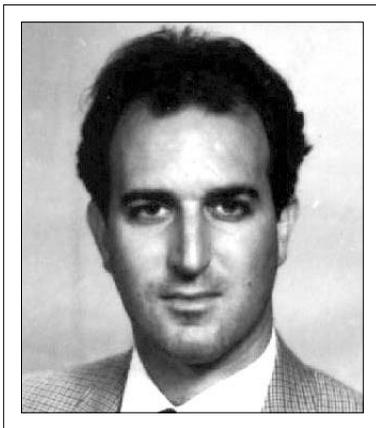


Microdiálisis cerebral, una herramienta promisoría para el estudio neuroquímico en neurocirugía: Una descripción técnica



SERGIO A. SACCHETTONI, MD
NEUROCIRUJANO

AUTORES

^{1,2} SERGIO A. SACCHETTONI, MD; ³ PEDRO RADA, MD; ³ LUIS TENEUD, MD; ⁴ RAMÓN GALUÉ, MD; ² JUAN POINCARÉ ABUD, MD; ^{1,5} JUAN FÉLIX DEL CORRAL, MD.

- 1 Servicio de Neurocirugía, Hospital "José María Vargas", Caracas.
- 2 Laboratorio de Estudio de Antígenos, Instituto de Biomedicina, Ministerio de Salud, Venezuela.
- 3 Laboratorio de Fisiología de la Conducta, Facultad de Medicina, Universidad de "Los Andes", Mérida, Venezuela.
- 4 Servicio de Neurología, Hospital Militar "Vicente Salias", Fuerte Tiuna, Caracas.
- 5 Cátedra de Neurocirugía, Escuela de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

E-mail: sacchettoni@gmail.com

Resumen

Introducción: En Venezuela, desde 1997 estamos empleando la técnica de la microdiálisis cerebral (MDC) durante las cirugías estereotáxicas para la enfermedad de Parkinson (EP) y el trastorno obsesivo compulsivo (TOC) para estudiar la neuroquímica de los circuitos neuronales involucrados en la fisiopatología de dichas enfermedades, al monitorear las concentraciones de los neurotransmisores excitatorios e inhibitorios y sus variaciones en respuesta a la aplicación de impulsos eléctricos de alta frecuencia y al procedimiento de ablación o electromodulación.

Materiales y método: Para el estudio de la EP utilizamos la MDC dinámica y múltiple durante las talamotomías, palidotomías y el implante de electrodos de neuromodulación en el núcleo subtalámico (NST). Se tomaron muestras empleando sondas de microdiálisis colocadas en el globo pálido interno (GPI) y/o núcleo ventrolateral (VL) del tálamo en varios momentos: antes, durante y después de la aplicación de impulsos eléctricos de alta frecuencia (inhibitorios, a 100-120 Hz y 2-4 V) en los "blancos" quirúrgicos (NST, GPI o VL) y finalmente, después de la ablación por radiofrecuencia (talamotomía o palidotomía) o después de la colocación de los electrodos de neuromodulación. La MDC se realiza con el paciente despierto, sin ninguna sedación. Para el estudio del TOC tomamos las muestras del núcleo dorsomediano del tálamo, en el lado derecho o en forma bilateral, antes, durante y después de producir la ablación (cingulotomía) en cada uno de los lados.

Recibido: Abril 2010
Aceptado: Mayo 2010

Resultados: En los pacientes con EP, la concentración de GABA extracelular en el VL disminuyó durante la aplicación de impulsos eléctricos de alta frecuencia en el GPi y retornó a su valor inicial una vez que se suspendió la inhibición eléctrica y disminuyó significativamente de manera definitiva luego de su destrucción (pallidotomía) o de manera reversible con la electromodulación del GPi. El nivel de glutamato (Glu) disminuyó cuando los impulsos eléctricos se aplicaron sobre el NST ("vía indirecta" de los ganglios basales). Además, en el momento de aplicar impulsos eléctricos en el NST se produce un aumento de la concentración de GABA en el GPi, que normalmente debería ser liberado por los axones putaminales ("vía directa"). En los pacientes con TOC, el nivel de GABA en el núcleo dorsomediano (DM) del tálamo derecho disminuyó discretamente con la cingulotomía izquierda (contralateral) y de manera más acentuada con la cingulotomía derecha (homolateral).

Discusión y conclusiones: La disminución de los niveles de GABA en el VL y de Glu en el GPi durante la aplicación de impulsos eléctricos en el GPi o NST, respectivamente, es algo que se espera, según el modelo fisiopatológico de los ganglios basales aceptado actualmente. Ahora bien, la elevación del nivel de GABA en el GPi durante la aplicación de impulsos eléctricos en el NST nos sugiere una interacción entre las vías "directa" e "indirecta", que hasta ahora era desconocida. Y los hallazgos en la psicocirugía parecen confirmar que el TOC tiene su sustrato fisiopatológico en los ganglios basales; por ello, podríamos proponer que el TOC tiene un mecanismo semejante al de la EP. Estos resultados, aunque aún no tienen significancia estadística, nos alientan a continuar esta investigación.

Palabras clave: cirugía de Parkinson; microdiálisis cerebral; electromodulación cerebral profunda; núcleo subtalámico; globo pálido interno; tálamo

Abstract

Introduction: In Venezuela, since 1997 we are using the technique of cerebral microdialysis (CMD) during stereotactic surgery for Parkinson's disease (PD) and obsessive compulsive disorder (OCD) to study the neurochemistry of neuronal circuits involved in the pathophysiology of these diseases, by monitoring the concentrations of excitatory and inhibitory neurotransmitters and their variations in response to the application of high frequency electrical impulses and to radiofrequency ablation or DBS procedures.

Materials and methods: In order to study PD, we used the multiple and dynamic CMD technique during

thalamotomy, pallidotomy and implantation of DBS electrodes in the subthalamic nucleus (STN). Samples were collected using CMD probes placed in the globus pallidum interna (GPi) and / or ventrolateral nucleus (VL) of the thalamus at various times: before, during and after application of high frequency electrical impulses (inhibitory, 100-120 Hz and 2-4 V) in the surgical "target" (STN, GPi, or VL), and finally, after radiofrequency ablation (thalamotomy or pallidotomy) or after placement of the electrodes of neuro-modulation. The CMD is performed with the patient awake, without sedation. For the study of OCD, we took samples from the dorsomedian thalamus, on the right side or bilaterally, before, during and after ablation (cingulotomy) on each side.

Results: In patients with PD, the concentration of extracellular GABA in the VL decreased during the application of high frequency electrical impulses in the GPi and returned to its initial value after the electrical inhibition was suspended, and decreased permanently after destruction of the GPi (pallidotomy) or reversibly with the DBS of the GPi. The level of glutamate (Glu) decreased when the electrical impulses were applied on the STN ("indirect pathway" of the basal ganglia). In addition, when we applied electrical impulses in the STN, there was an increase in the concentration of GABA in the GPi, which should normally be released by the axons from the putamen ("direct path"). In patients with OCD, the level of GABA in the dorsomedian nucleus (DM) of the right thalamus decreased discretely after left cingulotomy (contralateral) and more pronouncedly with right cingulotomy (ipsilateral).

Discussion and conclusions: We observed decreased GABA levels in the VL and Glu in the GPi during application of electrical impulses in the GPi or the STN, respectively, which is expected according to the pathophysiological model of the basal ganglia currently accepted. However, raising the level of GABA in the GPi during the application of electrical impulses in the NST suggests an interaction between direct and indirect pathways, which was unknown until now. And the psychosurgery findings seem to confirm that OCD has its pathophysiological substrate in the basal ganglia, hence, we could propose that OCD has a mechanism similar to the PD. These results, although no statistically significant, encourage us to continue this research.

Key words: surgery of Parkinson's disease; cerebral microdialysis; deep brain stimulation (DBS); subthalamic nucleus; globus pallidum interna; thalamus

Introducción

El objetivo de la microdiálisis cerebral (MDC) es recoger alícuotas mínimas de líquido intersticial cerebral a través de una membrana de diálisis en el extremo de una cánula proveniente de la actividad neuronal sináptica, con el fin de conocer la neuroquímica del circuito neuronal adyacente a la cánula o el sitio de recolección. Con la MDC se intenta dilucidar las alteraciones neuroquímicas en algunas enfermedades del sistema nervioso central (SNC), tales como la enfermedad de Parkinson (EP), el trastorno obsesivo compulsivo (TOC) o la epilepsia. Esta herramienta de investigación, y probablemente de diagnóstico, tiene el aval de la experiencia en animales que sustenta su uso en humanos.¹⁻⁸ Lo más importante, y que merece ser mencionado, es que nuestro grupo de investigación es el primero en reportar las variaciones que ocurren al aplicar estímulos o realizar pruebas funcionales durante la cirugía en estos pacientes.⁹⁻¹¹ Los hallazgos contribuyen al mejor conocimiento del sustrato fisiopatológico y sientan las bases para la optimización de las intervenciones quirúrgicas y/o el desarrollo de fármacos con mayor especificidad. De igual manera, se podría intentar conseguir cambios *in vivo* en la transmisión nerviosa que pudiesen considerarse como pruebas diagnósticas en el futuro.

En la década de los 60 el español Delgado intentó medir *in vivo* mediante el uso de una membrana de diálisis la concentración de los neurotransmisores liberados en diferentes regiones cerebrales.^{12,13} Sin embargo, confrontó una serie de problemas que le hicieron casi imposible la detección. Quizás el mayor problema fue la inexistencia en esa época de algún método químico analítico lo suficientemente sensible como para detectar las pequeñas cantidades de los diferentes neurotransmisores. Recién a finales de los años 70 aparece la **cromatografía líquida de alta eficiencia** (HPLC, *high performance liquid chromatography*), que permite que los investigadores puedan estudiar mejor los neurotransmisores. El venezolano Luis Hernández,¹ en 1983, y el sueco Ungerstedt,¹⁴ en 1987, publicaron los primeros trabajos sobre la determinación de los niveles del neurotransmisor dopamina en el cuerpo estriado de ratas vivas mediante la microdiálisis cerebral.

La técnica de la microdiálisis cerebral ha seguido desarrollándose en varios laboratorios del mundo y se la utiliza como técnica preferencial para estudiar la presencia y concentración de neurotransmisores *in vivo*, tanto en animales como en humanos.^{14,15} Esta técnica, aunada a la HPLC, ha permitido la de-

tección de los cambios en las concentraciones de los neurotransmisores, especialmente en la epilepsia.¹⁶ Sin embargo, hay pocos trabajos que reportan el empleo dinámico de esta técnica para la evaluación de los pacientes parkinsonianos^{11,17} y sólo uno en pacientes con trastornos psiquiátricos.¹⁸

Existen varios motivos que nos explican la escasez de trabajos científicos relacionados a la cuantificación de las concentraciones de los aminoácidos excitatorios e inhibitorios, tanto en modelos animales como en humanos. Primero, para determinar las concentraciones de glutamato y GABA mediante la HPLC se requiere de un paso previo, la **derivatización***¹, en el que se utiliza el orto-p-aldehído (OPA). Esta molécula tiene el gran inconveniente de ser inestable en solución y se degrada rápidamente, lo que hace irreproducibles los resultados. Segundo, la medición de los neurotransmisores mediante la HPLC exige la inyección de un volumen mínimo de 10 μ L; esto significa que, para obtener una cantidad suficiente, se requieren tiempos prolongados de recolección de la muestra, generalmente de 10 a 20 min (por lo general, las muestras se recogen a razón de 1 μ L/min. Para obtener volúmenes suficientes en menor tiempo (5 a 10 min), tenemos entonces que perfundir la cánula de diálisis a alta velocidad y, por supuesto, la cantidad de neurotransmisores obtenidos a través de la membrana de diálisis será inversamente proporcional a la velocidad del flujo, es decir, tendremos muestras muy diluidas. Asimismo, al emplear altas velocidades, corremos el riesgo de producir depleción en la zona cerebral perfundida, lo que nos conduciría a errores al tratar de interpretar los resultados obtenidos.

En búsqueda de una solución al problema de la obtención de muestras en el menor tiempo posible (5 minutos), a mediados de la década de los 80, en el laboratorio de Fisiología de la Conducta de la Universidad de Los Andes (Mérida, Venezuela), dirigido por el doctor Luis Hernández, se empezó a trabajar en el desarrollo de una nueva técnica de análisis, denominada electroforesis capilar. Los aspectos teóricos de este método fueron descritos por primera vez por el investigador sueco Hjerten a comienzos de la década de los 60.^{19,20} Sin embargo, en aquel momento no existían capilares lo suficientemente pequeños como para probar las diferentes hipótesis. Recién en la década de los 80, gracias a la invención de los capilares de silicón fundido, Jorgenson inició

* La derivatización de muestras es un procedimiento mediante el cual los compuestos químicos complejos son convertidos en productos derivados o separados en sus componentes con la finalidad de que estos puedan ser sometidos al análisis cualitativo o cuantitativo por la técnica deseada (Nota del revisor).

las pruebas de separación utilizando un detector de fluorescencia/luz ultravioleta (UV).²¹⁻²³ De inmediato se demostró el gran potencial de separación de esta nueva técnica, con la que se podía obtener una mejor resolución y utilizar volúmenes de muestra muchos más pequeños (generalmente nanolitros).

Como ya mencionamos, Hernández se involucró en el desarrollo de esta técnica, en un intento por utilizarla como método analítico para las muestras obtenidas mediante la microdiálisis cerebral, e inventó la alineación colineal para el análisis de muestras mediante el uso de la electroforesis capilar con detección de la fluorescencia inducida por láser. Este invento permitió el análisis de aminoácidos transmisores en muestras de dializado cerebral recolectadas entre 1 y 30 segundos y permitió un gran avance en la sensibilidad.²⁴ Gracias a esto, fue necesaria la introducción de nuevos términos químicos tales como zeptomol (10⁻²¹ M) y yoctomol (10⁻²⁴ M). Posteriormente, por primera vez en Venezuela, en 1997, la microdiálisis cerebral se utilizó en humanos.^{10,11} Desde entonces venimos trabajando en el estudio de neurotransmisores en pacientes sometidos a diversos procedimientos de neurocirugía funcional y estereotáxica.

En el presente exponemos nuestros hallazgos como resultado del empleo de la microdiálisis cerebral para el monitoreo de los neurotransmisores en pacientes con enfermedad de Parkinson, trastorno obsesivo compulsivo o epilepsia que fueron sometidos a procedimientos terapéuticos de neurocirugía funcional.

Materiales y método

Pacientes y líneas de investigación

Desde 1997, en el Servicio de Neurocirugía del Hospital "José María Vargas", de Caracas, se vienen desarrollando tres líneas de investigación utilizando la MDC como herramienta de estudio neuroquímico:

1) La primera línea consiste en la obtención de muestras por microdiálisis durante la cirugía estereotáxica para la enfermedad de Parkinson (EP). Las muestras se toman del putamen, núcleo caudado, globo pálido interno (GPI) y núcleo ventrolateral (VL) del tálamo. La MDC primero se realizó con la talamotomía ventrolateral y después con la palidotomía ventroposterolateral. Actualmente está en marcha un proyecto relacionado con el implante de electrodos para la electromodulación cerebral profunda (EMCP, más conocida por sus siglas en inglés, DBS, *deep brain stimulation*) en el núcleo subtalámico (NST).

Se determinan las variaciones de las concentraciones extracelulares de los aminoácidos excitatorios e inhibitorios en el GPI y VL en muestras recolectadas durante 5 minutos, cada 10 minutos. Las muestras se toman durante un período inicial basal, luego durante y después de la aplicación de impulsos eléctricos de alta frecuencia (inhibitorios) en los "blancos" quirúrgicos (NST, GPI o VL) y finalmente, cuando se dio el caso, después de la ablación por radiofrecuencia, sea talamotomía o palidotomía, o después de la colocación de electrodos de neuromodulación. Obviamente, la MDC se realiza con el paciente despierto, sin ninguna sedación (figura 1). En trabajos anteriores ya hemos descrito nuestros resultados de la MDC durante la talamotomía y palidotomía. Aquí describiremos nuestros resultados preliminares de la MDC en tres pacientes a quienes se les colocó electrodos de neuromodulación en el NST; las sondas de microdiálisis fueron colocados en el GPI (en tres cirugías) o VL (en dos cirugías); dos pacientes tenían sondas colocadas en ambos núcleos simultáneamente.



Figura 1. Para que los resultados obtenidos del análisis neuroquímico sean fiables, el paciente debe estar despierto, sin sedantes ni anestésicos que puedan alterar los neurotransmisores.

2) La segunda línea de investigación es la MDC durante la cirugía para el trastorno obsesivo compulsivo (TOC). Se inició con la cingulotomía anterior estereotáxica y actualmente se desarrolla la nueva modalidad de "múltiples blancos", es decir, la combinación de cingulotomía y capsulotomía bilaterales estereotáxicas.¹⁸ Las muestras por MDC se toman del núcleo caudado, núcleo acumbens y núcleo dorsomediano del tálamo, en el lado derecho o en forma bilateral, en varios momentos: en el período basal, antes y después de estimular la obsesión (al paciente se le muestra un objeto "gatillo" o se le habla sobre el

tema desencadenante de la obsesión) y finalmente, después de producir la ablación por radiofrecuencia. Presentamos los resultados preliminares del estudio en dos pacientes con TOC.

3) En la tercera línea de investigación, la MDC se aplica en las cirugías de epilepsia. Aquí hay dos vertientes: a) Durante las lobectomías temporales a cráneo abierto: Antes de la resección se colocan una o dos sondas de MDC hacia la parte medial del lóbulo temporal, buscando el hipocampo; se toman varias muestras, luego se retiran las sondas y se continúa con la resección del lóbulo. A estos pacientes previamente se les realiza una espectrometría del lóbulo temporal por resonancia magnética (ERM) preoperatoria y un registro cortical durante la cirugía. Estos datos son confrontados con los hallazgos de la MDC y con las observaciones obtenidas en el estudio histopatológico del lóbulo resecado. b) La otra vertiente, que se iniciará próximamente, es con cirugía estereotáxica, al realizar una amigdalohipocampectomía por radiofrecuencia. Aquí se tomarán muestras por microdiálisis de manera bilateral en el hipocampo, antes y después de la ablación por radiofrecuencia. Los datos serán

confrontados con los de la ERM únicamente. En el presente documento no presentaremos nuestros resultados del estudio en la epilepsia.

Así pues, siempre se intenta que la MDC sea dinámica, es decir, se toman muestras en el período basal, luego antes y después de la aplicación de estímulos y finalmente, después de la acción terapéutica.

Sondas de microdiálisis cerebral

Los detalles de las cánulas ya han sido descritos en otras publicaciones.^{17,25,26} Resumiendo, la cánula de diálisis consiste en un tubo de acero inoxidable, de 26 g y 180 micrómetros de diámetro externo, con un capilar de silicio en su interior recubierto de poliimida, de 75 μm de diámetro interno, 150 μm de diámetro externo y 10 cm de longitud; en uno de sus extremos posee una membrana de celulosa (con poros que no permiten el paso de moléculas con peso molecular superior a 13.000 daltons) sellada con epoxi (figuras 2 y 3). Las cánulas son similares a las utilizadas en animales, pero varían en longitud. Debido a que son muy delgadas, las

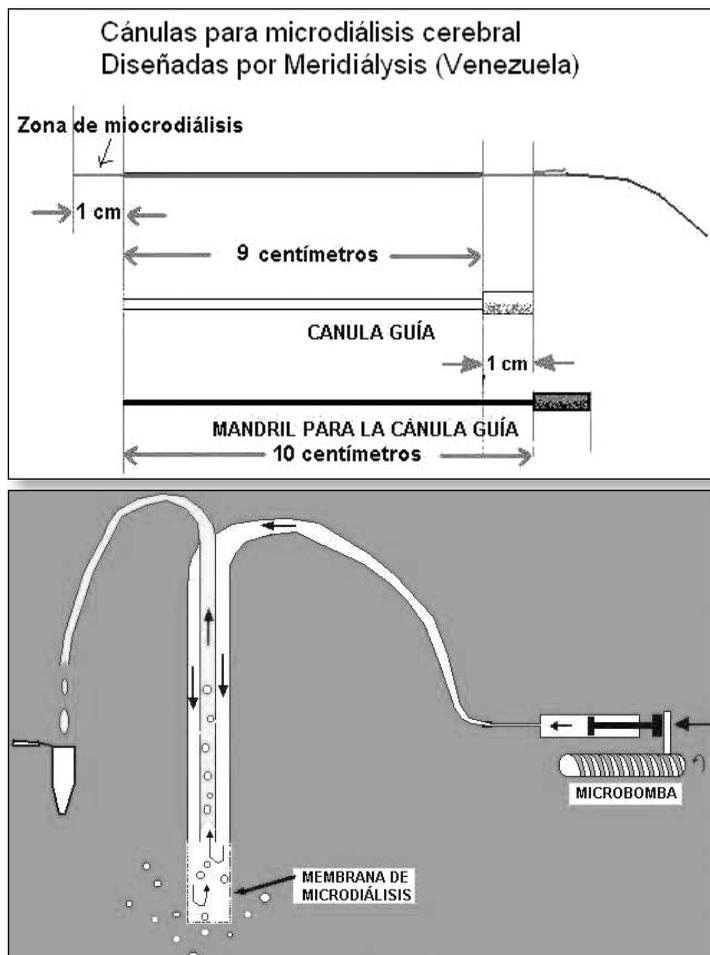


Figura 2. Esquema de la configuración de las sondas o cánulas de microdiálisis diseñadas por Meridialysis®. La cánula guía o "camisa" tiene una longitud de 9 cm y es introducida con el mandril o guidor interno hasta 5 mm por encima del "blanco" a dializar. Luego, se retira el mandril y a través de la cánula guía se introduce la sonda de microdiálisis, de 10 cm, cuyo extremo con la membrana de diálisis sobresale 10 mm. De este modo, la zona dializar tiene 10 mm de diámetro mayor. El propósito de que la sonda tenga sólo 10 cm es para evitar que las sondas sobresalgan mucho del nivel de la tabla externa del cráneo y obstaculicen los movimientos del neurocirujano, como ocurría con las sondas anteriores.

Figura 3. Esquema de la sonda de microdiálisis. Esta consiste en dos tubos concéntricos, uno dentro de otro. El tubo externo está conectado a la manguera de entrada, por donde ingresa una solución (en nuestro caso, líquido cefalorraquídeo artificial) perfundida mediante una bomba de microinfusión. La solución entra hasta el extremo distal, colocado dentro del parénquima cerebral, donde se encuentra la membrana de diálisis. Aquí, las moléculas cuyo peso molecular lo permita, entran a través de la membrana debido al gradiente de concentración y son arrastradas por la corriente de la solución al exterior por el tubo interno. Las muestras son recogidas en tubos de Eppendorf y posteriormente procesadas por electroforesis capilar.

lesiones que causan son mínimas, tal como se ha demostrado en animales.

Estas cánulas son perfundidas con líquido cefalorraquídeo artificial (NaCl 136 mM, KCl 3,7 mM, CaCl₂ 1,2 mM, MgCl₂ 1 mM y NaHCO₃ 10 mM a pH 7,4) a una velocidad de 1 μ L/min. Las cánulas se implantan por lo menos 30 minutos antes de iniciar las pruebas y luego las muestras se recolectan durante 5 minutos, a razón de 1 μ L/min, por cada prueba.

Preparación del paciente y colocación de las sondas de microdiálisis

Al paciente (con EP, TOC o epilepsia) se le fija el aro estereotáxico con 4 puntas al cráneo, previa anestesia local o bloqueo nervioso periférico con bupivacaína. Las coordenadas de los "blancos" para la microdiálisis se toman al mismo tiempo que el "blanco" quirúrgico mediante tomografía computarizada (TC) o resonancia magnética (RM) cerebral. Una vez en el quirófano, se realiza una incisión más larga que la usual para un procedimiento estereotáxico común, a ambos lados, inmediatamente por delante de la cisura coronal. Lo primero que se implantan son las sondas de microdiálisis.

Es mejor que cada sonda tenga su propio agujero de trepanación; para ello se escoge bien su trayecto de entrada, de modo que este no coincida con el de las demás sondas ni con la entrada del electrodo operador (sea de registro, rastreo, "estimulación", lesión por radiofrecuencia o electromodulación permanente). Es esta la razón por la cual la incisión debe ser amplia. Los agujeros de trepanación de las sondas de MDC deben ser mínimos.

Primero, se introduce la cánula guía metálica con el mandril o guiador interno, sujeta con el

adaptador-sujetador de cánulas, fabricado para este propósito (figura 4).

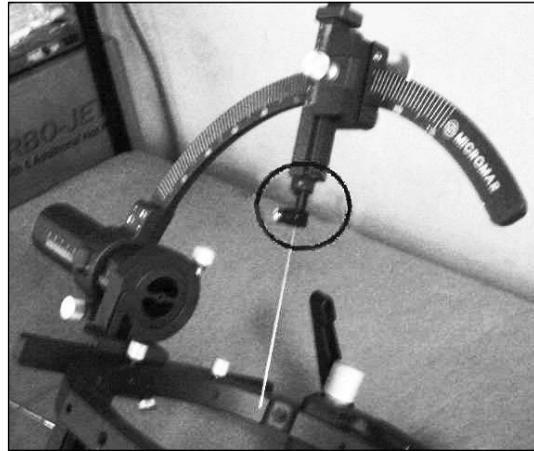


Figura 4. Adaptador-sujetador (señalado con un círculo) que sujeta la cánula guía o "camisa" al sistema estereotáxico (Micromar®, Brasil) para su colocación, lo más exacta posible, en el "blanco" cerebral a dializar.

Esta cánula se acerca hasta 5 mm por encima del "blanco" a dializar. Se retira el mandril y se introduce la sonda de microdiálisis, cuyo extremo de diálisis sobresale un 10 mm por fuera de la cánula guía, de manera que queda en una extensión de 5 mm por encima y 5 por debajo del "blanco". Una vez colocada la sonda en su "blanco" (por ejemplo VL, GPi, NST, putamen, núcleo accumbens), es asegurada con adhesivo quirúrgico biológico (e.g. Bioglue® de CryoLife®, Atlanta) o cualquier similar que la mantenga en su sitio. Las sondas fabricadas recientemente para uso humano (Meridialysis®) son más cortas, de manera que sólo sobresalen de la corteza cerebral unos pocos milímetros una vez que están puestas en su sitio (figura 5); de este modo, no entorpecen la labor del neurocirujano.



Figura 5. Disposición de las sondas (introducidas en el cerebro) y mangueras de infusión (flechas N° 1) y de recolección (flechas N° 2) en el ambiente quirúrgico. Las muestras se recogen en tubos de Eppendorf que se deben sostener cerca de las mangueras de recolección (flechas N° 3). En este paciente se observa las cánulas largas, que sobresalen mucho de la tabla externa del cráneo del paciente (flecha N° 4 que mide distancia) y esto puede interferir con los movimientos del neurocirujano. Con sondas más cortas, este inconveniente se corrige.

Toma de muestras por microdiálisis cerebral

Luego de implantar las sondas, usualmente dos a tres, debe permitirse un lapso de espera de 30 minutos con la finalidad de que se estabilicen los neurotransmisores liberados al intersticio debido al microtrauma producido por la inserción de la sonda. La microrruptura celular causa la liberación de glutamato (Glu) intracelular al exterior y puede causar falsas mediciones de Glu. Si bien algunos autores han propuesto que el lapso de espera para que se estabilice el intersticio debería ser de 4 a 6 horas o más,¹⁶ nuestra experiencia nos ha hecho concluir que luego de 30 minutos el error de medición es lo suficientemente pequeño para que no sea significativo y para que la relación existente entre las variaciones causadas por los diferentes estímulos sí lo sea.

El electrodo operador se introduce y se detiene 10 mm antes de llegar al "blanco". Antes de aplicar cualquier impulso eléctrico, se toma una muestra durante 5 minutos (a razón de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$), simultáneamente en cada "blanco" a dializar ("muestras basales" o "cero"). Se toma nuevamente otra muestra basal a los 10 minutos. En seguida se procede a la aplicación de los impulsos y a la evaluación de los efectos clínicos (en los pacientes con EP o TOC). Los impulsos eléctricos de alta frecuencia que se aplican sobre los "blancos" quirúrgicos (NST, GPi o VL) deben estar entre los rangos de 100-120 Hz (hercios) y 2-4 voltios. Hay que recordar que en la mayoría de los núcleos cerebrales (donde se encuentran los somas de las neuronas), la aplicación de estímulos de alta frecuencia produce la inhibición de su actividad (aún si es anormal), por lo que se debería observar una mejoría de los síntomas, que es muy notoria en los pacientes con EP. Esta estimulación, aunada a la toma de muestras por MDC, nos permite explorar funcional y neuroquímicamente los posibles circuitos involucrados en la enfermedad.

En cada modalidad de procedimiento quirúrgico se toma la muestra durante 5 minutos de microdializado y se deja reposar 10 minutos antes de una nueva toma ("muestras de rastreo"). Debe evitarse la toma de muestras por cada incremento de intensidad (voltaje). Sólo se toma una muestra cada vez que se obtenga una respuesta clínica apreciable, seguida siempre de otra muestra "de reposo" 10 minutos después. Cuando

ya se precisó el "blanco" quirúrgico (terapéutico) definitivo, se toma una muestra más con la aplicación de impulsos necesarios para lograr una buena respuesta clínica ("muestra preoperatoria"). Puede tomarse una segunda muestra preoperatoria, pero siempre después de una "muestra de reposo" a los 10 minutos de la anterior, si la respuesta clínica se sigue reproduciendo. A continuación, se realiza el procedimiento terapéutico (ablación por radiofrecuencia o implante de electrodos definitivos para electromodulación), y también se espera 10 minutos para tomar dos o más muestras durante 5 minutos, pero siempre intercaladas con 10 minutos de reposo ("muestras posoperatorias").

Recolección de las muestras obtenidas por microdiálisis

La perfusión hacia las sondas se hace por medio de una bomba de microinfusión, que se instala cerca del paciente sobre una mesa con campo estéril (figura 6). Debe tener capacidad para 2 a 4 inyectoras simultáneamente y se lo programa para una velocidad de infusión de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. Las inyectoras deben ser las adecuadas, compatibles con la bomba de microinfusión: inyectoras de Hamilton, de insulina (1 ml) o de 3 ml, generalmente (debe consultarse al fabricante respecto a cuáles son los modelos compatibles con la bomba de microinfusión). De las agujas de las inyectoras parten las mangueras que se conectan a la cánula metálica de entrada de las sondas. La salida del microdializado se hace por la manguera de salida que tiene la sonda, y esta se introduce dentro de un tubo de Eppendorf estéril que se fija en el campo quirúrgico (figuras 3 y 5).

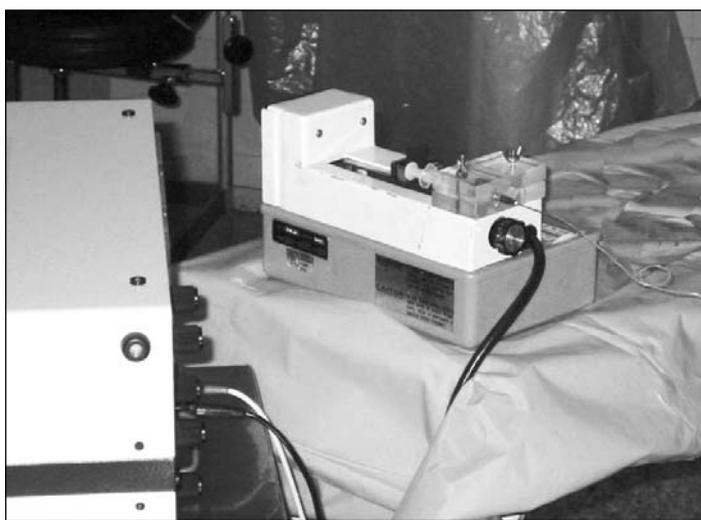


Figura 6. El uso de la bomba de microinfusión es imprescindible para lograr flujos tan lentos como de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Se necesita un tubo de Eppendorf por cada toma de muestra de microdiálisis y por cada "blanco" a dializar, y cada uno debe ser estrictamente etiquetado. Por ejemplo, el tubo que recolecta la primera muestra basal proveniente del NST derecho podría ser rotulado como "NSTd-basal-1"; el tubo con la segunda muestra basal de ese mismo "blanco" (luego de haberse retirado el primer tubo y cambiado por este) sería denominado "NSTd-basal-2"; al tubo con el cual se recolecta el microdializado inmediatamente luego de la primera aplicación de un estímulo en el NST izquierdo se lo podría llamar "NSTi-rastreo-1", y así sucesivamente.

Los tubos debidamente rotulados son colocados en hielo en un recipiente apropiado para su conservación. En la etiqueta de identificación, además de los datos de la muestra, también deben figurar el nombre del paciente y la fecha de la cirugía. Deben ser guardados en seguida a -20°C . Pueden conservarse en estas condiciones, incluso hasta un mes, hasta su medición con el equipo de electroforesis capilar (modelo R2D2, Meridialysis®). En caso alternativo, puede disponerse de un equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, *high performance liquid chromatography*), que debe estar preparado y calibrado para detectar concentraciones muy pequeñas (del nivel de pico y nanomoles).

Inmediatamente después de tomar la última muestra de microdiálisis, se retiran las sondas y luego se concluye la cirugía de manera convencional. Durante todo el procedimiento, se debe mantener despiertos a los pacientes para que con su participación activa se pueda confirmar la localización de la lesión.

Derivatización de las muestras para medir glutamato, aspartato y GABA

Para derivatizar cada muestra, esta se diluye en una solución preparada con 100 nL de buffer de carbonato/bicarbonato, 20 mM con un pH de 9,4, y 100 nL del isómero I de isotiocianato de fluoresceína (fluoresceína-5-isotiocianato; FITC, por las siglas en inglés de *fluorescein isothiocyanate*), 2,75 mM, fijada en acetona. De igual manera, también se derivatizan una solución blanco y un patrón ("estándar")

de cada uno de los aminoácidos en estudio. Las muestras, el blanco y los patrones son colocados en una cámara húmeda y oscura durante al menos 16 horas antes de analizarlas para permitir la reacción química.^{9,17,26-29}

Electroforesis capilar con fluorescencia inducida por láser

El equipo de electroforesis capilar es del modelo R2D2 (Meridialysis®, Mérida, Venezuela; figura 7), automático y computarizado, cuyas características ya han sido descritas en diferentes publicaciones.^{1,2,25} En resumen, consiste en un instrumento implementado con un detector colineal que recibe un haz de láser de argón, con una longitud de onda de 488 nm. Este haz es llevado a través de una fibra óptica hasta una caja óptica en donde se refleja en un espejo dichroico hacia el capilar. El haz de luz se enfoca sobre el capilar mediante un objetivo de microscopio (con un aumento de 60x y apertura numérica de 0,85 NA).

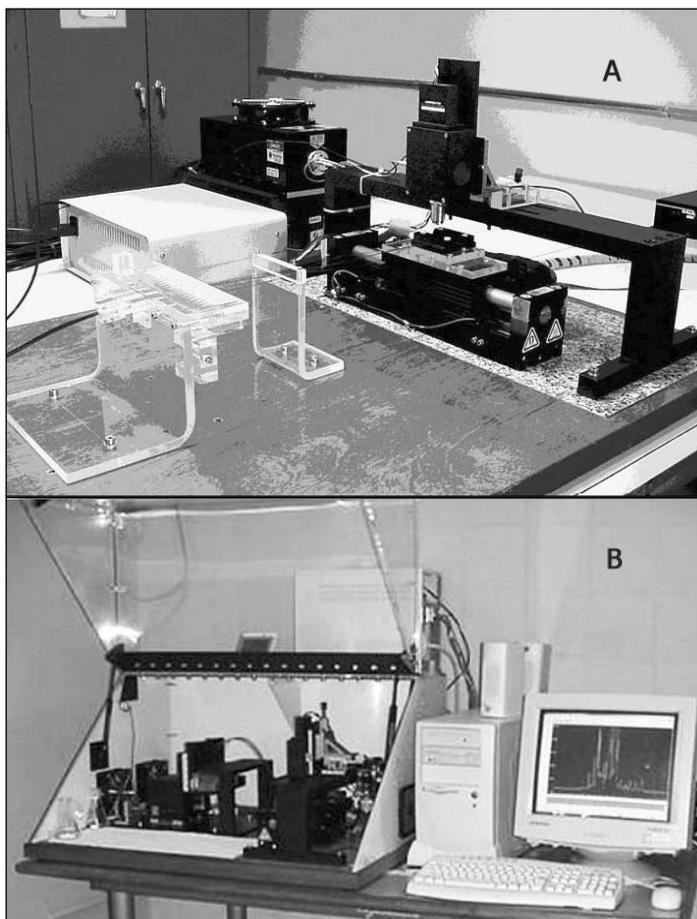


Figura 7. Sistema de electroforesis capilar de zona (Meridialysis®, modelo R2D2), acoplado a un sistema de detección de la fluorescencia inducida por láser. A) Modelo para investigación; B) modelo para uso clínico. La alta sensibilidad ha obligado a la introducción de nuevos términos de concentración: zeptomol (10^{-21} M) y yoctomol (10^{-24} M).

Este equipo tiene un capilar de 20 μm de diámetro interno y 45 cm de longitud efectiva, con una ventana colocada a 35 cm del ánodo. El capilar se llena con la solución tampón o buffer y sus extremos se dejan inmersos en reservorios equipados con electrodos de platino-iridio, los cuales están conectados a una fuente de poder que genera 23 kV. La fluorescencia que se produce en el interior del capilar es recogida por el mismo objetivo, atraviesa el espejo dicróico y es concentrada mediante un ocular en la ventana fotosensible de un tubo fotomultiplicador, que convierte la señal luminosa en voltaje. Este voltaje, a su vez, es convertido en una señal digital por un computador que emplea el programa Onice[®]. La fluoresceína fue utilizada como un estándar interno que reduce la variabilidad de los picos debida a las variaciones en el procedimiento de inyección.

Medición de los elementos

a. Glutamato y aspartato.

Las muestras, patrones y blancos son inyectados hidrodinámicamente, cada uno por separado, en el extremo anódico del capilar por efecto de una presión negativa de 19 psi (del inglés *Pounds per Square Inch*, libras por pulgada cuadrada) aplicada en el extremo catódico del capilar durante 0,5 segundos, mientras que el terminal anódico del capilar está sumergido en la solución. Posteriormente, el capilar es transferido al reservorio y se aplica un alto voltaje (20 kilovoltios) durante 10 minutos. En el caso del glutamato y el aspartato, se utilizará un buffer de carbonato/bicarbonato 20mM para la separación o derivatización.

b. GABA: Este aminoácido es un zwitterión (ión bipolar); en otras palabras, en medio ácido o alcalino posee una carga muy ligera. Para poder separarlo de otros compuestos neutros mediante la electroforesis capilar debe modificarse las características del buffer. Para eso, se le agrega una cantidad considerable de detergente para lograr la separación cromatográfica de las moléculas. En nuestro caso, se utiliza un buffer compuesto por borato sódico 23 mM, SDS (dodecil sulfato de sodio o lauril sulfato de sodio) 120 mM y metanol al 0,1% y se aplica un voltaje de 26 kV durante 10 minutos.

Después de cada corrida de muestra, el capilar debe ser lavado con NaOH 0,1 N durante 2 minutos, luego con agua de 18 M Ω (megaohmios) durante un minuto y por último con el buffer carbonato por 2 minutos. Cada corrida completa demora 15 minutos, más los tiempos de lavado.

Aspectos éticos

El procedimiento de microdiálisis cerebral en humanos fue aprobado previamente por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de los Andes, Mérida, y por la Comisión de Bioética del Hospital Vargas. Además, se siguen los lineamientos sobre bioética de la Fundación Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT). Igualmente, se requiere que el documento de consentimiento informado haya sido firmado por los mismos pacientes de manera individual.

Resultados y discusión

Nuestros resultados ya han sido publicados y próximamente volveremos a publicar más. A continuación los expondremos de manera sencilla. En la EP pudimos apreciar un comportamiento que concuerda con el modelo fisiopatológico de los ganglios basales de DeLong y Alexander,³⁰⁻³⁴ es decir, que en esta enfermedad hay una excesiva descarga (hiperactividad) del complejo del GPI/SNr que se traduce en una hiperinhibición (mayormente gabaérgica) del VL. En efecto, pudimos observar que la concentración de GABA extracelular en el VL disminuyó durante la aplicación de impulsos eléctricos de alta frecuencia (inhibitorios) en el GPI, retornó a su nivel inicial una vez que se suspendió la inhibición eléctrica y disminuyó significativamente de manera prolongada o definitiva con su destrucción (palidotomía) (figura 8) y de manera temporal o reversible con la inhibición eléctrica (electromodulación) del GPI ("vía indirecta" de los ganglios basales).⁹

De acuerdo al mismo modelo fisiopatológico, el NST produce hiperexcitación glutamatérgica del GPI (el NST se ha "liberado" de la función inhibitoria del putamen). Encontramos que el nivel de Glu en el GPI disminuyó de manera reversible con la inhibición eléctrica del NST (figura 9). Además, pudimos apreciar que la disminución de Glu en el GPI, al ser inhibido el NST, se acompañaba de un discreto aumento de GABA (proveniente, según el modelo fisiopatológico propuesto, del putamen; figura 9). Las fibras provenientes del putamen son inhibidas cuando el NST está activo. Esta inhibición desaparece una vez que el NST es inhibido eléctricamente, lo que al parecer permite que las fibras putaminales ejerzan su inhibición gabaérgica sobre el GPI. De esta manera, parece descubrirse una interacción entre las vías "directa" e "indirecta" a nivel del GPI (observaciones por publicarse) mediada por alguna interneurona. Esta interacción entre las vías "directa" e "indirecta" no era conocida.

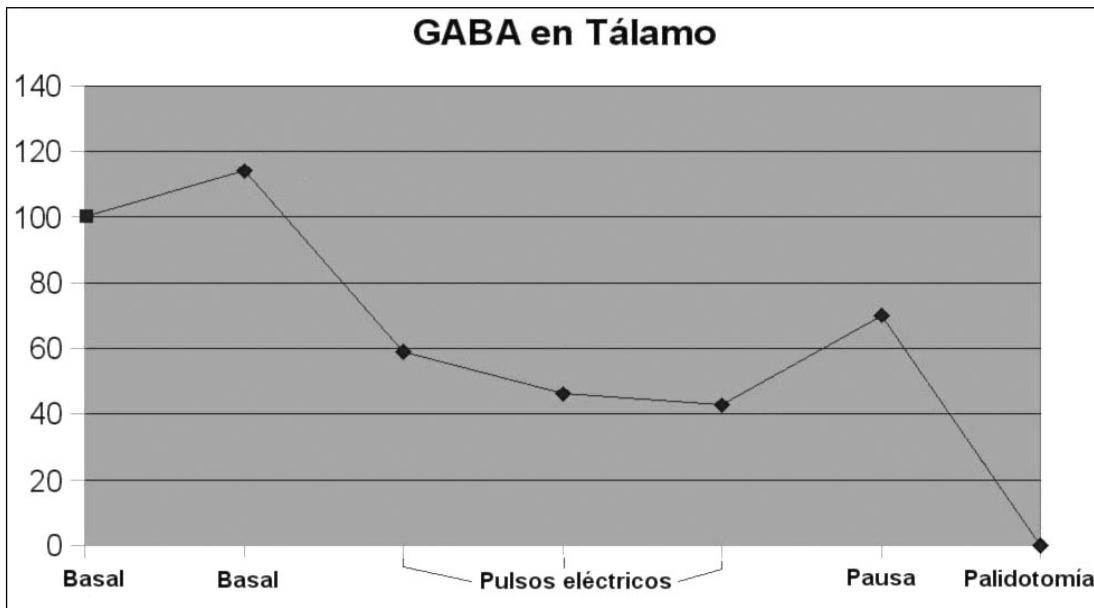


Figura 8. Variaciones de la concentración de GABA en microdializados tomados del núcleo ventrolateral (VL) del tálamo en un paciente operado de palidotomía por enfermedad de Parkinson. Según el modelo fisiopatológico de los ganglios basales de DeLong y Alexander,30-34 la concentración de GABA en el VL, liberado por neuronas procedentes del GPi, debe estar elevado, lo que se confirma al analizar las muestras basales ("basal"). Cuando se aplican impulsos eléctricos de alta frecuencia (inhibitorios; "pulsos eléctricos") en el GPi, el nivel de GABA en el VL disminuye. Luego de la pausa ("pausa"), los valores se recuperan para después disminuir definitivamente, posterior a la destrucción por radiofrecuencia del GPi ("palidotomía").

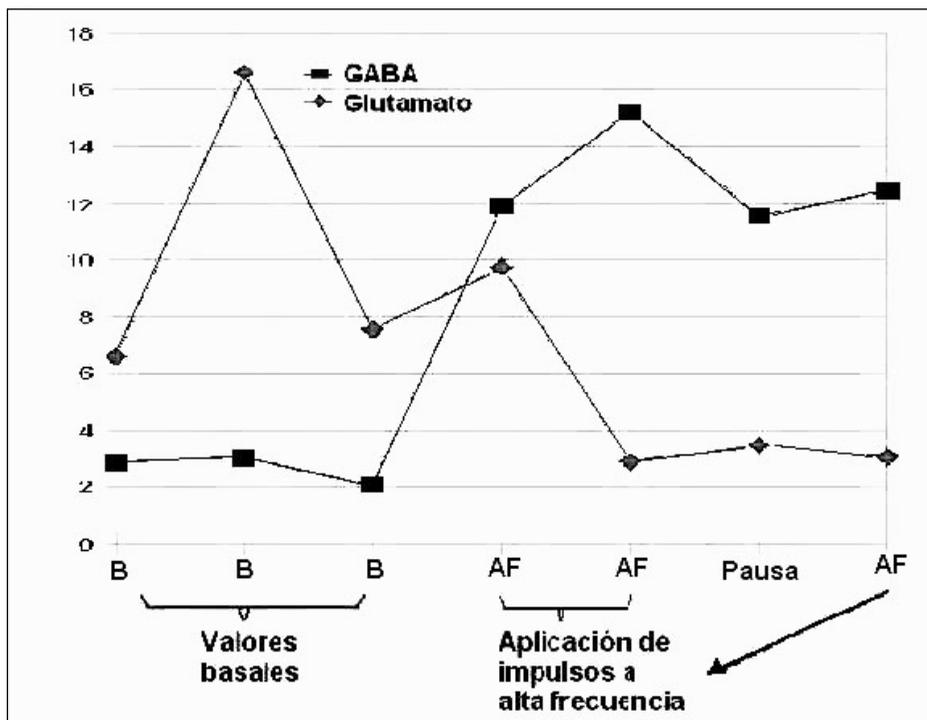


Figura 9. Variaciones de las concentraciones de glutamato (Glu, en rojo, líneas intercaladas con rombos) y GABA (en azul, líneas intercaladas con cuadrados) en microdializados del GPi en un paciente sometido al implante de electrodos de electromodulación en el núcleo subtalámico (NST) por enfermedad de Parkinson. Según el modelo fisiopatológico de los ganglios basales de DeLong y Alexander, la concentración del Glu en el GPi, liberado por neuronas provenientes del NST, debería estar elevado, hecho que se confirma al analizar las muestras basales ("valores basales"). Cuando se aplican impulsos eléctricos de alta frecuencia (inhibitorios; "aplicación de impulsos de alta frecuencia" - "AF" o electroinhibición) en el NST, el nivel de Glu en el GPi disminuye. Luego de la pausa ("pausa") los valores se recuperan, pero después disminuyen cuando se vuelve a aplicar la electroinhibición ("AF") en el NST. Sorprendentemente, la concentración de GABA en el GPi, normalmente liberado allí por los axones del putamen ("vía directa"), aumenta cuando el NST es inhibido. Esta afectación de la vía "directa" cuando se inhibe el NST ("vía indirecta") nos hace pensar que habría una interacción entre estas dos vías a nivel del GPi, probablemente mediada por alguna interneurona.

También tuvimos hallazgos importantes en los procedimientos de psicocirugía: Observamos que los niveles de GABA en el núcleo dorsomediano (DM) del tálamo derecho disminuían discretamente con la cingulotomía izquierda (contralateral) y de manera más acentuada con la cingulotomía derecha (homolateral) (figura 10). Este hallazgo parece confirmar que el TOC tiene su sustrato fisiopatológico en los ganglios basales y que comprende circuitos o vías similares a los somatomotores, en concordancia con la hipótesis de que existen circuitos paralelos en los ganglios basales: somatomotor, límbico y asociativo.

Así pues, podemos especular que el TOC tiene un mecanismo fisiopatológico semejante al de la EP, pues existe una hiperinhibición del tálamo, pero a nivel de su núcleo límbico (el DM), de tipo GABAérgico. Esta hiperinhibición puede ser modificada de alguna manera por la cingulotomía del mismo lado y en menor medida por la del lado opuesto. Es probable que en un futuro próximo encontremos un “blanco” dentro de los ganglios basales que cuando actuemos quirúrgicamente sobre él (mediante la ablación o electromodulación) logremos actuar de una manera más directa sobre la acción inhibitoria del DM y de

este modo podamos tener un mejor control de los síntomas del TOC.

Perspectivas e investigaciones venideras

La mayoría de los trabajos de investigación en neuroquímica se han realizado en animales. Los trabajos en humanos se concentran principalmente en el estudio del trauma craneoencefálico;³⁵⁻⁴⁰ en este campo, se ha estudiado al lactato con el fin de estimar el grado de sufrimiento neuronal. A excepción de un trabajo interesante realizado en Lyon sobre microdiálisis del cuerno posterior de la médula espinal durante la cirugía de DREZ para el tratamiento de la espasticidad y el dolor,⁴¹ y de otros dos efectuados en Estocolmo y Roma, en los que midieron los niveles basales de dopamina, glutamato, GABA y acetilcolina *in vivo*,^{42,43} no existen otros estudios de microdiálisis en neurocirugía funcional y/o en los ganglios basales. Sin embargo, en aquellos trabajos la microdiálisis se hizo en forma estática, es decir, los investigadores se limitaron a describir los elementos encontrados en un momento dado durante la cirugía, sin la aplicación de estímulos eléctricos que puedan causar variaciones.

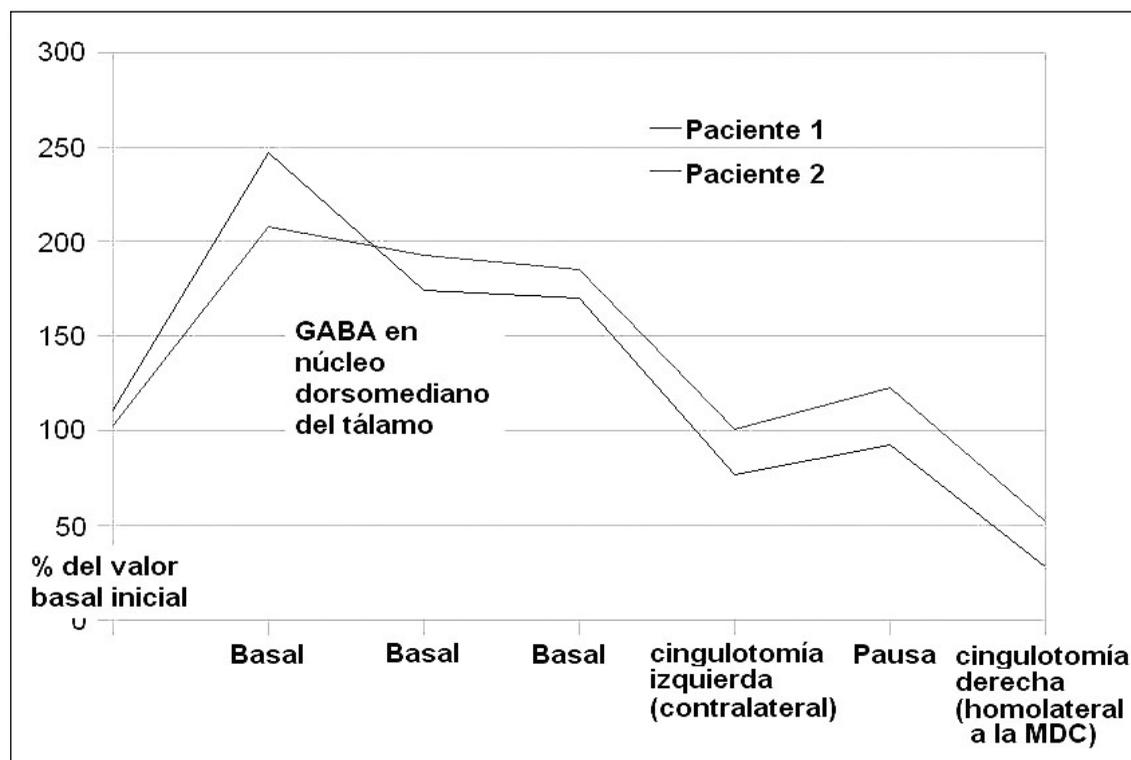


Figura 10. Variaciones de la concentración de GABA en microdiálisis tomados del núcleo dorsomediano del tálamo (DM) en dos pacientes operados de cingulotomía y capsulotomía por trastorno obsesivo compulsivo (TOC). 18 Vemos que el nivel de GABA detectado en el DM derecho (¿proveniente del GPi?) está inicialmente elevado, pero con la cingulotomía izquierda (contralateral) disminuye, y lo hace de manera más acentuada con la cingulotomía derecha (homolateral). Este hallazgo parece confirmar que el TOC tiene su sustrato fisiopatológico en los ganglios basales.

Por el contrario, en nuestros trabajos empleamos la “microdiálisis dinámica”, es decir, medimos los cambios neuroquímicos que ocurren al aplicar estímulos eléctricos. Clásicamente, los hallazgos respecto a los aminoácidos excitatorios e inhibitorios están basados en experimentación farmacológica, estudio de homogenizados *ex vivo*, estudio de receptores mediante el uso de la tomografía por emisión de positrones y estudios electrofisiológicos, pero no en mediciones directas de la liberación de los neurotransmisores.⁴⁴⁻⁴⁶

En otras palabras, la mayoría de los trabajos han sido realizados *post mortem* o se han efectuado empleando la tomografía por emisión de positrones.^{47,48}

Pocos se han orientado a realizar mediciones en forma dinámica aplicando estímulos.⁹⁻¹¹ El aspecto dinámico del estudio es importante si se tiene en cuenta que la fisiología de los ganglios basales está variando constantemente. Hasta ahora, nos hemos centrado en monitorear las concentraciones de Glu y GABA debido a que las aferencias principales a los ganglios basales son glutamatérgicas mientras que las eferencias son fundamentalmente gabaérgicas.

En este sentido, mencionamos como ejemplo el trabajo de Rada,⁹ en el cual se consiguió un descenso significativo del aminoácido GABA en el tálamo de un paciente parkinsoniano. Este descenso se manifestó tanto durante la inhibición con estímulos de alta frecuencia como posterior a la lesión del tálamo. Este resultado sugiere que el paciente parkinsoniano presenta niveles excesivos de GABA en el tálamo y que la mejoría depende, al menos parcialmente, de la disminución de los niveles de este aminoácido, en concordancia con el modelo propuesto.³⁰⁻³⁴

En otro trabajo, también de autoría de Rada y aún no publicado, realizado con animales, se exploró el efecto del haloperidol sobre el funcionamiento y liberación de glutamato en la corteza visual durante la estimulación fótica intermitente. En el mismo se observó que el haloperidol es capaz de disminuir la respuesta glutamatérgica en la corteza visual del animal y esto podría correlacionarse con los hallazgos clínicos en pacientes con EP, en quienes hay disminución de la percepción sensorial.^{49,50}

Resultados esperados en investigaciones venideras

a) Determinar si se repite la disminución de los niveles de GABA en el VL al aplicar impulsos eléctricos de alta

frecuencia, como ha sido reportado previamente en nuestro laboratorio.

b) Probablemente se observe un aumento de los niveles del glutamato en el putamen y caudado en condiciones basales en pacientes con EP y una disminución de los mismos al aplicar impulsos de alta frecuencia eléctrica en el GPI o NST.

c) La lesión de la porción compacta de la sustancia negra (*pars compacta*) en ratas debería producir la disminución de la concentración de glutamato en el GPI, liberado por fibras provenientes del NST.

d) La aplicación de algún antiepiléptico en el NST debería normalizar los síntomas del paciente parkinsoniano, al mismo tiempo que se observa la disminución de los niveles de GABA en el VL.

e) La aplicación de impulsos eléctricos de alta frecuencia en el NST debería reducir las concentraciones de glutamato en el GPI y de GABA en el VL.

Aplicación de los resultados

a) El conocimiento de las conexiones neuronales y los transmisores involucrados en dicho circuito permitirá, en un futuro no muy lejano, crear nuevas terapéuticas farmacológicas para el tratamiento de enfermedades tales como la EP y el TOC.

b) Podría esperarse, en algún momento, que el estudio neuroquímico continuo (monitoreo tipo “Holter” neuroquímico) mediante la microdiálisis cerebral proporcione una prueba diagnóstica de la enfermedad de Parkinson y el TOC, y probablemente de la epilepsia.

c) El estudio neuroquímico nos permitiría diseñar nuevas técnicas quirúrgicas con las que podremos obtener mejores resultados en el tratamiento de la EP y el TOC.

Conclusiones

La microdiálisis cerebral se presenta como una herramienta muy útil para valorar el aspecto neuroquímico de las enfermedades neurológicas. Desde hace décadas, la exploración electrofisiológica ha tomado mucho auge y tenido muchas aplicaciones, pero no se ha sabido explorar el aspecto neuroquímico. Ahora, con esta técnica podemos medir los neurotransmisores y otras sustancias en el líquido extracelular cerebral en forma fidedigna y no cruenta. Tradicionalmente, las mediciones

neuroquímicas sólo se podían realizar sobre el mismo tejido cerebral, extraído y procesado. Con la microdiálisis, estas determinaciones cuantitativas se pueden hacer con el paciente despierto. La información neuroquímica nos ayuda a respaldar las técnicas quirúrgicas y los modelos neurofisiológicos establecidos y a conocer más sobre la enfermedad neurológica. Con el tiempo, la microdiálisis será un procedimiento de uso cotidiano

que la aplicaremos en muchísimas áreas de la neurocirugía. En este trabajo proponemos la existencia de una interacción entre las vías "directa" e "indirecta" de los ganglios basales, gracias a la información obtenida por la microdiálisis. Suponemos que esta interacción debe estar mediada por una interneurona inhibitoria. Esta proposición deberá, obviamente, ser confirmada con estudios que involucren un mayor número de casos.

Homenaje y dedicatoria

Este artículo está dedicado de manera especial al profesor **Luis Hernández**, a quien le rendimos merecido homenaje por su valiosa contribución como pionero e impulsor del continuo desarrollo de la microdiálisis cerebral.

Correspondencia

Sergio A. Sacchettoni. Control 4, Centro Médico-Docente La Trinidad. Av. Intercomunal La Trinidad, El Hatillo, Baruta 1080, Venezuela. Correo electrónico: sacchettoni@gmail.com.

Reconocimiento

Parte de los trabajos mencionados en este artículo fueron o están siendo realizados gracias al financiamiento procedente del Fondo Nacional para la Ciencia y Tecnología (**FONACIT**) de Venezuela, el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (**CDCH**) de la Universidad Central de Venezuela y la Fundación Polar para la Investigación Científica.

Referencias

1. Hernandez L, Paez X, Hamlin C. Neurotransmitters extraction by local intracerebral dialysis in anesthetized rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1983;18(2):159-62.
2. Hernandez L, Lee F, Hoebel BG. Simultaneous microdialysis and amphetamine infusion in the nucleus accumbens and striatum of freely moving rats: increase in extracellular dopamine and serotonin. *Brain Res Bull* 1987;19(6):623-8.
3. Paredes D, Rada P, Bonilla E, Gonzalez LE, Parada M, Hernandez L. Melatonin acts on the nucleus accumbens to increase acetylcholine release and modify the motor activity pattern of rats. *Brain Res* 1999;850(1-2):14-20.
4. Pérez J, Colasante C, Tucci S, Hernández L, Rada P. Effects of feeding on extracellular levels of glutamate in the medial and lateral portion of the globus pallidus of freely moving rats. *Brain Res* 2000;877(1):91-4.
5. Rada PV, Hoebel BG. Supraadditive effect of d-fenfluramine plus phentermine on extracellular acetylcholine in the nucleus accumbens: possible mechanism for inhibition of excessive feeding and drug abuse. *Pharmacol Biochem Behav* 2000;65(3):369-73.
6. Rada PV, Hoebel BG. Aversive hypothalamic stimulation releases acetylcholine in the nucleus accumbens, and stimulation-escape decreases it. *Brain Res* 2001;888(1):60-65.
7. Rada P, Jensen K, Hoebel BG. Effects of nicotine and mecamylamine-induced withdrawal on extracellular dopamine and acetylcholine in the rat nucleus accumbens. *Psychopharmacology (Berl)* 2001;157(1):105-10.
8. Avena NM, Rada P, Moise N, Hoebel BG. Sucrose sham feeding on a binge schedule releases accumbens dopamine repeatedly and eliminates the acetylcholine satiety response. *Neuroscience* 2006;139(3):813-20.
9. Rada P, Tucci S, Teneud L, Paez X, Perez J, Alba G, et al. Monitoring gamma-aminobutyric acid in human brain and plasma microdialysates using micellar electrokinetic chromatography and laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999;735(1):1-10.
10. Sacchettoni SA, Teneud L, Rada P, Hernández L, Villamediana J, Del Corral JF, et al. Microdiálisis en cerebro humano: mediciones extracelulares en tálamo de pacientes con enfermedad de Parkinson. X Congreso Nacional de Neurocirugía. Caracas, Venezuela; 19-22 de mayo 1999.
11. Del Corral JF, Hernández L, Sacchettoni S, García I, Onay D, Teneud L, et al. Microdiálisis cerebral en humanos: experiencia en la enfermedad de Parkinson / Brain microdialysis in human: experienci in the Parkinson disease. *Arch Hosp Vargas* 2000;42(2):93-6.
12. Delgado JM, DeFeudis FV, Roth RH, Ryugo DK, Mitruka BM. Dialytrode for long term intracerebral perfusion in awake monkeys. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1972;198(1):9-21.
13. Delgado JM, Lerma J, Martín del Río R, Solís JM. Dialytrode technology and local profiles of amino acids in the awake cat brain. *J Neurochem* 1984;42(5):1218-28.
14. Ungerstedt U, Hallström A. In vivo microdialysis—a new approach to the analysis of neurotransmitters in the brain. *Life Sci* 1987;41(7):861-4.
15. Müller M. Science, medicine, and the future: Microdialysis. *BMJ* 2002;324(7337):588-91.
16. During MJ, Spencer DD. Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet* 1993;341(8861):1607-10.
17. Páez X, Rada P, Tucci S, Rodríguez N, Hernández L. Capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence detection of amphetamine in the brain. *J Chromatogr A* 1996;735(1-2):263-9.

18. Sacchettoni SA, Del Corral JF, Teneud L, Rojas R, Rada P, Guerrero F, et al. Múltiples blancos cerebrales para la neurocirugía de trastornos obsesivo-compulsivos. *Neurotarget* 2006;1(1):45-8.
19. Hjerten S. Zone-sharpening in paper electrophoresis—a method allowing application of dilute protein solutions. *Biochim Biophys Acta* 1959;32:531-4.
20. Hjerten S. Calcium phosphate chromatography of normal human serum and of electrophoretically isolated serum proteins. *Biochim Biophys Acta* 1959;31(1):216-35.
21. Jorgenson MW, Goodkind RJ. Spectrophotometric study of five porcelain shades relative to the dimensions of color, porcelain thickness, and repeated firings. *J Prosthet Dent* 1979;42(1):96-105.
22. Jorgenson JW, Lukacs KD. Free-zone electrophoresis in glass capillaries. *Clin Chem* 1981;27(9):1551-3.
23. Jorgenson JW, Lukacs KD. Capillary zone electrophoresis. *Science* 1983;222(4621):266-72.
24. Hernandez L, Rossell S, Tucci S, Paredes D, Rada P. Improvement of the temporal resolution of brain microdialysis: sampling in seconds. In: Westerink BHC, editor. *Handbook of Microdialysis*. New York: Elsevier; 2010. In press.
25. Hernandez L, Stanley BG, Hoebel BG. A small, removable microdialysis probe. *Life Sci* 1986;39(26):2629-37.
26. Tucci S, Rada P, Sepúlveda MJ, Hernández L. Glutamate measured by 6-s resolution brain microdialysis: capillary electrophoretic and laser-induced fluorescence detection application. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997;694(2):343-9.
27. Guzman NA, Park SS, Schaufelberger D, Hernandez L, Paez X, Rada P, et al. New approaches in clinical chemistry: on-line analyte concentration and microreaction capillary electrophoresis for the determination of drugs, metabolic intermediates, and biopolymers in biological fluids. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997;697(1-2):37-66.
28. Rada P, Tucci S, Pérez J, Teneud L, Chuecos S, Hernández L. In vivo monitoring of gabapentin in rats: a microdialysis study coupled to capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis* 1998;19(16-17):2976-80.
29. Tucci S, Pinto C, Goyo J, Rada P, Hernández L. Measurement of glutamine and glutamate by capillary electrophoresis and laser induced fluorescence detection in cerebrospinal fluid of meningitis sick children. *Clin Biochem* 1998;31(3):143-50.
30. Alexander GE, DeLong MR, Strick PL. Parallel organizations of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Ann Rev Neurosci* 1986;9:357-81.
31. Alexander GE, Crutcher MD. Functional architecture of basal ganglia circuits; neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* 1990;13:266-71.
32. DeLong MR. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci* 1990;13(7):281-5.
33. Albin RL, Young AB, Penney JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 1989;12(10):366-75.
34. Bergman H, Wichmann T, DeLong MR. Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science* 1990;249(4975):1436-8.
35. Kashiwagi S, Fujisawa H, Yamashita T, Ito H, Maekawa T, Kuroda Y, Tateishi A. Excitotoxic amino acid neurotransmitters are increased in human cerebrospinal fluid after subarachnoid haemorrhage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994;57(11):1442-3.
36. Kanthan R, Shuaib A. Clinical evaluation of extracellular amino acids in severe head trauma by intracerebral in vivo microdialysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995;59(3):326-7.
37. Whittle IR, Piper IR. Clinical evaluation of extracellular amino acids in severe head trauma by intracerebral in vivo microdialysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996;60(6):703.
38. Camputaró LA, Fernández RG. Microdiálisis cerebral en el trauma encefalocraneano. Una ventana al metabolismo neuronal post-injuria. *Rev Ecuat Med Crit* 2001;1(2):57-9. Versión electrónica en Internet [acceso 28 de junio del 2010] disponible en: http://www.medicosecuador.com/espanol/articulos_medicos/54.htm
39. Sarrafzadeh AS, Haux D, Lüdemann L, Amthauer H, Plotkin M, Küchler I, Unterberg AW. Cerebral ischemia in aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a correlative microdialysis-PET study. *Stroke* 2004;35(3):638-43.
40. Vespa P, Bergsneider M, Hattori N, Wu HM, Huang SC, Martin NA, et al. Metabolic crisis without brain ischemia is common after traumatic brain injury: a combined microdialysis and positron emission tomography study. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005;25(6):763-74.
41. Mertens P, Ghaemmaghami C, Bert L, Perret-Liaudet A, Sindou M, Renaud B. Amino acids in spinal dorsal horn of patients during surgery for neuropathic pain or spasticity. *Neuroreport* 2000;11(8):1795-8.
42. Meyerson BA, Linderöth B, Karlsson H, Ungerstedt U. Microdialysis in the human brain: extracellular measurements in the thalamus of parkinsonian patients. *Life Sci* 1990;46(4):301-8.
43. Fedele E, Mazzone P, Stefani A, Bassi A, Ansaldo MA, Raiteri M, et al. Microdialysis in Parkinsonian patient basal ganglia: acute apomorphine-induced clinical and electrophysiological effects not paralleled by changes in the release of neuroactive amino acids. *Exp Neurol* 2001;167(2):356-65.
44. Parent A, Hazrati LN. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Brain Res Rev* 1995;20(1):91-127.
45. Parent A, Hazrati LN. Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res Brain Res Rev* 1995;20(1):128-54.
46. Patsalos PN, Abed WT, Alavijeh MS, O'Connell MT. The use of microdialysis for the study of drug kinetics: some methodological considerations illustrated with antipyrine in rat frontal cortex. *Br J Pharmacol* 1995;115(3):503-9.
47. Ehringer H, Hornykiewicz O. Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system. *Parkinsonism Relat Disord* 1998;4(2):53-7.
48. Birkmayer W, Hornykiewicz O. The effect of 1-3,4-dihydroxyphenylalanine (=DOPA) on akinesia in parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord* 1998;4(2):59-60.
49. Feeney DM, Wier CS. Sensory neglect after lesions of substantia nigra or lateral hypothalamus: differential severity and recovery of function. *Brain Res* 1979;178(2-3):329-46.
50. Selby G. The addition of bromocriptine to long-term dopa therapy in Parkinson's disease. *Clin Exp Neurol* 1989;26:129-39.