *Brain Res* 1978; **154**:191-195.
- Okano Y, Chow IZ, Isshiki G y cols. Effects of phenylalanine loading on protein synthesis in the fetal heart and brain of rat: an experimental approach to maternal phenylketonuria. *J Inher Metab Dis* 1986; **9**:15-24.
- Brass CA, Isaacs CE, McChesney R, Greengard O. The effects of hyperphenylalaninemia on fetal development: a new animal model of maternal phenylketonuria. *Pediatr Res* 1982; **16**:388-394.
- Loo YH, Rabe A, Potempska A y cols. Experimental maternal phenylketonuria: An examination of two animal models. *Dev Neurosci* 1983/84; **6**:227-234.
- Sadava D, Sutcliffe D. The effects of maternal hyperphenylalaninemia on learning in mature rats. *Life Sci* 1988; **43**:1119-1123.
- Vorhees CV, Berry HK. Branched chain amino acids improve complex maze learning in rat offspring prenatally exposed to hyperphenylalaninemia: Implications for maternal phenylketonuria. *Pediatr Res* 1989; **25**:568-572.
- Pueschel SM, Boylan JM, Jackson BT, Piasecki GJ. A study of pla-

- central transfer mechanisms in nonhuman primates using [<sup>14</sup>C]Phenylalanine. *Obstet Gynecol* 1982; **59**:182-188.
- 17 Levy HL, Lenke RR, Koch R. Lack of fetal effect on blood phenylalanine concentration in maternal phenylketonuria. *Jour Pediatr* 1984; **104**:245-247.
  - 18 Greengard O, Brass CA. Development changes of cerebral phenylalanine uptake from severely elevated blood levels. *Neurochem Res* 1987; **12**:459-463.
  - 19 McChesney R, Haberman J, Greengard O. Phenylalanine uptake in neonatal and infant rat brain. *Biol Neonate* 1988; **54**:275-284.
  - 20 Loo Y, Hyde K, Lin F, Wisniewski H. Cerebral biochemical abnormalities in experimental maternal phenylketonuria: gangliosides and sialoglycoproteins. *Life Sci* 1985; **37**:2099-2109.
  - 21 Niham MP, Douglas RL. The effect of hyperphenylalaninemia on size and density of synapses in rat neocortex. *Brain Res* 1979; **179**:195-198.
  - 22 Greengard O, Wolfe J. Cerebral serotonin regulation by phenylalanine analogues and during hyperphenylalaninemia. *Biochem Pharmacol* 1987; **36**:965-970.
  - 23 Baba H, Sato S, Inuzuka T, Miyatake T. Developmental changes of myelin-associated glycoprotein in rat brain: Study on experimental hyperphenylalaninemia. *Neurochem Res* 1987; **12**:459-463.
  - 24 Enríquez JA, Sánchez-Nieto J, Muiño-Blanco MT y cols. Rat brain synaptosomes prepared by phase partition. *J Neurochem* 1990; **55**:1841-1849.
  - 25 Bachlin H. Comportamiento y aprendizaje. Barcelona: Ediciones Omega S.A. 1982; 413-439.
  - 26 Polidora VJ, Boggs DE, Waisman HA. A behavioral deficit associated with phenylketonuria in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1963; **113**:817-824.
  - 27 Herrero E, Aragón MC, Giménez C, Valdivieso F. Inhibition by L-phenylalanine of tryptophan transport by synaptosomal plasma membrane vesicles: Implications in the pathogenesis of phenylketonuria. *J Inher Metab Disease* 1983; **6**:32-35.
  - 28 Gonatas NK, Autillo-Gambetti L, Gambetti P, Shafer B. Morphological and biochemical changes in rat synaptosome fractions during neonatal development. *J Cell Biol* 1971; **51**:484-498.
  - 29 Pfenninger KH, Leland E, Johnson MP y cols. Nerve growth cones isolated from fetal rat brain: Subcellular fractionation and characterization. *Cell* 1983; **35**:573-584.
  - 30 Gordon-Weeks PR, Lockerbie RO. Isolation and partial characterization of neuronal growth cones from neonatal rat forebrain. *Neurosci* 1984; **13**:119-136.
  - 31 Bradford HF. Fundamentos de Neuroquímica. Barcelona: Ed. Labor S.A. 1988.
  - 32 Baldellou A, Salazar MI, García Vera C, Gascón A, Gracia J, Tamparillas M. Critical evaluation of a phenylketonuria newborn screening through analysis of retested cases. *Dev Brain Dysfunct* 1993; **6**:188-192.