



Original

Toxinas unidas a proteínas: valor añadido en su eliminación con altos volúmenes convectivos

Soraya Abad*, Almudena Vega, Borja Quiroga, David Arroyo, Nayara Panizo, Javier Eduardo Reque y Juan Manuel López-Gómez

Servicio de Nefrología, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 27 de mayo de 2015

Aceptado el 4 de mayo de 2016

On-line el 31 de agosto de 2016

Palabras clave:

Hemodiafiltración on-line
Toxinas unidas a proteínas
Alto volumen convectivo
p-cresyl sulfato
Indoxyl sulfato

RESUMEN

La enfermedad renal crónica tiene mayor riesgo de eventos cardiovasculares. En los últimos años, han ido adquiriendo mayor importancia las toxinas unidas a proteínas, que han sido asociadas a mayor morbimortalidad y que se caracterizan por la dificultad para su depuración en diálisis. El objetivo de este estudio es valorar la influencia de altos volúmenes convectivos en HDF-OL posdilucional sobre la eliminación de medianas moléculas, pequeñas moléculas y moléculas unidas a proteínas.

Material y métodos: Se realizaron 40 sesiones de HDF-OL posdilucional en 13 pacientes y se midió el porcentaje de reducción de toxinas de distinto peso molecular y entre ellas, moléculas unidas a proteínas como el p-cresyl sulfato, indoxyl sulfato y homocisteína.

Resultados: El volumen convectivo total fue de 28,3(5,1) litros con un rango entre 16,3 y 38,0 litros. La reducción media de moléculas unidas a proteínas fue de 44,4(15,7) % para el p-cresyl sulfato, de 48,7(14,1) % para el indoxyl sulfato y de 58,6(8,8) % para la homocisteína. Además, se encontró una relación directa y estadísticamente significativa entre el porcentaje de reducción de las tres moléculas con el volumen de sustitución y con el Kt/V.

Conclusión: Altos volúmenes convectivos totales en HDF-OL en posdilución se asocian a una mayor eliminación de toxinas urémicas unidas a proteínas.

© 2016 Sociedad Española de Nefrología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Protein-bound toxins: added value in their removal with high convective volumes

ABSTRACT

Chronic kidney disease is associated with an increased risk of cardiovascular events. In recent years, protein-bound toxins have become more important due to their association with increased morbidity and mortality, characterised by inadequate clearance during dialysis. The purpose of this study is to assess the influence of high convective volumes on postdilution online haemodiafiltration (OL-HDF) on the removal of medium-sized molecules, small molecules and protein-bound molecules.

Keywords:

Online haemodiafiltration
Protein-bound toxins
High convective volumes
p-cresyl sulphate
Indoxyl sulphate

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: sora.abad@gmail.com (S. Abad).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.nefro.2016.05.013>

0211-6995/© 2016 Sociedad Española de Nefrología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Material and methods: In forty postdilutional OL-HDF sessions, the reduction rates of toxins of different molecular weights were measured in 13 patients, including protein-bound molecules such as p-cresyl sulphate, indoxyl sulphate and homocysteine.

Results: Total convective volume was 28.3 (5.1) litres (range 16.3–38.0 litres). Mean reduction rate of protein-bound molecules was 44.4% (15.7%), 48.7% (14.1%) and 58.6% (8.8%) for p-cresyl sulphate, indoxyl sulphate and homocysteine, respectively. Moreover, a statistically significant direct association was found between the reduction rates of all three molecules, the replacement volume and the Kt/V.

Conclusion: High convective volumes during postdilution OL-HDF are associated with increased removal of protein-bound uraemic toxins.

© 2016 Sociedad Española de Nefrología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

La población con enfermedad renal crónica presenta mayor riesgo de eventos cardiovasculares fatales y no fatales que la población general, incluso después de controlar los factores de riesgo cardiovascular tradicionales¹. Las toxinas urémicas son factores de riesgo en los pacientes con enfermedad renal crónica en todos sus estadios².

Las toxinas urémicas se han dividido según el tamaño molecular y su unión a proteínas³. Las pequeñas moléculas se eliminan preferentemente por transporte difusivo, mientras que las moléculas de mediano tamaño se eliminan por transporte convectivo. Recientes estudios demuestran que la hemodiafiltración on-line (HDF-OL) con volúmenes convectivos superiores a 20 litros son capaces de disminuir la mortalidad⁴⁻⁷.

Sin embargo, existe un tercer grupo de toxinas urémicas constituidas por moléculas ligadas a proteínas de pequeño tamaño, entre las que destacan el p-cresyl sulfato, el indoxyl sulfato o la homocisteína, que se asocian a una mayor morbimortalidad cardiovascular en los pacientes con enfermedad renal crónica⁸⁻¹¹ y cuya eliminación con las técnicas convencionales de hemodiálisis o HDF-OL está muy limitada. Algunos autores demuestran que tanto los niveles de p-cresol total como los de p-cresol libre se asocian a eventos cardiovasculares⁹, mientras que otros estudios demuestran que solo niveles elevados de p-cresyl sulfato libre se asocian a mayor mortalidad en pacientes con enfermedad renal crónica en cualquier estadio^{12,13}.

Por otro lado, los modernos monitores de diálisis con capacidad para realizar HDF-OL permiten obtener, mediante sistemas de biocontrol automatizados, volúmenes de sustitución superiores a 25 litros en sesiones de cuatro h y en pacientes con un buen acceso vascular.

El objetivo de este estudio es valorar la influencia de altos volúmenes convectivos en HDF-OL sobre la eliminación de medianas moléculas, pequeñas moléculas y moléculas unidas a proteínas.

Material y métodos

Población y técnica de diálisis

Se trata de un estudio observacional de pacientes en tratamiento renal sustitutivo previo con HDF-OL posdilutional

(HDF-OL pos). Se recogieron datos de 40 sesiones de HDF-OL pos, en 13 pacientes prevalentes con enfermedad renal crónica avanzada en programa de hemodiálisis. En todos los pacientes estudiados, se analizaron los datos de las tres sesiones semanales, salvo en uno, en el que se recogieron cuatro sesiones. Los pacientes firmaron un consentimiento informado. Todos los procedimientos se realizaron según la Declaración de Helsinki y sus revisiones posteriores.

Previo al estudio, todos los pacientes recibían tratamiento con HDF-OL pos. Los monitores que se utilizaron fueron 5008 Fresenius sistema Cordiax[®], AK-200 Gambro con sistema ultracontrol[®] y Artis Gambro[®], en los que la tasa de sustitución se realiza por autocontrol. El dializador que se empleó en todos los casos fue el FX-1000 Cordiax (FMC[®]), fabricado con membrana de helixona[®], con coeficiente de ultrafiltración de 75 mL/h x mmHg, superficie efectiva 2,2 m², grosor de pared 35 μm y diámetro interno de los capilares de 210 μm. La duración de las sesiones de hemodiálisis fue de 240 min.

Se recogieron datos sobre las características de cada sesión: flujo sanguíneo real, presión arterial, presión venosa, ultrafiltración, litros de sustitución, transporte convectivo total, definido como la suma del volumen de sustitución y la ultrafiltración y Kt/V, siendo la K la obtenida por dialisanza iónica y la V analizada mediante bioimpedancia espectroscópica (BMC[®] de FMC, Bad Homburg).

Controles analíticos

Se midió en cada sesión, tanto prediálisis como posdiálisis, la concentración de medianas moléculas (alfa-2-macroglobulina, beta2-microglobulina, prolactina, mioglobina e interleucina 6), la concentración de pequeñas moléculas (urea, creatinina y fósforo) y los niveles de moléculas unidas a proteínas (p-cresyl sulfato total, indoxyl sulfato y homocisteína). Las muestras posdiálisis se obtuvieron una vez finalizada la sesión y antes de retirar las agujas, por la vía arterial.

Las muestras de medianas moléculas, homocisteína y pequeñas moléculas fueron enviadas en el momento de su extracción al laboratorio de bioquímica y fueron analizadas mediante autoanalizador por métodos convencionales. Para la determinación de IL-6, p-cresyl sulfato e indoxyl sulfato, las muestras de suero fueron congeladas a -35 °C y enviadas a un laboratorio externo. La IL-6 se analizó mediante inmunofluorimetría y para la determinación de p-cresyl sulfato

Tabla 1 – Características de las sesiones de hemodiálisis, representado como la media (desviación estándar)

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| Flujo arterial (ml/min) | 426(70) |
| Presión arterial (mmHg) | -190(21) |
| Presión venosa (mmHg) | 170(21) |
| Transporte convectivo total (litros) | 28,3(5,1) |
| Pérdida de peso en sesión (litros) | 1,9(1,0) |

e indoxyl sulfato, las muestras fueron desproteinizadas y el análisis se realizó mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC).

Para valorar la eficacia en la depuración de las moléculas se calculó el porcentaje de reducción de cada una según la fórmula:

$$100 * (\text{concentración plasmática prediálisis} - \text{concentración plasmática posdiálisis corregida}) / \text{concentración plasmática prediálisis}$$

Las concentraciones plasmáticas posdiálisis de moléculas unidas a proteínas y de medianas moléculas, se ajustaron a la hemoconcentración en función de los cambios en el volumen extracelular valoradas por el peso pre- y posdiálisis con arreglo a la ecuación¹⁴:

$$\text{Concentración posdiálisis corregida} = \text{concentración posdiálisis} / [1 + ((\text{peso seco prediálisis} - \text{peso seco posdiálisis}) / (\text{peso posdiálisis} * 0,2))]$$

Análisis estadístico

Las variables cuantitativas se expresaron como la media y su desviación estándar para variables con distribución normal y como mediana y rango intercuartílico para el resto. Las variables cualitativas se expresaron como porcentajes.

La comparación de medias se realizó mediante el test t de student o con el análisis de la varianza ANOVA cuando se trataba de más de dos muestras. Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson para valorar las correlaciones bivariadas entre variables cuantitativas. Se consideró estadísticamente significativo si $p < 0,05$. Para ello se utilizó el programa estadístico SPSS V.17.0 (Chicago, Illinois).

Resultados

Las características de las sesiones de hemodiálisis se recogen en la [tabla 1](#).

El volumen convectivo total fue de 28,3(5,1) litros con un rango entre 16,3 y 38,0 litros. El 85% de los pacientes se dializaban por FAV, mientras que el 15% restante se dializaban a través de un catéter permanente tunelizado. El flujo arterial medio fue de 426(70) ml/min con un rango de 250 y 500 ml/min.

La [tabla 2](#) muestra el porcentaje de reducción de las moléculas en la sesión de diálisis y su correlación con el transporte convectivo.

En la depuración de pequeñas moléculas, el Kt/V medio fue de 1,76(0,64). Los porcentajes de reducción de creatinina y de

urea mostraron una correlación significativa con el volumen convectivo total ($p < 0,001$ y $p < 0,050$ respectivamente), mientras que la reducción de fósforo no mostraba correlación con el volumen convectivo.

La reducción de medianas y grandes moléculas en HDF-OL fue muy variable, oscilando entre el 81,3% para la beta-2 microglobulina y una reducción de -2,2% para el caso de la alfa-2 macroglobulina. Encontramos una correlación significativa entre la tasa de reducción de beta-2 microglobulina, prolactina y mioglobina con el volumen convectivo total, mientras que no había correlación entre los niveles de IL-6 y alfa-2 macroglobulina con el volumen convectivo.

El porcentaje de reducción de moléculas unidas a proteínas se correlacionó de forma significativa con el volumen convectivo total en todas las moléculas analizadas ([tabla 2](#)). Asimismo, la reducción de las tres moléculas se correlacionó con el Kt/V ($r = 0,425$, $p = 0,014$ para homocisteína; $r = 0,554$, $p = 0,009$ para p-cresyl sulfato y $r = 0,579$, $p = 0,006$ para indoxil sulfato). Por otro lado, el porcentaje de unión a proteínas de las moléculas analizadas (70% para la homocisteína¹⁵, 90% para el indoxil sulfato¹⁶ y 95% para el p-cresol¹⁶) mostró una tendencia de relación inversa con el porcentaje de reducción de estas moléculas ($r = -0,996$, $p = 0,058$). En la [figura 1](#) se representa la relación lineal entre las moléculas unidas a proteínas analizadas y el volumen convectivo total.

Discusión

Nuestro estudio demuestra que altos volúmenes de transporte convectivo en HDF-OL se asocian a una mayor depuración de toxinas unidas a proteínas y se confirma una mayor eliminación de moléculas de pequeño y mediano tamaño, como ha sido demostrado en otros estudios.

La importancia de la eliminación de estas toxinas unidas a proteínas ha aumentado en los últimos años, a medida que se ha ido conociendo la asociación entre los niveles séricos elevados y el aumento del riesgo cardiovascular^{11,13,17}. Dos de las moléculas unidas a proteínas más estudiadas, tanto en su metabolización como en sus acciones, son el p-cresol y el indoxil-sulfato.

El p-cresol, se genera en la flora intestinal y posteriormente es metabolizado a p-cresylsulfato y p-presylglucuronida. Ambas moléculas se encuentran fuertemente unidas a proteínas¹⁸. El p-cresylsulfato libre (no unido a proteínas) parece que se asocia con mortalidad global y cardiovascular tanto en pacientes con enfermedad renal crónica como en diálisis¹⁰. La p-cresylglucuronida libre, el otro metabolito del p-cresol, también se asocia con mortalidad cardiovascular en pacientes con enfermedad renal crónica¹⁹.

El indoxil-sulfato pertenece a la familia de los indoles, también forma parte de las toxinas unidas a proteínas y se ha asociado también a daño endotelial y mortalidad global y cardiovascular, así como a calcificaciones vasculares¹⁰.

El problema de las toxinas unidas a proteínas radica en la dificultad para su eliminación con las técnicas convencionales de diálisis. Se han realizado diversos estudios con diferentes terapias de depuración y con diferentes resultados. Meert et al. comparan HDF-OL pre- y posdilucional con hemofiltración predilucional, encontrando una mayor reducción de

Tabla 2 – Correlaciones bivariadas entre el transporte convectivo total y el porcentaje de reducción de moléculas, representado como la media (desviación estándar)

| Moléculas (PM Da) | Niveles séricos prediálisis | % de reducción | Coefficiente de correlación de Pearson | p |
|---|-----------------------------|----------------|--|--------|
| <i>Moléculas de bajo peso molecular</i> | | | | |
| Fósforo (31) | 4,2(1,5 mg/dl) | 57,1(17,3) | -0,004 | 0,981 |
| Urea (60) | 121(40 mg/dl) | 79,0(23,12) | 0,320 | <0,050 |
| Creatinina (113) | 9,6(3,7) mg/dl | 75,9(7,8) | 0,678 | <0,001 |
| <i>Moléculas de mediano y gran peso molecular</i> | | | | |
| Beta-2 microglobulina (11.800) | 23(7) mg/l | 81,3(6,4) | 0,607 | <0,001 |
| Mioglobina (17.000) | 236(114) ng/mL | 60,0(11,5) | 0,431 | <0,010 |
| Prolactina (22.000) | 28(22) µg/l | 60,1(14,3) | 0,395 | <0,050 |
| Interleucina-6 (26.000) | 5,6(3,0) pg/ml | 28(17,2) | 0,113 | 0,613 |
| Alfa-2 macroglobulina (72.000) | 153(30) mg/dl | -2,2(12,2) | 0,270 | 0,960 |
| <i>Moléculas unidas a proteínas</i> | | | | |
| Homocisteína (135) | 26,8(9,5) µmol/l | 58,6(8,8) | 0,492 | <0,005 |
| p-Cresyl-sulfato (187) | 13,7(3,7) mg/dl | 44,4(15,7) | 0,630 | <0,001 |
| Indoxyl-sulfato (212) | 42,2(14,9) mg/l | 48,7(14,1) | 0,461 | <0,050 |

toxinas unidas a proteínas en las dos modalidades de HDF-OL que en hemofiltración predilucional, aunque sin diferencias entre HDF-OL pre- y HDF-OL pos²⁰. En cambio, Bammens et al. demuestran una mayor eliminación de toxinas unidas a proteínas en HDF-OL posdilución, con un transporte

convectivo equivalente a unos 20 litros (flujo de sustitución de 87 ml/min durante 230 min por sesión), que con hemodiálisis de alto flujo²¹. Sin embargo, otros autores encuentran, en solo ocho pacientes, que volúmenes medios de sustitución de 21,5 litros tienen escasa importancia en la eliminación de

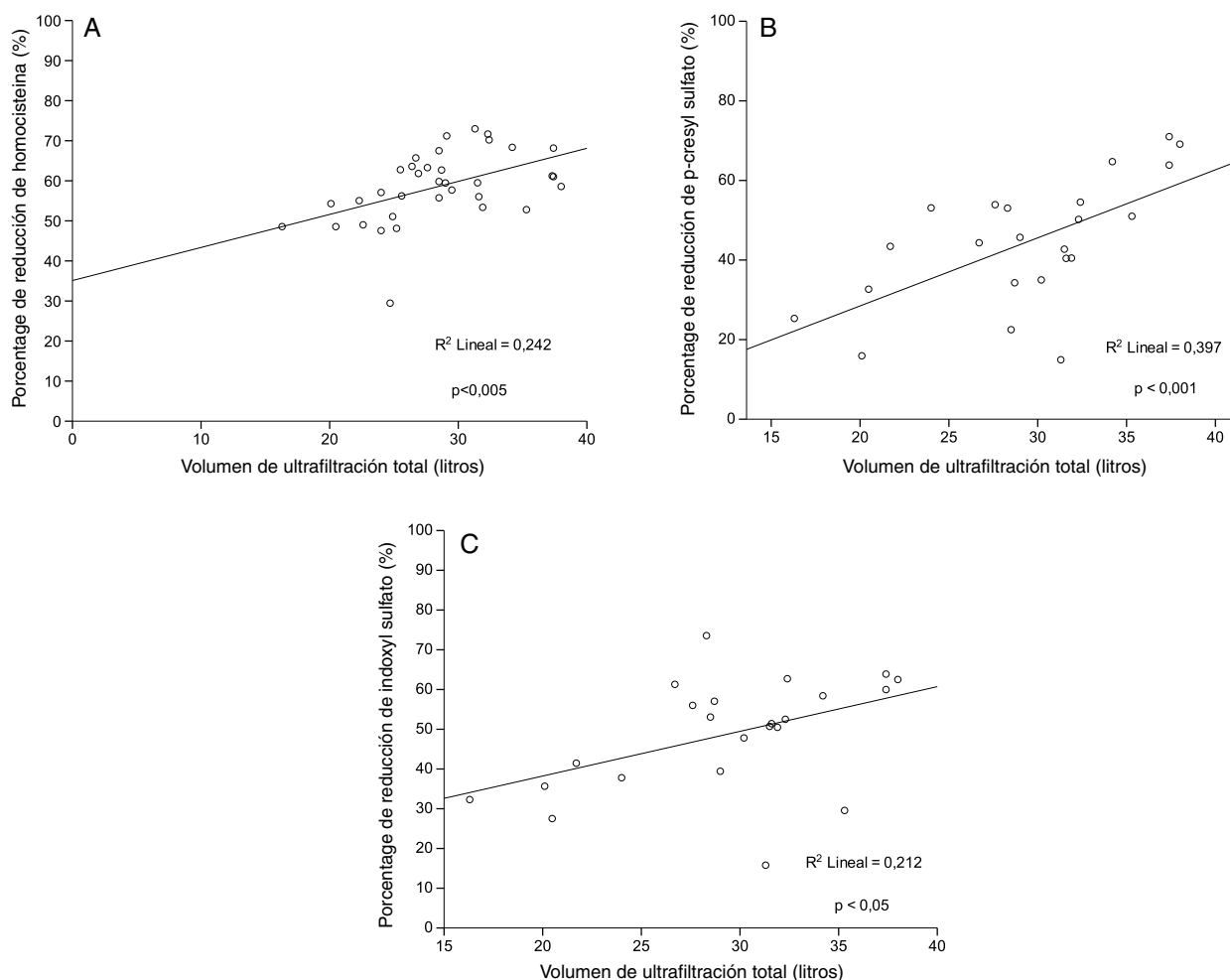


Figura 1 – Correlación entre el porcentaje de reducción de moléculas unidas a proteínas y el volumen convectivo total. Reducción de homocisteína A); reducción de p-cresyl sulfato B) y reducción de indoxyl sulfato C).

estos solutos²². Nuestros resultados demuestran que volúmenes medios de sustitución superiores en un 40% a estos datos consiguen aumentar significativamente la eliminación de este tipo de toxinas.

Los tres solutos unidos a proteínas estudiados tienen un peso molecular parecido, pero con un porcentaje de unión a proteínas diferente, siendo de un 70, 90 y 95% para la homocisteína, el indoxyl-sulfato y el p-cresyl sulfato respectivamente^{15,16}. Encontramos que la reducción porcentual de estas moléculas tiende a ser inversamente proporcional a la unión a proteínas, de modo que el p-cresyl sulfato, que es el soluto con unión más estrecha a proteínas, es el que más dificultad presenta para su eliminación por convección, mientras que la homocisteína es la que muestra una mayor reducción porcentual. No obstante, es importante destacar que las tres toxinas estudiadas presentan una correlación directa con el volumen convectivo, con un coeficiente de correlación más alto para el caso del p-cresyl sulfato. Se ha sugerido que la eliminación de las toxinas unidas a proteínas se realiza casi exclusivamente por la eliminación de la fracción libre, de modo que durante la sesión de diálisis, se produce un desplazamiento de la fracción ligada a proteínas a su forma libre, con lo que se permite que estas toxinas atraviesen la membrana²¹. Es evidente que en nuestro estudio, la depuración de pequeñas moléculas es elevada, como consecuencia de la suma de los transportes convectivo y difusivo. El resultado puede ser una mayor eliminación de la fracción libre de las toxinas ligadas a proteínas, lo que puede aumentar el desplazamiento de la fracción ligada a proteínas a la fracción libre y con ello, permitir continuar con la eliminación. No obstante, esta hipótesis necesitaría confirmación.

Recientemente, han aparecido algunos estudios esperanzadores, que demuestran que la incorporación de resinas con capacidad de eliminación por adsorción de las moléculas ligadas a proteínas puede tener un efecto sumatorio a la eficacia de las técnicas convencionales. Así, la hemodiafiltración con regeneración del ultrafiltrado mediante adsorción con resina (HFR, Bellco®), que combina la adsorción con transporte convectivo y reinfusión del propio ultrafiltrado, ha mostrado también efectividad en la eliminación de toxinas unidas a proteínas²³⁻²⁵. No obstante son necesarios más estudios para valorar la cantidad de resina que es preciso incorporar a la técnica para evitar su saturación prematura.

Se han realizado también estudios con absorbentes, que han demostrado disminución en los niveles de estas toxinas²⁶ aunque no de forma significativa y sobre todo, en estudios *in vitro*. Por otro lado, el uso de probióticos y simbióticos ha demostrado capacidad para reducir los niveles toxinas unidas a proteínas^{26,27}. Más recientemente se ha demostrado que aumentando el contenido de fibra de la dieta de pacientes en hemodiálisis, es también posible disminuir los niveles de indoxyl sulfato y posiblemente de p-cresol sulfato²⁸.

Tres estudios controlados y randomizados realizados en los últimos años han demostrado un aumento de la supervivencia en los pacientes en tratamiento con HDF-OL pos con volúmenes de sustitución superiores a 17,4, 20,7 y 22 litros respectivamente⁵⁻⁷, en posible relación con una mayor

depuración de toxinas urémicas, especialmente de mediano tamaño, aunque con los hallazgos encontrados en nuestro estudio, es posible que esta disminución de la morbimortalidad sea en parte también debida a la mayor depuración de toxinas unidas a proteínas.

Los modernos monitores de diálisis con posibilidad de realizar HDF-OL incorporan sistemas de biocontrol automáticos, que permiten obtener volúmenes de sustitución superiores a 25 litros en sesiones de cuatro h. Para ello, es preciso disponer de un buen acceso vascular y preferentemente el empleo de agujas 14G, con el fin de aumentar el flujo de sangre. En nuestro estudio, el flujo de sangre medio fue de 426 ml/min, lo que permite dializar más de 100 litros de sangre en una sesión de cuatro h y alcanzar un volumen convectivo superior a 28 litros de media sin problemas técnicos (fracción de filtración aproximada de 28%). Sin embargo, uno de los mayores frenos para el aumento del transporte convectivo es que no se han cuantificado todas las sustancias potencialmente beneficiosas que se pueden eliminar con el ultrafiltrado, como pueden ser los aminoácidos, oligoelementos, vitaminas, antioxidantes y otros nutrientes, cuya relevancia clínica es todavía desconocida.

Las posibles pérdidas de albúmina es uno de los aspectos más estudiados. Estas pérdidas tienen lugar especialmente durante los primeros 30 min de cada sesión^{29,30}. No obstante, recientes estudios demuestran que las pérdidas son mayores en hemodiafiltración que en hemodiálisis y que dependen del tipo de dializador elegido^{22,31}. La incorporación de la nanotecnología en la fabricación de los dializadores más modernos ha permitido modificar las características de los poros de las membranas, de modo que estas pérdidas sean mucho menores³⁰ y con escaso significado clínico. En un estudio previo, encontramos que las pérdidas de albúmina con el dializador empleado en este estudio son escasas, aunque con diferencias significativas entre volúmenes de sustitución de 20 y 30 litros por sesión.

En nuestros resultados, encontramos que el porcentaje de disminución de los niveles de alfa-2 macroglobulina, con un PM de 72.000 daltons, es ligeramente negativo a pesar de haber ajustado los niveles posdiálisis a la hemoconcentración, lo que indica que no se elimina o lo hace muy escasamente.

El estudio presenta algunas limitaciones como son el reducido número de sesiones analizadas, que solo determinamos la tasa de reducción en toxinas unidas a proteínas sin medir las pérdidas por el dializado y el hecho de haber empleado un único tipo de dializador, aunque escogimos un dializador con unas características adecuadas a la técnica empleada³².

En resumen, nuestro estudio demuestra que con altos volúmenes de transporte convectivo se puede lograr una mayor eliminación de moléculas ligadas a proteínas. No obstante, son necesarios más estudios con capacidad para confirmar nuestra hipótesis y analizar el posible efecto que esta conducta puede tener a más largo plazo en la evolución de los pacientes así tratados.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Foley RN, Parfrey PS, Samak MJ. Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *J. Am. Soc Nephrol.* 1998;9:S16-23.
2. Vanholder R, Baurmeister U, Brunet P, Cohen G, Glourieux G, Jankowski J, European Uremic Toxin Work Group. A bench to bedside view of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19, 863-702.
3. Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, Argilés A, Baurmeister U, Brunet P, et al. Review on uremic toxins: Classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int.* 2003;63:1934-43.
4. Canaud B, Bragg-Gresham JL, Marshall MR, Desmeules S, Gillespie BW, Depner T, et al. Mortality risk for patients receiving hemodiafiltration versus hemodialysis: European results from the DOPPS. *Kidney Int.* 2006;69:2087-93.
5. Maduell F, Moreso M, Pons M, Ramos R, Mora-Macià J, Carreras J, et al. High-efficiency postdilution online hemodiafiltration reduces all-cause mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24:487-97.
6. Ok E, Asci G, Toz H, Ok ES, Kircelli F, Yilmaz M, et al. On behalf of the 'Turkish Online Haemodiafiltration Study': Mortality and cardiovascular events in online haemodiafiltration (OL-HDF) compared with high-flux dialysis: Results from the Turkish OL-HDF Study. *Nephrol Dial Transplant.* 2013;28:192-202.
7. Grooteman MPC, van den Dorpel MA, Bots ML, Penne EL, van der Weerd NC, et al., CONTRAST Investigators. Effect of online hemodiafiltration on all-cause mortality and cardiovascular outcomes. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23: 1087-96.
8. Bammens B, Evenepoel P, Keuleers H, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Free serum concentrations of the protein-bound retention solute p-cresol predict mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2006;69:1081-7.
9. Lin CJ, Wu CJ, Pan CF, Chen YC, Sun FJ, Chen HH. Serum protein-bound uraemic toxins and clinical outcomes in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25:3693-700.
10. Barreto FC, Barreto DV, Liabeuf S, Meert N, Glorieux G, Temmar M, et al. Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009;4:1551-8.
11. Meijers BK, Claes K, Bammens B, de Loo H, Viaene L, VerBeke C, et al. P-cresol and cardiovascular risk in mild-to-moderate kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010;5:1182-9.
12. Liabeuf S, Barreto DV, Barreto FC, Meert N, Glorieux G, Schepers E, et al. Free p-cresylsulphate is a predictor of mortality in patients at different stages of chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25:1183-91.
13. Meijers BK, Bammens B, De Moor B, Verbeke K, Vanrenterghem Y., Evenepoel P. Free p-cresol is associated with cardiovascular disease in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2008;73:1174-80.
14. Bergström J, Wehle B. No change in corrected beta 2-microglobulin concentration after cuprophane haemodialysis. *Lancet.* 1987;1:628-9.
15. Refsum H, Helland S, Ueland PM. Radioenzymic determination of homocysteine in plasma and urine. *Clin Chem.* 1985;31:624-8.
16. Itoh Y, Ezawa A, Kikuchi K, Tsuruta Y, Niwa T. Protein-bound uremic toxins in hemodialysis patients measured by liquid chromatography/tandem mass spectrometry and their effects on endothelial ROS production. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012;403:1841-50.
17. Wang CP, Lu LF, Yu TH, Hung WC, Chiu CA, Chung FM, et al. Serum levels of total p-cresylsulphate are associated with angiographic coronary atherosclerosis severity in stable angina patients with early stage of renal failure. *Atherosclerosis.* 2010;211:579-83.
18. De Loo H, Bammens B, Evenepoel P, De Preter V, Verbeke K. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis for measurement of p-cresol and its conjugated metabolites in uremia and normal serum. *Clin Chem.* 2005;51:1535-8.
19. Meert N, Schepers E, Glorieux G, Van Landschoot M, Goeman JL, Waterloos MA, et al. Novel method for simultaneous determination of p-cresylsulphate and p-cresylglucuronide: Clinical data and pathophysiological implications. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27:2388-96.
20. Meert N, Eloit S, Waterloos M-A, Van Landschoot M, Dhondt A, Glorieux G, et al. Effective removal of protein-bound uraemic solutes by different convective strategies: a prospective trial. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24:562-70.
21. Bammens B, Evenepoel P, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Removal of the protein-bound solute p-cresol by convective transport: a randomized crossover study. *Am J Kidney Dis.* 2004;44:278-85.
22. Krieter DH, Hackl A, Rodriguez A, Chenine L, Moragues HL, Lemke HD, et al. Protein-bound uraemic toxin removal in haemodialysis and post-dilution haemodiafiltration. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25:212-8.
23. Evenepoel P, Laleman W, Wilmer A, Claes K, Maes B, Kuypers D, et al. Detoxifying capacity and kinetics of prometheus: A new extracorporeal system for the treatment of liver failure. *Blood Purif.* 2005;23:349-58.
24. Calo LA, Naso A, Carraro G, Wratten ML, Pagnin E, Bertipaglia L, et al. Effect of haemodiafiltration with online regeneration of ultrafiltrate on oxidative stress in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2007;22:1413-9.
25. Riccio E, Cataldi M, Minco M, Argentino G, Russo R, Brancaccio S, et al. Evidence that p-cresol and IL-6 are adsorbed by the HFR cartridge: towards a new strategy to decrease systemic inflammation in dialyzed patients? *PLoS One.* 2014;9.
26. Vitetta L, Linnane AW, Glenda C. Gobe From the Gastrointestinal Tract (GIT) to the kidneys: live bacterial cultures (probiotics) mediating reductions of uremic toxin levels via free radical signaling. *Toxins.* 2013;5:2042-57.
27. Nakabayashi I, Nakamura M, Kawakami K, Ohta T, Kato I, Uchida K, et al. Effects of synbiotic treatment on serum level of p-cresol in haemodialysis patients: a preliminary study. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26:1094-8.
28. Sirich TL, Plummer NS, Gardner CD, Hostetter TH, Meyer TW. Effect of increasing dietary fiber on plasma levels of colon-derived solutes in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014;9:1603-10.
29. Yamashita AC, Sakirai K. Choice of dialyzers for HDF. *Contrib Nephrol.* 2011;168:146-52.
30. Vega A, Quiroga B, Abad S, Aragoncillo I, Arroyo D, Panizo N, et al. Albumin leakage in online hemodiafiltration, more convective transport, more losses? *Ther Apher Dial.* 2014;3 (Publicación electrónica).
31. Pedrini LA, Gmerek A, Wagner J. Efficiency of post-dilution hemodiafiltration with a high-flux α -polysulfone dialyzer. *Int J Artif Organs.* 2011;34:397-404.
32. Luo FJ, Patel KP, Marquez IO, Plummer NS, Hostetter TH, Meyer TW. Effect of increasing dialyzer mass transfer area coefficient and dialysate flow on clearance of protein-bound solutes: a pilot crossover trial. *Am J Kidney Dis.* 2009;53:1042-9.