

Microdiálisis subcutánea: una técnica simple para monitorizar el ambiente bioquímico extracelular. Combinación con electroforesis capilar y detección mediante fluorescencia inducida por láser.

Ximena Páez¹, Carmen Amalia Mazzei-Dávila² y Luis Hernández¹

¹Laboratorio de Fisiología de la Conducta. ²Departamento de Pediatría, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

Palabras clave: Aminoácidos neutros, cromatografía micelar electrocinética, glucosa farmacocinética, pacientes ambulatorios y hospitalizados, ratones

Resumen. La microdiálisis es una técnica que permite seguir los cambios de sustancias endógenas o exógenas presentes en cualquier compartimento extracelular. Actualmente tiene muchas aplicaciones tanto experimentales como clínicas. El muestreo en el fluido extracelular subcutáneo es especialmente útil para la evaluación del metabolismo en pacientes en condiciones críticas, estudios farmacocinéticos y monitoreo de glucosa. Presentamos algunos ejemplos de estas aplicaciones, usando una cánula fabricada manualmente con un segmento de tubo de celulosa (200 μm de diámetro externo y poros de 13.000 daltons de peso molecular) ensamblado entre tubos de acero inoxidable (26 ga. de diámetro externo) para ser insertada en el tejido subcutáneo, en pacientes en condiciones críticas o en ratones anestesiados, para analizar patrones de aminoácidos por electroforesis capilar con detección mediante fluorescencia inducida por láser (EC-DFIL). También fue usada ambulatoriamente para medir glucosa en voluntarios. Los resultados muestran que la microdiálisis subcutánea es un método muy simple, no costoso ni agresivo, con ventajas sobre la obtención de muestras de sangre por punción venosa repetida e inclusive sobre microdiálisis endovenosa. Este método, combinado con una técnica analítica apropiada, puede usarse exitosamente en la vigilancia del ambiente químico extracelular en condiciones clínicas o preclínicas muy diferentes.

Subcutaneous microdialysis: simple technique to monitor biochemical extracellular environment. Coupling with capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection.

Invest Clín 2003; 44(3): 227 - 239

Key words: Mice, human, electrokinetic micellar chromatography, neutral amino acids, glucose, pharmacokinetics, ambulatory and critically ill patients.

Abstract. Microdialysis is a simple technique that allows monitoring endogenous or exogenous substances in any extracellular compartment. It has many useful experimental and clinical applications. The sampling of the extracellular fluid of the subcutaneous compartment is especially useful for metabolic evaluation in critically ill patients, pharmacokinetic studies and blood glucose monitoring. We built a subcutaneous microdialysis probe, with a cellulose hollow fiber (13,000 molecular weight cut off, 200 μm outside diameter) glued to stainless steel tubing (26 ga. outside diameter). It was implanted in the subcutaneous tissue of a critically ill child or anesthetized mice to obtain amino acids patterns by means of capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection (CE-LIFD). The probe was also implanted in ambulatory volunteers to monitor glucose. The results confirmed that subcutaneous microdialysis is a very simple, inexpensive and not aggressive method with advantages over repeated venipuncture sampling and endovenous microdialysis sampling. The present report shows that subcutaneous microdialysis with the proper analytical technique can be used to monitor the chemical composition of the interstitial compartment in very different preclinical or clinical conditions.

Recibido: 14-10-2002. Aceptado: 05-06-2003.

INTRODUCCIÓN

La microdiálisis consiste en el intercambio de moléculas a través de una membrana porosa, siguiendo gradientes de concentración, lo que permite extraer o introducir sustancias en matrices químicas complejas. Esta técnica ha sido de gran utilidad en el control o vigilancia de compuestos libres, de bajo peso molecular, presentes en el medio extracelular. Se puede realizar prácticamente en cualquier tejido o fluido biológico. Actualmente la microdiálisis tiene una gran aplicación tanto en investigación básica en animales de experimentación así como en investiga-

ción, diagnóstico y terapéutica en humanos (1-5). Esto se evidencia en el gran número de publicaciones sobre sus aplicaciones en los últimos años (5). La microdiálisis inicialmente se empleó en estudios neuroquímicos en el cerebro de animales (6). Posteriormente, su aplicación en farmacocinética ha sido de gran utilidad. Se ha analizado drogas de muy diferente naturaleza con el muestreo simultáneo de uno o más compartimientos extracelulares: músculo, sangre, hígado, o tejido subcutáneo, tanto en animales como en humanos (7-13). La microdiálisis también ha sido usada en el hígado para monitorear el metabolismo después de transplante hepático

(14), en mama para estudiar cambios metabólicos durante el ciclo menstrual (15), o en el tejido adiposo subcutáneo para vigilar cambios metabólicos durante la anestesia (16).

El uso de la microdiálisis en la clínica ha aumentado en los últimos años, especialmente en pacientes en estado crítico, por ser una técnica prácticamente inocua. La microdiálisis cerebral se ha empleado para evaluar el metabolismo y los neurotransmisores en el medio extracelular cerebral, en pacientes que padecen trauma encefálico, durante la neurocirugía, en la enfermedad cerebro vascular y en otras patologías neurológicas. Los cambios encontrados en estas diversas condiciones han permitido identificar marcadores del estado energético de las células, o de excitotoxicidad, así como identificar cambios regionales en neurotransmisores (1, 4, 17-21).

En los pacientes gravemente enfermos, interesa conocer los cambios químicos rápidos que pueden ocurrir en el medio extracelular en diferentes tejidos y que son causados por drogas o por determinada condición fisiopatológica, a fin de tomar medidas terapéuticas precoces y apropiadas. El *monitoreo* o *vigilancia* continuos con microdiálisis permitiría detectar por ejemplo, sustancias endógenas que podrían ser indicadores del curso de una enfermedad o condición particular, o los niveles tóxicos de sustancias endógenas o drogas. Esto se puede hacer con microdiálisis endovenosa *in vivo* (10, 22, 23), pero se necesita tomar y mantener una vía venosa, o si se hace microdiálisis *in vitro* en muestras de plasma, se necesita hacer extracciones repetidas de sangre por punción de una vena o de un catéter endovenoso y luego dializar el plasma (10).

Una forma más sencilla y más precisa de analizar el medio ambiente extracelular con microdiálisis es sondear los tejidos periféricos como el tejido celular subcutáneo (11). Este compartimento es de fácil acceso y las complicaciones o riesgos para el pa-

ciente son menores. La microdiálisis subcutánea desde sus inicios se ha aplicado al estudio de los cambios metabólicos en el intersticio como la evaluación del metabolismo de la glucosa y de los lípidos (24, 25). Ha sido muy útil en estudios metabólicos de glucosa, lactato y glutamato en pacientes neurológicos en estado crítico, y ha proporcionado datos que pueden contribuir a la interpretación de lo que está ocurriendo en el cerebro (26). También se ha usado para monitorizar el metabolismo en los bordes de piel para dar información sobre el futuro de la viabilidad de un injerto (27), el metabolismo subcutáneo en pacientes con citopatía mitocondrial (28), durante la anestesia (16), y el metabolismo de aminoácidos en recién nacidos (29). La información del metabolismo del medio intersticial puede mostrar cambios en algunos indicadores aun antes que en la sangre, o de que ocurran manifestaciones clínicas lo que da ventaja para una rápida intervención terapéutica (30). Otra de las importantes aplicaciones de la microdiálisis cutánea es en estudios farmacocinéticos, en los que se puede medir directamente las concentraciones de la droga en el tejido. Estos estudios antes estaban limitados a las medidas de concentración de la droga en el plasma o en la sangre. Se han estudiado diversas drogas como por ejemplo, antibióticos, antiepilépticos (11) antiinflamatorios (31) y antineoplásicos como el 5-fluoracilo (32). En pacientes en estado crítico conocer la farmacocinética de antibióticos u otros medicamentos puede dar información mejor que la del plasma, ya que el intersticio es el sitio donde la mayoría de los medicamentos actúa (11, 33). Los datos de concentraciones de drogas en plasma pueden hacer que el médico use erróneamente una dosis potencialmente inferior a la necesaria.

El desarrollo de esta técnica ha significado el progreso en una de sus aplicaciones más exitosas: el *monitoreo* continuo de gluco-

sa en pacientes graves y ambulantes, sin tener que hacer extracción repetida de sangre. La microdiálisis subcutánea permite tener una mejor evaluación de cambios extremos en la glucosa, que pueden ir desde detección de hipoglicemia hasta decidir administrar insulina (34). Es especialmente útil si se trata de *monitoreo* de glucosa a largo plazo (días) en recién nacidos, pues se evita la pérdida de sangre y el estrés de la extracción de sangre en estos pequeños pacientes (35). Actualmente, la combinación de microdiálisis subcutánea ultralenta con nanosensores de glucosa se usa en la terapia intensiva de diabéticos (36). La microdiálisis subcutánea también ha sido usada en estudios del óxido nítrico y de su papel en la vasodilatación e inflamación del tejido subcutáneo (37, 38) así como en la evaluación de la administración tópica o sistémica de drogas (39).

Las muestras de microdiálisis en general, son de muy pequeño volumen y con analitos en bajas concentraciones, lo que hace necesario disponer de técnicas analíticas muy sensibles tales como la electroforesis capilar (EC). Esta es una técnica analítica que permite separar, identificar y cuantificar sustancias en pequeños volúmenes y esto permite aumentar la resolución temporal de la microdiálisis (32, 40-43). De modo que, la combinación de microdiálisis subcutánea y EC-DFIL resulta muy conveniente para el análisis en volúmenes de muy pocos microlitros y aun nanolitros lo cual no es posible con otras técnicas analíticas como la cromatografía líquida de alta presión (44).

En el presente trabajo mostramos algunos ejemplos de las aplicaciones de una cánula de microdiálisis subcutánea de muy simple diseño y fácil fabricación que puede usarse tanto en roedores y como en humanos. Usamos microdiálisis subcutánea en una vigilancia continua y simultánea de varios aminoácidos en un paciente pediátrico en coma, y en ratones anestesiados. El análisis de las muestras se hizo con EC-DFIL.

También empleamos nuestra cánula en jóvenes voluntarios sanos durante una prueba de carga oral de glucosa y comparamos los datos de diálisis con los de sangre en los mismos individuos. Los resultados confirmaron que la microdiálisis subcutánea es una técnica muy sencilla, sin riesgos para el paciente, más conveniente que la microdiálisis en sangre *in vivo* o *in vitro*. La combinación con EC-DFIL también demostró ser muy conveniente especialmente cuando se trata de estudios en pacientes pediátricos o en animales muy pequeños donde es ventajoso el uso de pequeños volúmenes de muestra.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cánula de microdiálisis subcutánea

En la Fig. 1 se muestra el diagrama de la cánula para microdiálisis subcutánea. Estas cánulas fueron fabricadas manualmente con un segmento de 15 mm de fibra hueca de celulosa con poros permeables a moléculas de PM inferior a 13.000 daltons insertado entre 2 trozos de tubo de acero inoxidable 26 ga de 2 cm de largo. Para la adhesión de las uniones se usó cemento *epoxy*. El extremo libre en bisel de uno de los segmentos de acero inoxidable sirvió para punzar la piel e introducir la cánula.

Sujetos y diálisis

1. En un niño politraumatizado en coma, hospitalizado en la unidad de cuidados intensivos pediátricos del Hospital Universitario de los Andes, luego de obtener la autorización de los médicos tratantes y el representante legal del paciente, previa información del procedimiento, bajo asepsia y antisepsia se insertó una cánula en la piel periumbilical, de tal forma que el segmento de diálisis quedó implantado en el tejido subcutáneo como se muestra en la Fig. 1. La cánula fue co-

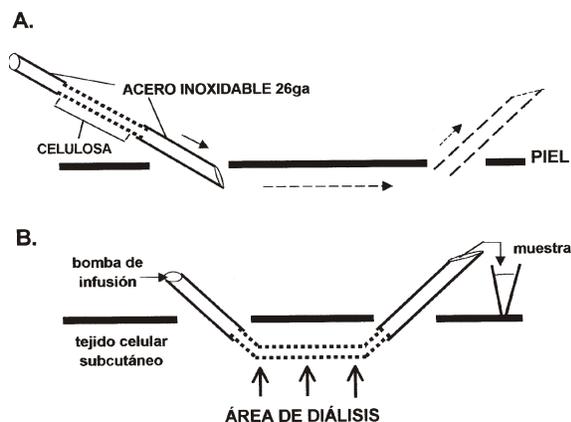


Fig. 1. Microdiálisis subcutánea. A. Diseño e implantación de la cánula. B. Diálisis a través del tubo de celulosa colocado en el tejido subcutáneo. La bomba de infusión se conecta a la entrada de la cánula y del extremo de salida se recoge el dializado.

nectada a una bomba de perfusión y se perfundió con NaCl 0,9% a 1 mL/min. Se hizo una diálisis continua recogiendo muestras de 60 mL/60 min en 49 horas (49 muestras en total) durante las cuales el estado de conciencia del paciente cambió hacia la mejoría (de 6 a 10 en la escala de Glasgow). Las muestras se guardaron a -80°C hasta ser procesadas. El proceso de diálisis no interfirió con el cuidado médico del paciente.

2. A 4 ratones albinos machos adultos, de la línea NMRI, de peso entre 20 a 22 g anestesiados con clorhidrato de ketamina (100 mg/kg) se les implantó una cánula de microdiálisis cutánea en el hemiabdomen izquierdo de modo que el segmento funcional quedó inmerso en el tejido subcutáneo y luego se procedió a perfundir la cánula de la manera descrita en 1. Se tomaron muestras cada 30 minutos durante 2 horas (12 muestras en total). Durante todo el procedimiento de diálisis los animales estuvieron anestesiados. Las muestras

se guardaron a -80°C hasta su procesamiento.

3. En 10 voluntarios sanos en ayunas, de sexo masculino entre 18 y 24 años de edad, luego de explicar el procedimiento y obtener el consentimiento informado por escrito de cada voluntario, bajo condiciones de asepsia y antisepsia se les implantó en la cara anterior del antebrazo derecho una cánula de diálisis subcutánea que se conectó y que fue perfundida de la manera descrita anteriormente. Se tomaron muestras cada 30 minutos. Después de tomar la primera muestra de diálisis se administró por vía oral 75 g glucosa y se tomó una muestra de sangre por venopunción en el brazo izquierdo. Luego cada 30 min. se recogió un dializado y una muestra de sangre heparinizada hasta los 120 min. Las muestras se mantuvieron en hielo hasta ser procesadas el mismo día.
4. Para realizar diálisis *in vitro* de plasma humano obtenido de sujetos sanos voluntarios, se separó el plasma por centrifugación de muestras heparinizadas de sangre tomada por punción de venas del codo. Se colocó una cánula de diálisis concéntrica (45) con 15 mm de área funcional (celulosa) dentro de un tubo con 500 ml de plasma. La celulosa empleada y las condiciones de diálisis son las mismas que las descritas anteriormente.

Análisis de las muestras

1. Los dializados subcutáneos de niño y de ratón fueron procesados para analizar aminoácidos por EC-DFIL (45, 46). En breve, la técnica analítica consistió en derivatizar las muestras con isotiocianato de fluoresceína para hacerlas fluorescentes. Luego de 18 horas de incubación las muestras fueron analizadas en un equipo de EC con un láser

de argón (*Meridialysis CZE system*) (47). Este sistema permite el análisis en mínimos volúmenes de muestras que se cargan por presión negativa en uno de los extremos del capilar. A las soluciones de corrida usadas se les añadió detergente (lauril sulfato de sodio) para formar micelas a fin de separar aminoácidos neutros que no se resolverían con la EC convencional. Este proceso se conoce como cromatografía electrocinética micelar, y es una variante de la electroforesis capilar (46). Los valores de fluorescencia de cada aminoácido (alturas de picos) obtenidos con EC-DFIL en las muestras del niño fueron convertidos a concentración expresada en micromoles por litro por comparación con los valores de fluorescencia de soluciones de concentración conocida (patrón) para cada aminoácido.

- Los dializados subcutáneos y las muestras de sangre de los voluntarios fueron analizados automáticamente con un analizador de glucosa por el método enzimático convencional. Se calcularon los valores promedios de glucosa en mg% para cada punto de las curvas de glucosa en dializados y de glucosa en plasma. Se hizo el análisis estadístico de las curvas con ANOVA *one way* y el test *pos hoc* de Tukey.

RESULTADOS

La implantación de cánula de diálisis no ocasionó riesgos ni molestias a los sujetos durante ni después de la diálisis. Fue posible dializar continuamente por el tiempo deseado, mientras que existiera aporte continuo de la solución de perfusión. El niño en cuidados intensivos se dializó durante 49 horas continuas sin interferir con los cuidados médicos del paciente. En la Fig. 2 se muestra un patrón típico de sepa-

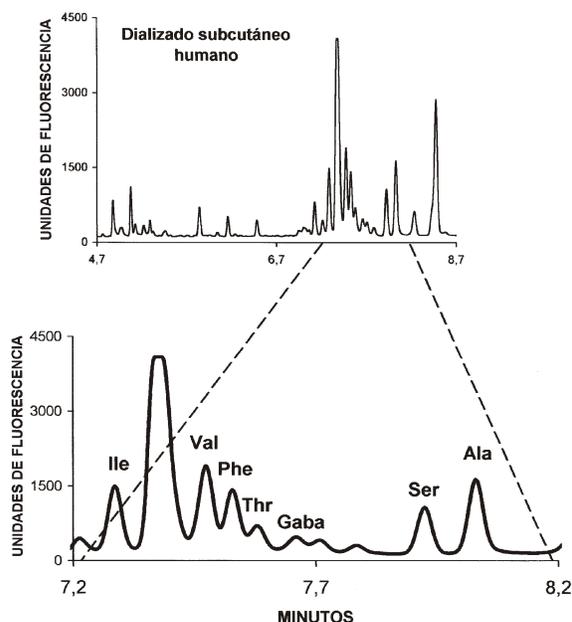


Fig. 2. Patrón de aminoácidos en un dializado subcutáneo humano. Análisis mediante EC-DFIL con una solución *buffer* con detergente que permite separar aminoácidos neutros o apolares. **Arriba:** Electroferograma completo. **Abajo:** Magnificación de un segmento de un minuto del electroferograma que muestra el patrón típico de separación de 7 aminoácidos: isoleucina (Ile), valina (Val), fenilalanina (Phe), treonina (Thr), Gaba, serina (Ser) y alanina (Ala).

ración de los aminoácidos: isoleucina (Ile), valina (Val), fenilalanina (Phe), treonina (Thr), Gaba, alanina (Ala) y serina (Ser). Todos aminoácidos neutros o apolares, excepto la serina (Ser) y presentes en un dializado subcutáneo. Este *monitoreo* permitió además obtener simultáneamente el curso temporal de cambios en los aminoácidos analizados (Fig. 3). En la Fig. 4 se muestran relaciones entre algunos de los aminoácidos analizados. Por ejemplo, la relación Val/Phe se elevó a partir de las 18 horas, incremento que coincidió con la mejoría neurológica del paciente (de 6 a 10 según la escala de

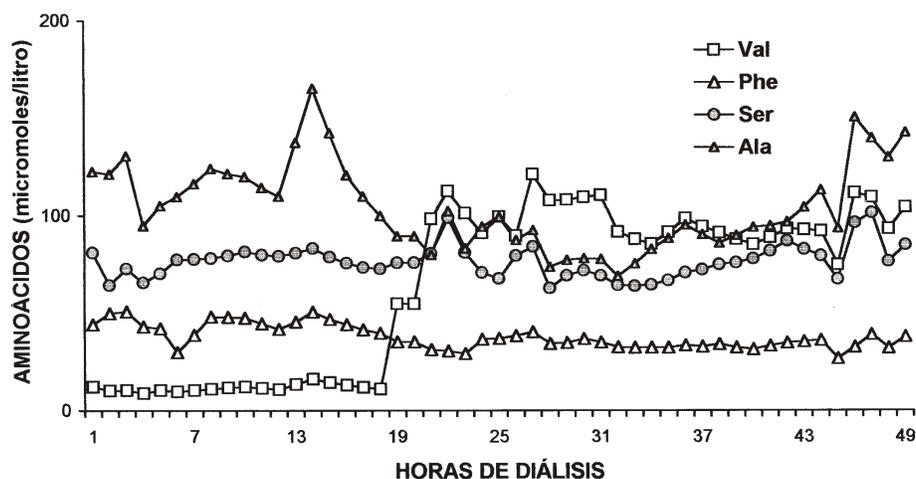


Fig. 3. Control simultáneo de la concentración de cuatro aminoácidos en dializados subcutáneos obtenidos cada hora durante 49 horas de un niño politraumatizado hospitalizado en una unidad de cuidados intensivos.

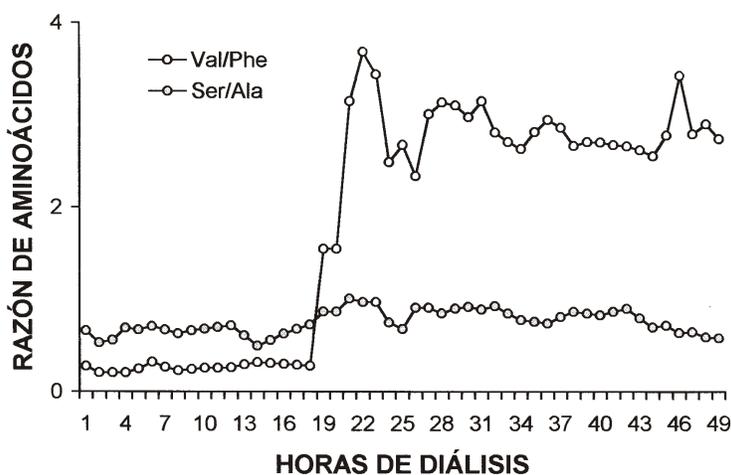


Fig. 4. Razones entre aminoácidos medidos con EC-DFIL en muestras obtenidas durante 49 horas de microdiálisis subcutánea.

Glasgow), mientras la relación Ser/Ala se mantuvo sin cambios. Por otra parte, la diálisis subcutánea en los ratones (Fig. 5 arriba) mostró en los electroferogramas de los mismos aminoácidos, un patrón muy semejante al obtenido en el niño. Además se encontró similitud en estos patrones de dializados subcutáneos con los de dializados de plasma humano obtenidos *in vitro* (Fig. 5 abajo).

La diálisis subcutánea en voluntarios sanos se realizó sin ninguna molestia para

el sujeto y al final, luego de retirar la cánula, fue prácticamente imperceptible el sitio de la diálisis. Fue menos molesta que la diálisis endovenosa, la cual requiere punzar y canular una vena y luego mantener la permeabilidad del catéter endovenoso (guía para la implantación de cánula de diálisis endovenosa), y de la vena (10). En la Fig. 6 se muestran las curvas de respuesta a la carga oral de glucosa en los dializados y en la sangre venosa periférica. En ambas curvas se observó la elevación significativa de

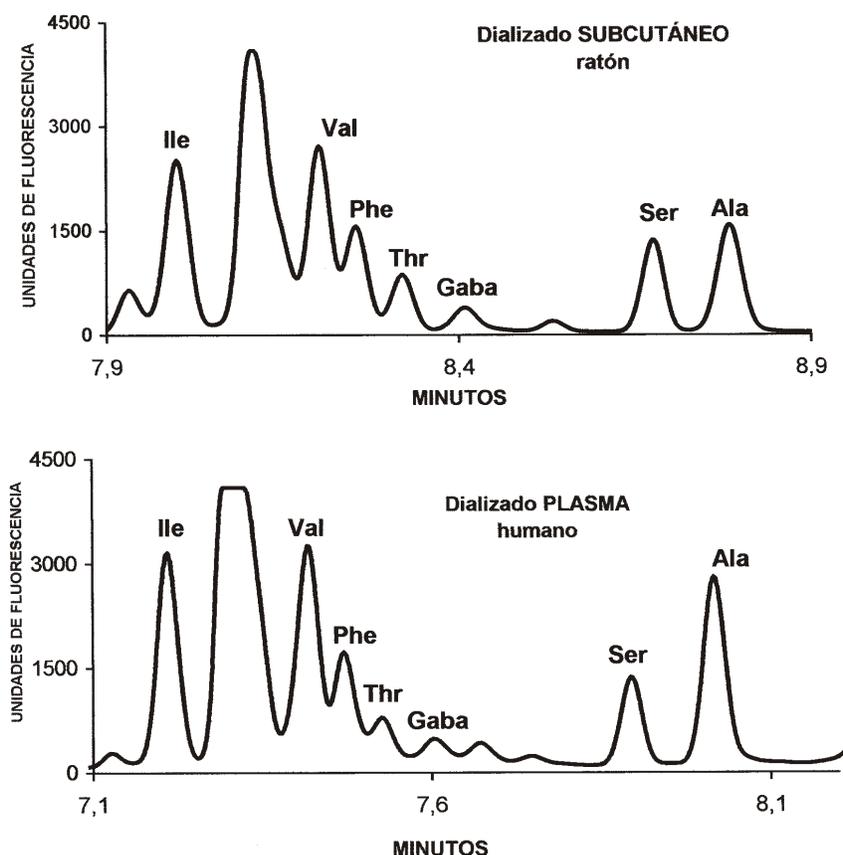


Fig. 5. Patrón de aminoácidos en microdializados analizados con EC-DFIL. **Arriba.** Dializado subcutáneo de ratón anestesiado. **Abajo.** Dializado *in vitro* de plasma humano.

glucosa [$F=4,3$ (4,45) $p < 0,05$] en dializados y [$F=10,6$ (4,45) $p < 0,001$] en plasma. El aumento no fue simultáneo. En la sangre ocurrió a los 30 min y en los dializados a los 60 min, lo que indica las diferencias de distribución en los distintos compartimientos, pues la glucosa una vez absorbida va primero a la sangre y luego pasa a los tejidos (48). Además existe una variación sustancial interindividual de recuperación de glucosa que hace difícil precisar exactamente el desfase temporal fisiológico entre ambos compartimientos (49). La recuperación de glucosa en el dializado subcutáneo, con las cánulas y flujo empleados, fue aproximadamente de un 30% de lo obtenido en sangre. Los datos de glucosa en dializa-

dos se presentaron corregidos por el porcentaje de recuperación.

DISCUSIÓN

La evaluación del ambiente bioquímico extracelular es de gran interés no sólo en la investigación básica sino en la clínica, lo que se evidencia en el creciente número de publicaciones sobre aplicaciones clínicas de la microdiálisis. Müller menciona que hay más de siete mil artículos sobre microdiálisis y más de mil artículos en humanos (5). Nosotros encontramos alrededor de 100 artículos en los últimos 4 años sólo en microdiálisis subcutánea en humanos. El uso de diálisis simultánea en tejidos periféricos ha tenido

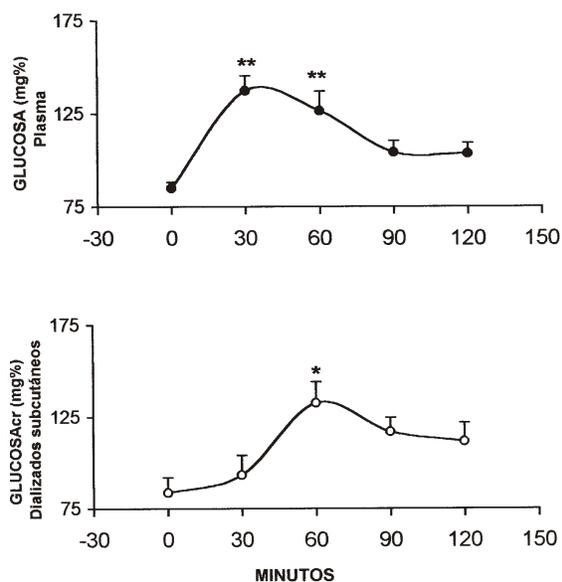


Fig. 6. Glucosa en voluntarios sanos (n=10) a los 0, 30, 60, 90 y 120 min luego de una carga oral de 75 g de glucosa A. Curva de glucosa plasmática. B. Curva de glucosa en dializados subcutáneos. **p < 0,001 *p < 0,05.

gran aplicación en estudios farmacocinéticos pues la concentración de las drogas en estos compartimientos periféricos es lo que determina la efectividad de la terapéutica, más que la concentración en el plasma. Antes de la introducción de la microdiálisis, los estudios farmacocinéticos estaban limitados a mediciones de drogas en plasma por ser éste el único compartimento donde se podían medir fácilmente las drogas (11). Pero con la microdiálisis esto ha cambiado. La microdiálisis endovenosa se ha usado con frecuencia especialmente en los pacientes críticamente enfermos para *monitorizar* cambios en sustancias exógenas y endógenas, y tomar medidas correctivas rápidas durante el *monitoreo* (50). Esta microdiálisis requiere canular una vena y mantener la permeabilidad de la vía. En algunos casos esto no es fácil, porque son niños muy pequeños recién nacidos o prematuros en los cuales colocar una cánula más, puede ser excesiva-

mente traumático. Técnicamente es más difícil hacer coincidir los tamaños adecuados de catéteres endovenosos (guías) y la cánula de diálisis que tiene que ir adentro, aunado a que puede haber más riesgo de infección cuando se usa la vía venosa. Además, como mencionamos antes, las mediciones en plasma no son necesariamente las mejores para indicar las concentraciones efectivas de una droga en los tejidos.

Por otra parte tenemos que el sondeo subcutáneo por microdiálisis es más simple, las cánulas fáciles de fabricar e implantar, el procedimiento poco o nada agresivo sin riesgos secundarios, fácil de mantener continuamente por horas o días, y como en cualquier otra microdiálisis, se puede analizar cualquier sustancia presente en el dializado dependiendo del tamaño de los poros de la membrana de diálisis y de la técnica analítica que se disponga. Hacer microdiálisis subcutánea es más conveniente que tomar muestras repetidas de sangre, especialmente si el individuo tiene un volumen de sangre bajo como en un prematuro. Más aún, la microdiálisis subcutánea causa pocas molestias al paciente y permite examinar las concentraciones de los analitos de interés, drogas o compuestos endógenos en el intersticio, que es donde actúan y donde interesa evaluarlos. Cuando se acopla la microdiálisis a una técnica analítica de alta resolución como la EC-DFIL se puede hacer los análisis bioquímicos de diversas sustancias simultáneamente en volúmenes pequeños de muestras mejorando así la resolución temporal de la microdiálisis.

El análisis con EC-DFIL de los dializados subcutáneos, permitió separar, identificar y medir continuamente: Ile, Val, Phe, Thr, Gaba, Ser, Ala, los cuales se presentaron en un patrón similar al encontrado en dializados de plasma obtenidos *in vitro*. En el niño en estado crítico hubo cambios en los analitos que coincidieron con cambios en su estado clínico (mejoría neurológica

de 6 a 10 en la escala de Glasgow). Aunque no se puede dar una explicación precisa para estos hallazgos, se trata justamente de descubrir, mediante este tipo de *monitoreo*, indicadores pronósticos en el curso de una enfermedad o condición determinada, para tomar medidas terapéuticas precoces si fuera necesario. En un estudio en niños con trauma encefálico, Tolia y col. (51), reportan cambios en las proporciones de aminoácidos neuroactivos en dializados cerebrales, algunos de los cuales se asocian unos con aumento de morbilidad y otros con mejoría clínica; mientras que en aminoácidos estructurales no reportan cambios. Se encontró, además, una gran similitud en los patrones electroferográficos de los dializados del tejido celular subcutáneo del niño y de los dializados de plasma humanos obtenidos *in vitro*. Esto indicaría que el arreglo bioquímico extracelular del tejido subcutáneo es semejante al del plasma al menos en estos aminoácidos analizados, por lo que el muestreo extracelular del tejido subcutáneo podría ser otra opción para el estudio del ambiente bioquímico intravascular, especialmente cuando no es posible o conveniente el uso del plasma. El análisis de glucosa en voluntarios también mostró que tanto en pacientes críticamente enfermos como ambulatoriamente este método es fácil de realizar sin riesgos para los sujetos.

En conclusión, la microdialísis subcutánea pudo usarse en un paciente críticamente enfermo o en voluntarios ambulatorios sin riesgos y sin molestias. Así mismo, permitió el reconocimiento de patrones de aminoácidos con EC-DFIL, los cuales resultaron ser similares en diferentes compartimientos y especies. Esta semejanza de los dializados subcutáneos con los dializados de plasma, al menos en cuanto a aminoácidos, indica que podría usarse el control bioquímico subcutáneo en sustitución del control bioquímico del plasma. La microdialísis subcutánea

combinada con EC-DFIL es pues una alternativa efectiva y conveniente para el control bioquímico del medio interno.

Para el futuro muy cercano se anticipa mayor uso de microdialísis en tejidos periféricos a flujos muy lentos, para aumentar la recuperación de los analitos hasta prácticamente el 100%, combinada con sensibles técnicas analíticas en línea, es decir, hacer el análisis químico a medida que se va obteniendo la muestra, permitiendo una rápida recolección de datos con alta resolución temporal al lado de la cama del paciente (52-53).

AGRADECIMIENTO

Este trabajo se ejecutó con financiamiento otorgado por el CONICIT proyecto # G 97000820. Agradecemos al personal médico y de enfermería de la Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos del Hospital Universitario de los Andes (HULA) Mérida, Venezuela, por su colaboración para realizar microdialísis en sus pacientes.

REFERENCIAS

1. **Ungerstedt U.** Microdialysis-principles and applications for studies in animals and man. *J Intern Med* 1991; 230: 365-373.
2. **Hamani C, Luer MS, Dujovny M.** Microdialísis in the human brain: review of its applications. *Neurol Res* 1997; 19: 281-288.
3. **Nielsen PS, Winge K, Petersen LM.** Microdialysis. A method for measurement of local tissue metabolism. *Ugeskr Laeger* 1999; 161: 1735-1738.
4. **Hutchinson PJ, O'Connell MT, Kirkpatrick PJ, Pickard JD.** How can we measure substrate, metabolite and neurotransmitter concentrations in the human brain. *Physiol Meas* 2002; 23: R75-R109.
5. **Müller M.** Microdialysis. *BMJ* 2002; 324: 588-591.
6. **Westerik BHC.** Brain microdialysis and its application for the study of animal behavior. *Behav Brain Res* 1995; 70:103-124.

7. **Elmquist WF, Sawchuk RJ.** Application of microdialysis in pharmacokinetic studies. *Pharm Res* 1997; 14:267-288.
8. **Johansen MJ, Newman RA, Madden T.** The use of microdialysis in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacotherapy* 1997; 17:464-481.
9. **Hollenstein U, Brunner M, Mayer BX, Delacher S, Erovich B, Eichler FG, Muller M.** Target site concentrations after continuous infusion and bolus injection of cefpirome to healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 2000; 67:229-236.
10. **Páez X, Hernández L.** Blood microdialysis in humans: a new method for monitoring plasma compounds. *Life Sci* 1997; 61: 847-856.
11. **De La Peña A, Liu P, Derendorf H.** Microdiálisis in peripheral tissues. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; 45:189-216.
12. **Joukhadar C, Derendorf H, Muller M.** Microdiálisis. A novel tool for clinical studies of anti-infective agents. *Eur Clin Pharmacol* 2001; 57: 211-219.
13. **Goraca A.** Minireview: microdiálisis of the blood outflowing from brain. *Endocr Regul* 2001; 35: 229-236.
14. **Nowak G, Ungerstedt J, Ungerstedt U, Ericzon BG.** Clinical experience in continuous graft monitoring with microdialysis early after liver transplantation. *Br J Surg* 2002; 89:1169-1175.
15. **Dabrosin C, Hallstrom A, Ungerstedt U, Hammar M.** Microdialysis of human breast tissue during the menstrual cycle. *Clin Sci* 1997; 92:493-496.
16. **Ederoth P, Flisberg P, Ungerstedt U, Nordstrom CH, Lundberg J.** Local metabolic changes in subcutaneous adipose tissue during intravenous and epidural analgesia. *Acta Anaesthesiol Scand* 2002; 46:585-591.
17. **Minahan RE, Bhardwaj A, Williams MA.** Critical care monitoring for cerebrovascular disease. *New Horiz* 1997; 5: 406-421.
18. **Alvarez Del Castillo M.** Monitoring neurologic patients in intensive care. *Curr Opin Crit Care* 2002; 7:49-60.
19. **Mendelowitsch A.** Microdialysis: intraoperative and posttraumatic applications in neurosurgery. *Methods* 2001; 23: 73-81.
20. **Ronne-Engstrom E, Cesarini KG, Enblad P, Hesslager G, Marklud N, Nilsson P, Salei K, Persson L, Hillered L.** Intracerebral microdialysis in neurointensive care: the use of urea as an endogenous reference compound. *J Neurosurg* 2001; 94:397-402.
21. **Binnert C, Tappy L.** Microdialysis in the intensive care unit: a novel tool for clinical investigation or monitoring? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002; 5:185-188.
22. **Stjernstrom H, Carlsson T, Ungerstedt U, Hillered L.** Chemical monitoring of intensive care patients using intravenous microdialysis. *Intensive Care Med* 1993;19: 423-428.
23. **Rabenstein K, Meshane AJ, McKenna MJ, Dempsey E, Keaveny TV.** An intravenous microdialysis sampling system suitable for application in continuous monitoring of glucose and lactate. *Technol Health Care* 1996; 4:67-76.
24. **Arner P, Bolinder J.** Microdialysis of adipose tissue. *J Intern Med* 1991; 230: 381-386.
25. **Simonsen L, Bulow J, Madsen J.** Adipose tissue metabolism in humans determined by vein catheterization and microdialysis techniques. *Am J Physiol* 1994; 266: E357-E365.
26. **Hutchinson PJ, O'Connell MT, Maskell LB, Pickard JD.** Monitoring by subcutaneous microdialysis in neurosurgical intensive care. *Acta Neurochir* 1999; 75: 57-59.
27. **Rojdmark J, Heden P, Ungerstedt U.** Prediction of border necrosis in skin flaps of pigs with microdialysis. *J Reconstr Microsurg* 2000; 16:129-134.
28. **Damian MS, Sauter W, Reichmann H.** Subcutaneous microdialysis in mitochondrial cytopathy. *Muscle Nerve* 2001; 24: 648-653.
29. **Rolinski B, Baumeister FA, Roscher AA.** Determination of amino acid tissue concentrations by microdialysis: method evaluation and relation to plasma values. *Amino Acids* 2001; 21: 129-138.

30. Klaus S, Bahlmann L, Gliemroth J, Heringlake M, Prussman M, Schmucker P. Microdialysis for metabolic monitoring during septicemia. *Biomed Tech* 2001; 46: 304-306.
31. Mathy FX, Preat V, Verbeeck RK. Validation of subcutaneous microdialysis sampling for pharmacokinetic studies of flurbiprofen in the rat. *J Pharm Sci* 2001; 90: 1897-1906.
32. Mader RM, Brunnerm, Mensik C, Steger GC, Eichler HG, Muller M. Analysis of microdialysates from cancer patients by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 1998; 19: 2981-2985.
33. Tegeder I, Schmidtke A, Brautigam L, Kirschbaum A, Geisslinger G, Lotsch J. Tissue distribution of imipenem in critically ill patients. *Clin Pharmacol Ther* 2002; 71: 325-333.
34. Robert JJ. Continuous monitoring of glucose. *Horm Res* 2002; 57:81-84.
35. Baumeister FA, Rolinski B, Busch R, Emmrich P. Glucose monitoring with long-term subcutaneous microdialysis in neonates. *Pediatrics* 2001; 108: 1187-1192.
36. Tiessen RG, Rhemrev-Boom MM, Korf J. Glucose gradient differences in subcutaneous tissue of healthy volunteers assessed with ultraslow microdialysis and a nanoliter glucose sensor. *Life Sci* 2002; 70:2457-2466.
37. Kellogg DL Jr, Crandall CG, Liu Y, Charkoudian N, Johnson JM. Nitric oxide and cutaneous active vasodilatation during heat stress in humans. *J Appl Physiol* 1998; 85: 824-829.
38. Clough GF, Bennett AR, Church MK. Measurement of nitric oxide concentration in human skin in vivo using dermal microdialysis. *Exp Physiol* 1998; 83: 431-434.
39. Benfeldt E, Groth L. Feasibility of measuring lipophilic or protein-bound drugs in the dermis by in vivo microdialysis after topical or systemic drug administration. *Acta Derm Venereol* 1998; 78:274-278.
40. Dawson LA. Capillary electrophoresis and microdialysis: current technology and applications. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997; 697: 89-99.
41. Denoroy L, Bert L, Parrot S, Robert F, Renaud B. Assessment of pharmacodynamic and pharmacokinetic characteristics of drugs using microdialysis sampling and capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 1998; 19:2841-2847.
42. Moller JG, Stass H, Heing R, Blaschke G. Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence: a routine method to determine moxifloxacin in human body fluids in very small sample volumes. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998; 716: 325-334.
43. Páez X, Hernández L. Biomedical applications of capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Biopharm Drug Dispos.* 2001; 22: 273-289.
44. Tucci S, Rada P, Sepúlveda MJ, Hernández L. Glutamate measured by 6.s resolution brain microdialysis: capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection application. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997; 694:343-349.
45. Páez X, Rada P, Hernández L. Neutral amino acids monitoring in phenylketonuric plasma microdialysates using micellar electrokinetic chromatography and laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr B* 2000; 739:247-254.
46. Rada P, Tucci S, Teneud L, Páez X, Pérez J, Alba G, Garcia I, Sacchettini S, Del Corral J, Hernández L. Monitoring gamma-aminobutyric acid (GABA) in human brain and plasma microdialysates using micellar electrokinetic chromatography and laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr B* 1999; 735: 1-10.
47. Hernández L, Tucci S, Páez X, Guzmán N. *In vivo* monitoring of glutamate in the brain by dialysis and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J Liq Chromatogr* 1993; 652: 393-398.
48. Kamel A, Norgren S, Person B, Marcus C. Insulin induced hypoglycaemia: comparison of glucose and glycerol concentrations in plasma and microdialysis from subcutaneous adipose tissue. *Arch Dis Child* 1999; 42-45.

49. **Wientjes KJ, Schoonen AJ.** Determination of time delay between blood and interstitial adipose tissue glucose concentration change by microdialysis in healthy volunteers. *Int J Artif Organs* 2001; 24:884-889.
50. **Castejón AM, Páez X, Hernández L, Cubeddu L.** Use of intravenous microdialysis to monitor changes in serotonin release and metabolism induced by cisplatin in cancer patients: comparative effects of granisetron and ondasetron. *J Phar Exp Ther* 1999; 291:960-966.
51. **Tolias CM, Richards DA, Bowery NG, Sgouros S.** Extracellular glutamate in the brains of children with severe head injuries: a pilot microdialysis study. *Child Nerv Syst* 2002; 18: 368-374.
52. **Obrenovitch TP, Zilkha E.** Microdialysis coupled to online enzymatic assays. *Methods* 2001; 23: 63-71.
53. **Davies MI, Cooper JD, Desmond SS, Lunte CE, Lunte SM.** Analytical considerations for microdialysis sampling. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; 45:169-188