

Retención de moléculas medias urémicas en la insuficiencia renal crónica

M. García García, E. Merola *, A. Cases, J. M. Pons, M. Carrera, P. Arrizabalaga, A. Balagué * y Ll. Revert

Servicio de Nefrología. * Laboratorio de Bioquímica.
Hospital Clínic i Provincial. Universidad de Barcelona. Barcelona.

RESUMEN

El objetivo de este estudio ha sido examinar la retención de moléculas medias urémicas en distintos grados de insuficiencia renal crónica.

Han sido estudiados 44 pacientes, 20 en programa de hemodiálisis y 24 con un grado variable de insuficiencia renal crónica (IRC), cuyas creatininas plasmáticas variaban de 1,4-13,4 mg/dl ($5,2 \pm 3,7$) ($\bar{x} \pm DE$). Las moléculas medias fueron aisladas del plasma urémico antes de la hemodiálisis. En los pacientes con insuficiencia renal crónica las moléculas medias fueron determinadas en plasma y orina de veinticuatro horas. Los niveles plasmáticos y el aclaramiento renal de las fracciones de moléculas medias fueron comparados con la creatinina plasmática y el aclaramiento de creatinina medidos simultáneamente. Las moléculas medias fueron aisladas por gel filtracin en Sephadex G-15 y posteriormente separadas por cromatografía de intercambio iónico en Sephadex DEAE A-25.

Los resultados mostraron que la retención de las fracciones de moléculas medias cuantificadas (2.2, 2.3 y 2.4) comienzan a detectarse en plasma a partir de creatininas plasmáticas de 2 mg/dl. Hubo una correlación significativa entre las fracciones de moléculas medias y la creatinina plasmática. Los aclaramientos de las fracciones de las moléculas medias urémicas fueron menores que el aclaramiento de creatinina.

De nuestro estudio concluimos que la retención de MM comienza a partir de IRC moderada y prosigue su incremento en función del grado de deterioro renal. Además, nuestros resultados sugieren una reabsorción tubular renal de moléculas medias, especialmente para la fracción 2.4.

Palabras clave: **Insuficiencia renal crónica. Moléculas medias endógenas. Aclaramiento de fracciones de moléculas medias.**

RETENTION OF MIDDLE MOLECULES IN CHRONIC RENAL FAILURE

SUMMARY

The aim of this study has been to evaluate the retention of uremic middle molecules in several degrees of chronic renal failure.

Forty-four patients have been studied, 20 in periodic hemodialysis and 24 with chronic renal failure with plasma creatinine levels between 1.4-13.4 mg/dl (5.2 ± 3.7) ($\bar{x} \pm SD$). Middle molecules were isolated from uremic plasma before

Recibido: 24-I-1989.
En versión definitiva: 6-VII-1989.
Aceptado: 18-VIII-1989.

Correspondencia: Dr. M. García García.
Servicio de Nefrología.
Hospital Clínic i Provincial.
Villarroel, 170.
08036 Barcelona.

hemodialysis. In patients with chronic renal failure middle molecules were determined in plasma and 24 hour urine samples. The plasma level and the renal clearance of middle molecule fractions were compared to simultaneously measured endogenous creatinine clearance and plasma creatinine concentration. The middle molecules were isolated by gel filtration on Sephadex G-15 and further separated by ion exchange chromatography on DEAE Sephadex A-25.

Our results show that the retention of the three middle molecule fractions that we have measured (2.2, 2.3 and 2.4), begins from plasma creatinine levels of 2 mg/dl. There was a significant correlation between the middle molecule fractions and plasma creatinine value. The renal clearance of middle molecule fractions was smaller than that of endogenous creatinine.

We conclude that the retention of middle molecules starts from slight chronic renal failure and increases in correlation with the severity of the impairment of chronic renal failure. Moreover, our results suggest a renal tubular reabsorption of middle molecules, especially for fraction 2.2.

Key words: Chronic renal failure. Uremic middle molecules. Clearance of middle molecule fractions.

Introducción

La insuficiencia renal crónica conduce a una acumulación de múltiples sustancias químicas. Las sustancias acumuladas comprenden un amplio espectro de distinto peso molecular, cuya participación como agente tóxico continúa siendo motivo de investigación. A las sustancias de pequeño peso molecular, como la urea, creatinina y ácido úrico, se les concede mínima participación en las manifestaciones del síndrome urémico. Por el contrario, las denominadas moléculas medias, definidas como sustancias que se comportan con las membranas de diálisis como si su peso molecular fuese de 300-2.000 daltons¹, han sido motivo de gran interés y controversia en la patogénesis de múltiples manifestaciones del síndrome urémico²⁻⁴. Además, se les ha concedido un papel relevante en las estrategias de diálisis que se ha manifestado a través del concepto de índice de diálisis como forma de definir una cantidad de hemodiálisis necesaria⁵, mediante la potenciación de membranas de alta permeabilidad⁶, hemoperfusión⁷, hemofiltración⁸, hemodiafiltración⁹, hemodiaperfusión¹⁰ o diálisis peritoneal continua ambulatoria¹¹.

A las moléculas medias urémicas, debido a que constituyen un conglomerado de sustancias, no se les puede dar el calificativo de toxina urémica por no corresponder a una sustancia químicamente identificable¹². No obstante, dentro de este conjunto de moléculas medias sí se ha identificado un componente a quien se ha atribuido efectos específicos, se trata del pico b₄₋₂ o pico 2.2 de Cueille^{13, 14}, que se correlacionaba con la polineuritis urémica³.

Los estudios sobre la retención de las moléculas medias urémicas en distintos grados de insuficiencia renal han sido escasos debido a lo laborioso de su

determinación y a su especial polarización al tratamiento sustitutivo renal.

El objetivo de nuestro estudio ha sido examinar la retención de las moléculas medias urémicas en distintos grados de insuficiencia renal crónica para determinar cuándo comienza su retención en plasma, cómo se comporta su aclaramiento renal y cuándo alcanza los niveles propios de los pacientes en hemodiálisis.

Material y métodos

Han sido estudiados 44 pacientes, 24 con un grado variable de insuficiencia renal crónica y 20 en programa de hemodiálisis periódica.

Los pacientes con insuficiencia renal crónica que no estaban en diálisis tenían una edad de $53,5 \pm 17,8$ años; 15 eran varones y nueve hembras. La etiología de su insuficiencia renal era: glomerulonefritis crónica, cuatro pacientes; pielonefritis crónica, cuatro; nefroangiosclerosis, seis; nefropatía intersticial, cinco; poliquistosis renal, una; amiloidosis, una, e insuficiencia renal de etiología no aclarada, cuatro pacientes. Los pacientes en hemodiálisis periódica tenían una edad de $49,6 \pm 21,3$ años, 12 varones y ocho hembras, con un tiempo medio en hemodiálisis de $54,2 \pm 48,3$ meses, un peso seco de $62,3 \pm 8,7$ kg y sin función renal residual. Las hemodiálisis periódicas que recibían estos pacientes eran de tipo convencional, caracterizadas por emplear filtro de cuprofán (C.F. 15.11-Travenol), flujo sanguíneo de 250 ml/min, flujo de líquido de diálisis de 550 ml/min, solución de diálisis con concentración de sodio de 139 mmol/l y tampón de bicarbonato de 39 mmol/l y duración de cuatro horas. La etio-

logía de su insuficiencia renal era: glomerulonefritis crónica, cuatro pacientes; pielonefritis crónica, dos; nefritis intersticial, uno; poliquistosis renal, tres; nefroangiosclerosis, cuatro, e insuficiencia renal de etiología no aclarada, seis pacientes.

La medicación asociada fue: furosemida, 19 pacientes; atenolol, seis; nifedipina, ocho; captopril, 10; metoprolol, 10; prazosín, tres; hidroclorotiazida, dos; alopurinol, 10; calcitriol, 20; clofibrato, 12, e hidróxido de aluminio, 30 pacientes. Ningún paciente tomó aspirina las noventa y seis horas anteriores a la extracción de sangre para el examen. Los pacientes permanecieron veinticuatro horas sin medicación antes de la extracción sanguínea para determinar moléculas medias urémicas. En los pacientes con insuficiencia renal crónica sin diálisis se determinaron moléculas medias en sangre y en orina de veinticuatro horas para determinar aclaramientos; asimismo, también se determinó simultáneamente creatinina plasmática, aclaramiento de creatinina y proteinuria. En los pacientes en hemodiálisis periódica se practicó extracción para determinar moléculas medias urémicas prehemodiálisis correspondiente a período interdiálisis corto.

Determinación de moléculas medias urémicas

Las moléculas medias se determinaron con técnica de doble cromatografía, siguiendo el método de Cueille¹⁵ con alguna pequeña modificación. Inicialmente el suero fue ultrafiltrado para eliminar aquellas moléculas de peso molecular elevado que interfieren en la gel filtración. La ultrafiltración del suero diluido 1:2 con Cl Na 0,015 M se realizó con membranas cónicas Amicon Centriflo C F 50 (cut of 50.000 daltons), centrifugándose a 1.000 × g sesenta minutos y 3°C. Las orinas fueron procesadas directamente.

La separación según pesos moleculares se realizó por gel filtración con Sephadex G-15, en columnas de vidrio de 70 × 0,8 cm. El eluyente utilizado fue Na₂ SO₄, 2,4 mM, pH 7,0, a un flujo de 36 ml/h producido por una bomba peristáltica P-1 (Pharmacia, Upsala, Suecia). La monitorización del elusivo se realizó con un detector de onda fija UV-1 (Pharmacia) a 254 nm, registrándose el cromatograma y recogiendo el elusivo en fracciones de 1,2 ml. Se utilizaron como marcadores de peso molecular: angiotensina I (peso molecular = 1.400 daltons) (Sigma), vitamina B₁₂ (peso molecular, 1.345 daltons) (Sigma), seroalbúmina humana (peso molecular, 64.000 daltons) (Kabi), urea (peso molecular, 60,5 daltons) y creatinina (peso molecular, 116 daltons) (Merck).

La zona correspondiente a las moléculas medias, con un volumen de elución entre 20 y 24,8 ml, fue recogida y sometida a cromatografía de intercambio iónico que se realizó sobre dos columnas idénticas,

una de referencia y otra de muestra para evitar la deriva de la línea de base debido al aumento de concentración del eluyente. Las dimensiones de las columnas fueron de 8 × 0,6 cm, empaquetadas con DEAE Sephadex A-25 (Pharmacia) en Na₂ SO₄ 0,1 M. La elución se practicó con un gradiente de concentración desde 2,4 mM hasta 0,5 M de Na₂ SO₄, pH 6,7 en treinta minutos a un flujo de 30 ml/h. Dicha elución se monitorizó a 254 nm 0,02 AUFS en un detector equipado con cubeta de referencia UV-1 (Pharmacia) y registrándose el resultado. Las áreas del cromatograma obtenido fueron calculadas mediante un integrador electrónico Kontron. Para comparar nuestra técnica con la de Cueille se procesó con nuestras condiciones de trabajo la fracción b₄-2 (corresponde según nomenclatura de Avignon a pico 2.2) purificada y amablemente cedida por el grupo del Hospital Necker de París. En la figura 1 se recogen las fracciones de moléculas medias urémicas tras cromatografías por intercambio iónico, constándose la similitud entre plasma urémico y orina normal; por otra parte, el pico b₄-2 purificado coincide con el pico 2.2. En relación a la evaluación de la técnica, el coeficiente de variación del volumen de elución para la gel-filtración fue inferior al 5 % para todos los picos y para el intercambio iónico fue inferior al 8 %. El coeficiente de variación calculado a partir de las áreas de cada pico en cromatografía de intercambio iónico fue inferior al 12 % para todos los picos¹⁶, valores similares a los obtenidos por otros autores¹³.

La nomenclatura que se utilizó para identificar los distintos picos fue la recomendada en el Symposium on Present Status and Future Orientation of Middle Molecules in Uremia and Other Diseases de Avignon 1980. Se trata de una identificación de tipo numérico y correlativo a partir del primer pico eludido¹⁷. Los

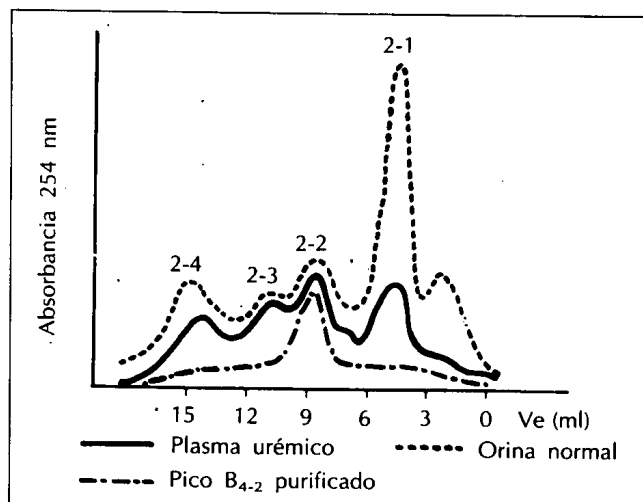


Fig. 1.—Fracciones de moléculas medias urémicas tras cromatografía de intercambio iónico.

Tabla I. Pacientes con insuficiencia renal crónica sin diálisis

Número	Creatinina PL $\bar{X} \pm DE$ Límites (mg/dl)	Pico 2.2 $\bar{X} \pm DE$ Límites (cm ² /ml)	Pico 2.3 $\bar{X} \pm DE$ Límites (cm ² /ml)	Pico 2.4 $\bar{X} \pm DE$ Límites (cm ² /ml)	Proteinuria $\bar{X} \pm DE$ Límites (gr/24 h)
24	5,2 ± 3,7 1,4 - 13,4	6,0 ± 8,5 0 - 38,1	3,8 ± 5,3 0 - 22,2	8,6 ± 8,3 0 - 27,9	1,4 ± 1,6 0 - 5,2
		p < 0,05		p < 0,001	
			NS		

picos de moléculas medias urémicas utilizados en este estudio han sido el 2.2, 2.3 y 2.4. El pico 2.1 no fue tenido en cuenta al haberse encontrado en el mismo sustancias de peso molecular similar a la albúmina.

En 10 personas sanas sin insuficiencia renal se determinaron niveles plasmáticos de moléculas medias, siendo las mismas indetectables. En sus orinas se obtuvieron claros cromatogramas de las fracciones de moléculas medias.

La creatinina plasmática, urinaria y proteinuria se obtuvieron mediante rutina de laboratorio (Prisma Autoanalyzer, Clinicon Sweden).

El análisis estadístico se practicó mediante análisis de correlación y mediante el test de la t de Student con datos dependientes e independientes. Los resultados se han expresado como media ± desviación estándar.

Resultados

En la tabla I se recogen los niveles plasmáticos de creatinina, picos 2.2, 2.3 y 2.4 de moléculas medias urémicas, así como la proteinuria en los pacientes con insuficiencia renal crónica que no estaban en hemodiálisis. El grado de insuficiencia renal varió desde aquella con una creatinina plasmática de 1,4 mg/dl, con aclaramiento de creatinina de 50 ml/min hasta aquellos en situación de prediálisis inminente con creatinina plasmática de 13,4 mg/dl, con aclaramiento de creatinina de 3 mg/dl. La proteinuria en veinticuatro horas varió desde 0 hasta 5,2 g. Al comparar entre sí los picos de moléculas medias urémicas aplicando el test de la t de Student con datos dependientes, se encontró que los niveles más altos correspondían a los picos 2.2 y 2.4, sin diferencia entre sí; por otra parte, los niveles del pico 2.3 fueron significativamente menores que los picos 2.2 y 2.4.

En la figura 2 se recoge la correlación entre los niveles de los picos 2.2, 2.3 y 2.4 de moléculas medias

urémicas y la creatinina plasmática. Asimismo, han sido colocados los niveles de moléculas medias de los pacientes en hemodiálisis como punto de referencia, aunque los mismos no han participado en el tra-

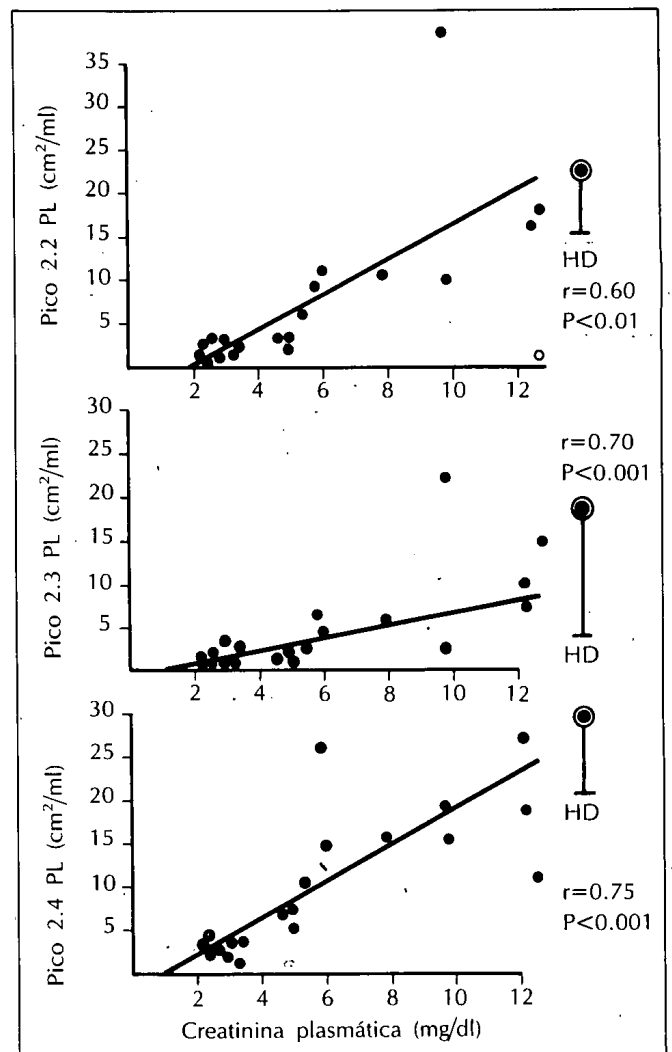


Fig. 2.—Correlación entre los niveles de los picos 2.2, 2.3 y 2.4 de moléculas medias urémicas y la creatinina plasmática.

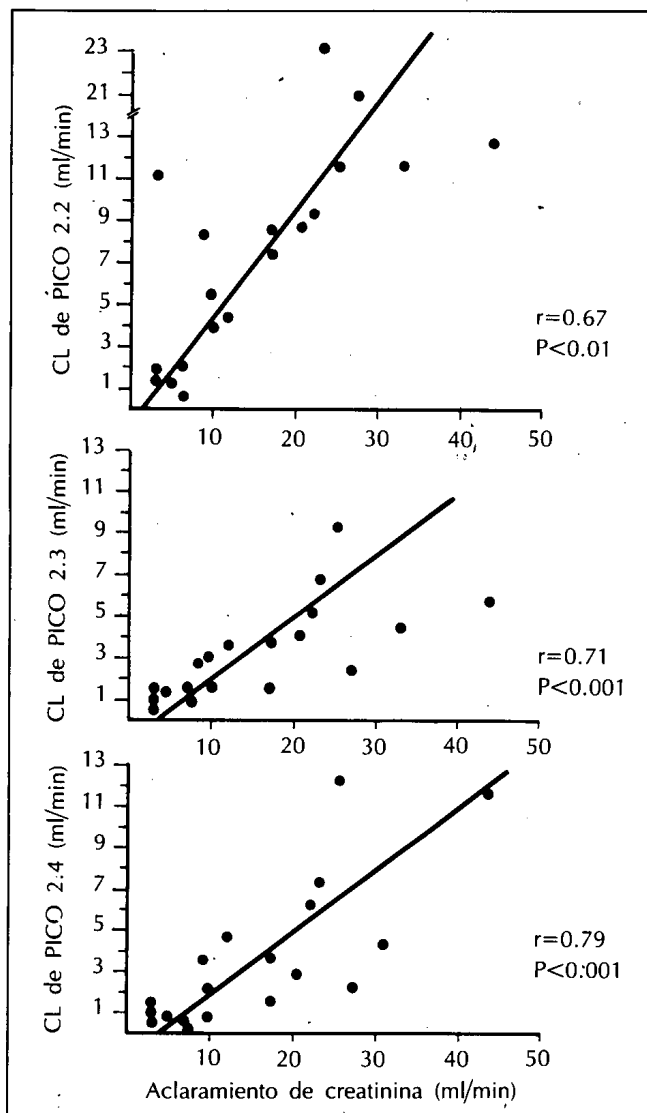


Fig. 3.—Correlación entre los aclaramientos de los picos 2.2, 2.3 y 2.4 de moléculas medias urémicas y aclaramiento de creatinina.

mos al de los pacientes en hemodiálisis: pico 2.2, $17,0 \pm 13,3 \text{ cm}^2/\text{ml}$; pico 2.3, $11,3 \pm 7,4 \text{ cm}^2/\text{ml}$, y pico 2.4, $18,6 \pm 6,0 \text{ cm}^2/\text{ml}$ (no diferencia significativa para picos 2.2 y 2.3; para pico 2.4, valor menor, $p < 0,05$).

Cuando se estudió la correlación entre los aclaramientos de las fracciones de las moléculas medias urémicas y los de creatinina se encontró una correlación significativa para los picos 2.2, 2.3 y 2.4 (fig. 3). En el estudio se incluyeron 20 pacientes en quienes se pudo determinar el aclaramiento. Hubo retención de moléculas medias urémicas por debajo de aclaramientos de creatinina menores de 45 ml/min . Por otra parte, al examinar la relación entre proteinuria de veinticuatro horas y extracción de fracciones de moléculas medias en orina de veinticuatro horas no se encontró ningún tipo de correlación.

Los aclaramientos de creatinina y de las fracciones de las moléculas medias de la población estudiada se recogen en la figura 4. Los aclaramientos de las fracciones de las moléculas medias urémicas fueron significativamente menores que el respectivo aclaramiento de creatinina. Por otra parte, el aclaramiento del pico 2.2 de las moléculas medias urémicas fue significativamente mayor que el correspondiente a los picos 2.3 y 2.4, no existiendo diferencia significativa entre estos últimos.

Discusión

Las moléculas medias son un conjunto heterogéneo de sustancias retenidas en la insuficiencia renal que contribuyen a la intoxicación urémica en un grado que «in vivo» ha sido poco definido, probablemente por su heterogeneidad¹⁸. Sin embargo, siendo

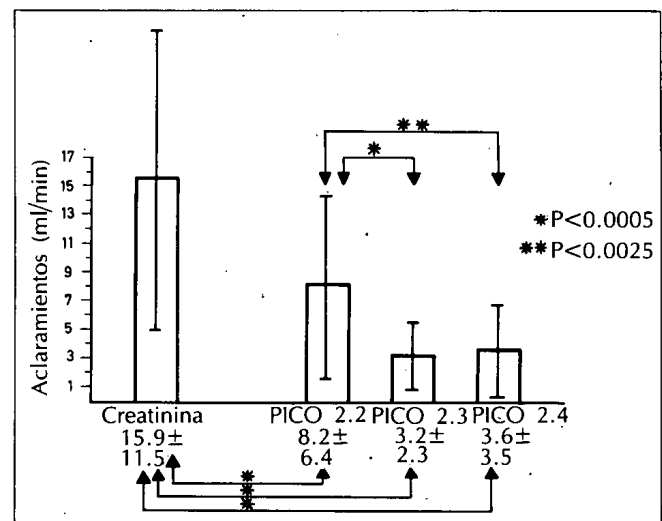


Fig. 4.—Comparación de los aclaramientos medios de los diferentes picos de moléculas medias.

tamiento estadístico de la correlación. Existió correlación significativa entre los niveles de moléculas medias urémicas y la creatinina plasmática. Las moléculas medias fueron detectables a partir de creatininas plasmáticas de 2 mg/dl ; en cuatro pacientes con creatininas plasmáticas menores de 2 mg/dl las moléculas medias fueron indetectables, no habiendo sido incluidas en este estudio de correlación. Los niveles más altos de moléculas medias correspondieron a los pacientes en hemodiálisis periódicas, siendo los valores correspondientes a 20 pacientes ($\bar{x} \pm \text{DE}$) los siguientes: pico 2.2, $23,3 \pm 8,2 \text{ cm}^2/\text{ml}$; pico 2.3, $24,5 \pm 20,1 \text{ cm}^2/\text{ml}$, y pico 2.4, $30,5 \pm 9,4 \text{ cm}^2/\text{ml}$. Los pacientes con creatinina plasmática mayor o igual a 10 mg/dl ($11,5 \pm 1,8 \text{ mg/dl}$, $n = 5$) presentaron unos niveles de moléculas medias próxi-

la removilidad de las moléculas medias urémicas en diálisis un concepto importante en el tratamiento sustitutivo renal, estudios sobre su acúmulo en distintos grados de insuficiencia renal crónica han sido escasos.

En este estudio hemos constatado que las moléculas medias urémicas determinadas por nosotros comienzan a acumularse a partir de creatininas plasmáticas mayores de 2 mg/dl con aclaramientos de creatinina menores de 45 ml/min, correlacionándose los niveles plasmáticos de las mismas con el grado de insuficiencia renal. El acúmulo fue más marcado para los picos 2.2 y 2.4. Por otra parte, el aclaramiento de las fracciones de las moléculas medias fue menor que el aclaramiento endógeno de creatinina, especialmente para el pico 2.3.

Nosotros hemos utilizado una técnica de determinación de moléculas medias similar a la descrita por Cueille¹⁵, que, aplicada a estudios clínicos, permitió encontrar correlación clínica de uno de sus picos, el pico b₄-2 o pico 2.2, con la polineuritis urémica³. El patrón cromatográfico del plasma urémico se encontró que se correspondía con el de la orina de personas sanas y estaba ausente en el plasma de sujetos con función renal normal. La mayoría de los estudios de retención de las fracciones de moléculas medias urémicas en pacientes con insuficiencia renal sin diálisis han sido practicados mediante la técnica de Fürst et cols.¹⁹. Así se había constatado que la retención de moléculas medias urémicas se detectaba a partir de creatininas plasmáticas mayores de 4,5 mg/dl con aclaramientos de creatinina menores de 15 ml/min²⁰. La sensibilidad de nuestra técnica ha sido superior al detectar acúmulo de moléculas medias urémicas a partir de creatininas de 2 mg/dl y aclaramientos menores de 45 ml/min. A mayor grado de insuficiencia renal mayor elevación de todas las fracciones de moléculas medias endógenas, encontrándose los valores más altos en los pacientes con insuficiencia renal crónica terminal en diálisis.

En relación a la influencia medicamentosa sobre las moléculas medias cabe señalar que se ha demostrado la no influencia del alopurinol, betabloqueantes y furosemida²¹. En nuestro estudio los pacientes no tomaron medicación las veinticuatro horas anteriores a la extracción de muestras sanguíneas. Por otra parte ha sido descrita interferencia de la aspirina sobre la determinación de moléculas medias urémicas²², motivo por el que no se incluyó a ningún paciente que hubiese tomado aspirina noventa y seis horas antes de la toma de muestras para determinar moléculas medias.

Las fracciones de moléculas medias endógenas con niveles más altos han correspondido a 2.2 y 2.4, siendo significativamente mayores que la 2.3. Por otra parte, el aclaramiento mayor lo fue para la fracción 2.2. Los aclaramientos de las fracciones de las

moléculas medias endógenas han sido significativamente menores que el aclaramiento de creatinina y sugiere que para los picos 2.2, 2.3 y 2.4 puede existir una reabsorción tubular. En la insuficiencia renal avanzada hay secreción tubular de creatinina, proporcionando un resultado falsamente alto del filtrado glomerular²³; dicho margen de error puede representar un incremento de hasta el 141 %²⁴. El aclaramiento de creatinina ha sido mayor que los aclaramientos de las fracciones de las moléculas medias, variando entre el 194 y el 497 %. Además, el hecho de que el pico 2.4 tenga unos niveles plasmáticos similares al pico 2.2, pero con un aclaramiento inferior al mismo, puede ser debido a una mayor reabsorción tubular.

En estudios previos los aclaramientos de las fracciones de moléculas medias urémicas han sido dispares. Así se ha constatado en un estudio un aclaramiento mayor que el aclaramiento de creatinina²⁵; en otro la mayoría de los aclaramientos de las fracciones fueron menores²⁶, y en otro, de un valor similar²⁷. Todos estos estudios han sido practicados con la técnica de Fürst y cols.¹⁹ mediante métodos cromatográficos, pero utilizando distintas longitudes de onda en la detección de las fracciones de moléculas medias, 206, 215, 254 nm, lo que podría explicar esta diferencia de resultados²⁷. La notable disparidad en la metodología utilizada para la separación de los solutos de un peso molecular medio ha sido un importante obstáculo para coordinar los resultados obtenidos por diversos autores²⁸. Nuestra metodología de separación de moléculas medias endógenas es similar a la de Cueille¹⁵, con la que no conocíamos que se hubiesen practicado estudios de retención en la insuficiencia renal crónica no terminal. El pico 2.2, también denominado b₄-2, se ha identificado como un ácido glucurónico conjugado con un peso molecular de 568 daltons¹⁴. Con la técnica de Fürst y cols. el principal componente de la separación cromatográfica de las moléculas medias fue un glucurónido del ácido O-hidroxihipurínico, con un peso molecular de 371 daltons²⁹. Así, con la metodología de Cueille se identifican sustancias de peso molecular medio que no tienen nada que ver con lo separado por Fürst y que cabe pensar que se puedan comportar de forma distinta.

En resumen, hemos constatado que la retención de moléculas medias urémicas comienza a partir de insuficiencia renal moderada y prosigue su incremento plasmático en función del grado de deterioro renal, siendo los niveles más altos los correspondientes a pacientes en hemodiálisis periódica.

Agradecimiento

Señor Jordi Solá Seuma, DE, técnico de laboratorio del Hospital Clínic i Provincial de Barcelona, sin cuya colaboración técnica no hubiera sido posible el estudio.

Bibliografía

1. Schoots A, Mikkers F, Cramers C, De Smet R y Ringoir S: Uremic toxins and the elusive middle molecules. *Nephron* 38:1-8, 1984.
2. Navarro J, Contreras P, Touraine JL, Freyria AM, Later R y Traeger J: Are «Middle molecules» responsible for toxic phenomena in chronic renal failure? *Nephron* 32:301-307, 1982.
3. Man NK, Cueille G, Zingraff J, Drüeke T, Jungers P, Sausse A, Boudet J y Funck-Brentano JL: Evaluation of plasma neurotoxin concentration in uremic polyneuropathic patients. *Proc Eur Dial Transplant Assoc* 15:164-170, 1978.
4. Pales JL, López A, Asensio A, Merola E, Company X, Deulofeu R, García M, Revert L y Balague A: Inhibitory effect of peak 2-4 of uremic middle molecules on platelet aggregation. *Eur J Haematol* 39:197-202, 1987.
5. Babb AL, Strand MJ, Uvelli DA, Milutinovic J y Scribner BH: Quantitative description of dialysis treatment: a dialysis index. *Kidney Int*, 7 (suppl 2):S.23-S.29, 1975.
6. Man NK, Graner A, Rondon-Nucete M, Zingraff J, Jungers P, Sausse A, Billon JP y Funck-Brentano JL: One year follow-up in short dialysis with a membrane highly permeable. *Proc Eur Dial Transpl Assoc* 10:236-241, 1973.
7. Chang TMS y Migchelsen M: Characterization of possible «toxic» metabolites in uremia and hepatic coma based on the clearance spectrum for larger molecules by the microcapsule artificial kidney. *Trans Amer Soc Artif Int Organs* 19:314-319, 1973.
8. Henderson LW, Livoti LG, Ford CA, Kelly AB y Lysaght MJ: Clinical experience with intermittent hemodiafiltration. *Trans Amer Soc Artif Intern Organs* 19:119-125, 1973.
9. Leber HW, Wizemann V, Goubeaud G, Rawer P y Schütterle G: Simultaneous hemofiltration/hemodialysis: an effective alternative to hemofiltration and conventional hemodialysis in the treatment of uremic patients. *Clin Nephrol* 9:150-156, 1978.
10. Chang TMS, Barre P, Kuruville S, Messier D, Man N y Resurreccion E: Phase one clinical trial of a new composite artificial kidney: a single visit combining dialysis with hemoperfusion. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 28:43-48, 1982.
11. Popovich RP, Moncrief JW, Nolph K, hods AJ, Twardowski ZJ y Pyle WK: Continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Ann Int Med* 88:449-456, 1978.
12. Powell D, Bergstrom J, Dzurik R, Gulyassy P, Lockwood D y Phillips L: Toxins and inhibitors in chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 7:292-299, 1986.
13. Cueille G, Man NK, Sausse A, Farges JP y Funck-Brentano JL: Technical aspects on middle molecules: separation, isolation and identification. *Artificial Organs* 4 (suppl):8-12, 1980.
14. Cueille G, Man NK, Sausse A, Farges JP y Funck-Brentano JL: Further characterization of a neurotoxic uremic middle molecule. En *Proceedings of the 8 th international congress of nephrology. Athens, 1981*. Basel, Karger, 606-617, 1981.
15. Cueille G: Mise en evidence et evaluation des «moyennes molecules» de la taille de la vitamine B-12 présentes dans les liquides biologiques de sujets normaux et de patients uremiques. *J Chromatogr* 146:55-65, 1978.
16. Merola E, Deulofeu R, Company X, García M, Revert L y Balague A: Evaluación de la cromatografía de intercambio iónico para la determinación de las moléculas medias. *Química Clínica* 4 (3):177-181, 1985.
17. Klinkmann H: General conclusions of the meeting: where to go from here? *Artificial Organs* 4 (suppl):188, 1980.
18. Ringoir S, Schoots A y Vanholder R: Uremic toxins. *Kidney Int* 33 (suppl 24):S.4-S.9, 1988.
19. Fürst P, Zimmerman L y Bergström J: Determination of endogenous middle molecules in normal and uremic body fluids. *Clin Nephrol* 5:178-188, 1976.
20. Bergström J, Fürst P y Zimmerman L: Uremic middle molecules exist and are biologically active. *Clin Nephrol* 11:229-338, 1979.
21. Asaba H, Zimmerman L y Bergström J: On drug artifacts in middle molecules analysis. *Nephron* 39:73-76, 1985.
22. Faguer P, Man NK, Cueille G y Funck-Brentano: Drug interaction in middle molecule analysis, with special reference to acetylsalicylic acid. *Artif Organs* 8:226-229, 1984.
23. Shemesh O, Golbetz H, Kriss JP y Myers BD: Limitations of creatinine as a filtration marker in glomerulopathic patients. *Kidney Int* 28:830-838, 1985.
24. Bauer JH, Brooks CS y Burch RN: Clinical appraisal of creatinine clearance as a measurement of glomerular filtration rate. *Am J Kidney Dis* 2:337-346, 1982.
25. Asaba H, Bergström J, Fürst P, Oulés R y Zimmerman L: Accumulation and excretion of middle molecules. *Proc Eur Dial Transpl* 13:481-488, 1976.
26. Schindhelm K, Schlatter E, Schurek HJ y Stolte H: Renal handling of uremic middle molecules. *Nephron* 30:166-172, 1982.
27. Schindhelm K, Lustenberger N, Nordmeyer C, Farrell P y Stolte H: Middle molecules in atients with pre-dialysis chronic renal failure: a comparative clearance study. *Clin Nephrol* 17:200-205, 1982.
28. Contreras P, Later R, Navarro J, Touraine JL, Freyria AM y Traeger J: Molecules in the middle molecular weight range. Critical review of methods of separation from fluids of uremic patients. *Nephron* 32:193-201, 1982.
29. Zimmerman L, Fürst P, Bergström J y Jornvall H: A new glycine containing compound with a blocked amino group from uremic body fluids. *Clin Nephrol* 14:109-111, 1980.