

## ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR POR MTT EM CÉLULAS TRATADAS COM TOXINAS URÊMICAS – REVISÃO

*CELL VIABILITY ANALYSIS BY MTT IN CELLS TREATED WITH UREMIC TOXINS –  
REVIEW*

Kariman Assis Bochnie<sup>1</sup>  
Paulo César Gregório<sup>2</sup>  
Rayana Ariane Pereira Maciel<sup>3</sup>

Recebido em 29 de dezembro de 2015  
Aceito em 16 de fevereiro de 2016

### RESUMO

A Doença Renal Crônica (DRC) é definida como presença de lesão renal por um período igual ou superior a 3 meses, com anormalidades estruturais ou funcionais dos rins, com ou sem diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG). A DRC é classificada em estágios iniciais (estágio 1), leves (estágios 2 e 3a), moderados (estágio 3b), função renal severamente diminuída (estágio 4) e insuficiência renal (estágio 5). Com a permanência da doença, os rins perdem a capacidade parcial ou total de remoção de metabólitos tóxicos da circulação, tais como como *p*-cresil sulfato (PCS) e indoxil sulfato (IS), que comumente seriam excretados para formação da urina, o que resulta no acúmulo destes no organismo. Este quadro é denominado uremia ou toxicidade urêmica. Para avaliação *in vitro* da toxicidade de alguns compostos urêmicos, utilizam-se técnicas laboratoriais, como o ensaio de viabilidade celular por MTT. O objetivo deste estudo é explicar sobre uma das técnicas *in vitro* de citotoxicidade - ensaio de viabilidade celular por MTT - em células tratadas com toxinas urêmicas.

**Descritores:** Doença renal crônica; toxicidade urêmica; viabilidade celular.

### ABSTRACT

Chronic Kidney Disease (CKD) is defined as the presence of kidney damage for a period equal to or exceeding 3 months, structural or functional abnormalities of the kidney, with or without a decreased glomerular filtration rate (GFR). CKD is classified in the early stages (stage 1), mild (stages 2 and 3a), moderate (stage 3b), severely reduced kidney function (stage 4) and renal failure (stage 5). With the persistence of the disease, the kidneys lose their partial capacity or complete removal of toxic metabolites of movement, such as as *p*-cresyl sulfate (PCS) and indoxyl sulfate (IS), which usually would be excreted into urine formation, which results in the accumulation of these in the body. This condition is called uremia or uremic toxicity. For *in vitro* evaluation of the toxicity of some uremic compounds, we use laboratory techniques, such as cell viability assay by MTT. The aim of this study is to explain about one of the techniques *in vitro* cytotoxicity - cell viability assay - in cells treated with uremic toxins.

**Keywords:** Chronic kidney disease; uremic toxicity; cell viability.

<sup>1</sup>Acadêmica do Curso de Biomedicina do Centro Universitário Autônomo do Brasil (UniBrasil). <sup>2</sup>Farmacêutico-Bioquímico, Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia (Universidade Federal do Paraná – UFPR). <sup>3</sup>Biomédica, Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia (Universidade Federal do Paraná - UFPR). Professora do Centro Universitário Autônomo do Brasil (UniBrasil). rayanaariane@gmail.com

## INTRODUÇÃO

Dados do último censo da Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN) estimam que no Brasil há mais de 2 milhões de brasileiros portadores de algum grau de disfunção renal, sendo que aproximadamente 100 mil se encontram em diálise<sup>1</sup>. Com a permanência da DRC e consequente estado de cronificação, os rins perdem a capacidade parcial ou total de remoção de metabólitos tóxicos da circulação, como o *p*-cresil sulfato (PCS) e o indoxil sulfato (IS), que comumente seriam excretados para formação da urina, resultando no acúmulo destes no organismo. Estes metabólitos são chamados de toxinas urêmicas e o acúmulo destas toxinas é responsável por muitas consequências clínicas no organismo como um todo, levando a uma condição conhecida como uremia.

As toxinas urêmicas *p*-cresil sulfato (PCS) e indoxil sulfato (IS) estão intimamente relacionadas a estes processos patológicos nesses pacientes, tais como a disfunção endotelial<sup>2</sup>. Já foi demonstrado o efeito pró-inflamatório do PCS<sup>3</sup> e sua capacidade de induzir o desprendimento de micropartículas endoteliais, sugerindo que PCS está envolvido na disfunção endotelial<sup>4</sup>, além de induzir à reatividade vascular e remodelação vascular<sup>5</sup>. IS induz o estresse oxidativo em diferentes células<sup>6</sup> e promove a progressão DRC através da indução de produção de radicais livres por células tubulares renais<sup>7</sup>. Relatou-se recentemente que o IS pode levar a um aumento da permeabilidade vascular, com ação no remodelamento do citoesqueleto e contração celular, levando a lesão nas junções intercelulares<sup>8,9</sup>.

Para avaliar *in vitro* a citotoxicidade desses compostos urêmicos, utilizam-se técnicas laboratoriais, como o ensaio de viabilidade celular por MTT. Esse ensaio baseia-se na avaliação da atividade de enzimas desidrogenases mitocondriais. A viabilidade é quantificada pela redução do MTT (tetrazólio) a formazan.

O objetivo deste estudo é explanar uma das técnicas *in vitro* de citotoxicidade - ensaio de viabilidade celular por MTT - em células tratadas com toxinas urêmicas.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A Doença Renal Crônica (DRC) é definida como presença de lesão renal por um período igual ou superior a 3 meses, apresentando anormalidades estruturais ou funcionais dos rins, com ou sem diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG). Quanto maior o estadiamento da DRC, menor a TFG. A insuficiência renal, que ocorre no estágio mais avançado da doença, é estabelecida quando a TFG atinge valores inferiores a 15 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> (Tabela 1).

Estágio	Descrição	TFG (mL/min/1,73 m <sup>2</sup> )
1	Dano renal sem alteração da função renal	≥ 90
2	Dano renal com alteração leve da função renal	89 a 60
3a	Perda leve a moderada da função renal	59 a 44
3b	Perda moderada a grave da função renal	44 a 30
4	Perda grave da função renal	29 a 15
5	Insuficiência renal	≤ 15

Tabela 1. Estadiamento da DRC. Fonte: Adaptado de NKF, 2013<sup>10</sup>.

De acordo com o Censo da Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN) de 2013, estima-se que no Brasil existam mais de 2 milhões de brasileiros portadores de algum grau de disfunção renal, demonstrando um grande aumento no percentual de pacientes que iniciam a diálise, sendo que aproximadamente mais de 100 mil encontram-se em terapia dialítica<sup>11</sup>. Sabe-se que a principal causa de morte nos pacientes com DRC são as doenças cardiovasculares (DCV)<sup>12</sup>, como aterosclerose e acidente vascular cerebral<sup>13</sup>. Essas patologias representam aproximadamente 50% de todas as mortes<sup>14</sup>, sendo o infarto a terceira maior causa de morte cardiovascular em pacientes com DRC, o qual é de 5 a 10 vezes mais prevalente do que na população em geral<sup>6,7</sup>. Estudos desenvolvidos pelo *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO) mostram que um terço desses infartos ocorre durante ou logo após a sessão de hemodiálise, afirmando uma correlação na reposição da função renal com disfunções cardíacas, dados estes provindos do estudo *Choices for Healthy Outcomes in Caring* (CHOICE), envolvendo 1041 pacientes em estágio 5 de DRC (74% em hemodiálise)<sup>16</sup>.

Com a permanência da doença e consequente estado de cronificação, os rins perdem a capacidade parcial ou total de remoção de metabólitos tóxicos da circulação, que comumente seriam excretados para formação da urina, resultando no acúmulo destes no organismo. Estes metabólitos são chamados de toxinas urêmicas e o acúmulo destas toxinas é responsável por muitas consequências clínicas no organismo como um todo, levando a uma condição conhecida como uremia<sup>8,9</sup>. Como consequência, na uremia, ocorrem alterações estruturais do sistema cardiovascular, causados por distúrbios metabólicos, alterações de pressão e/ou sobrecarga do fluxo sanguíneo, influenciando na integridade do endotélio. O endotélio possui várias funções, como anti-inflamatório, anticoagulante e vasodilatador, que são de suma

importância para manter a homeostase, atuando ativamente nas propriedades geométricas e estruturais de artérias de grande calibre. Alterações na função endotelial podem estar associadas com desregulação do remodelamento arterial e na modulação do crescimento vascular<sup>19</sup>. No entanto, na hipertensão arterial pode ocorrer um agravamento desse quadro, gerando um desequilíbrio na produção e liberação dos fatores contráteis e relaxantes dos vasos, como o óxido nítrico (NO), que pode levar a um comprometimento no vasorelaxamento endotélio dependente e aumentando o tônus vascular<sup>11</sup>.

Atualmente, os compostos urêmicos são classificados de acordo com suas propriedades físico-químicas e características de remoção por diálise em compostos pequenos solúveis em água com no máximo 500 Da, como a ureia e creatinina, e que são facilmente removidos por diálise e compostos de peso molecular moderado, com mais de 500 Da, tendo com protótipos deste grupo a  $\beta$ 2-microglobulina e a leptina, moléculas que só podem ser removidas por membranas de porosidade grande o suficiente para permitir a saída. E por último compostos em geral com baixo peso molecular, mas por se ligarem a proteínas plasmáticas, sobretudo à albumina, são difíceis de ser removidos por meio da diálise e seu acúmulo causa diversos efeitos deletérios no organismo do paciente. Os protótipos deste grupo são os fenóis e os indóis, como *p*-cresil sulfato (PCS) e indoxil sulfato (IS)<sup>14,15,16</sup>.

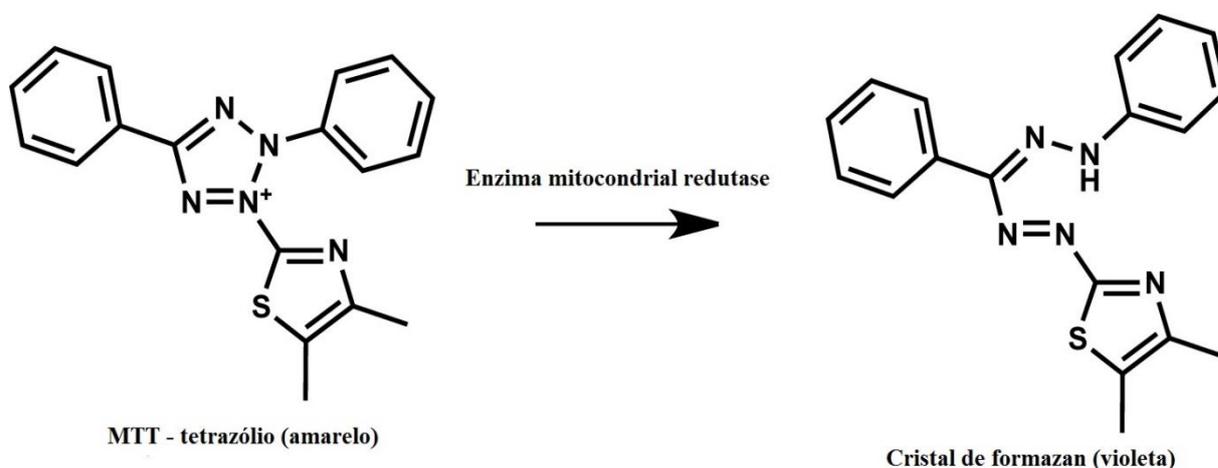
O indoxil sulfato (IS) é uma toxina urêmica de baixo peso molecular (213,21 Da). Trata-se de um indol derivado do aminoácido triptofano, proveniente da dieta, que é metabolizado por bactérias intestinais por meio de triptofanases. O indol é absorvido pelas células intestinais e liberado na corrente sanguínea onde é transportado por proteínas, e, posteriormente, segue para o fígado, sendo conjugado com o sulfato, tornando-se indoxil sulfato. Comumente o IS é excretado na urina, mas em casos de ineficiência da filtração glomerular, ou especificamente indivíduos com DRC, ocorre um acúmulo dessas toxinas na circulação sanguínea, aumentando os níveis séricos de metabólitos endógenos protéicos ocasionando efeitos adversos e sobrecarga dos nefrões remanescentes<sup>23</sup>.

Outra toxina urêmica, de baixo peso molecular (108 Da) é o *p*-cresol (PC) (4-metilfenol), um composto fenólico (C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O) e volátil, que apresenta característica lipofílica, sendo transportada por proteínas séricas. O *p*-cresol (PC) é formado a partir da fermentação da tirosina e fenilalanina, por meio do metabolismo da microbiota bacteriana no intestino grosso<sup>24</sup>. Após sair do intestino, é metabolizado, formando dois compostos, *p*-cresil sulfato (PCS) e *p*-cresil glucoronidato (PCG), por meio de processos de conjugação (sulfatação e glucoronidação)<sup>25</sup>. O PCS é considerado a toxina efetiva, originado pela adição do ânion sulfato na hidroxila presente na estrutura do PC. Contudo, Schepers *et al.* realizou um estudo

em que demonstra um efeito pró-inflamatório do PCS, ocasionado por um aumento da formação de radicais livres produzidos por leucócitos, que contribuem para o dano vascular em pacientes com DRC, afirmando também que ele induz o desprendimento de micropartículas endoteliais, sugerindo que esta toxina pode estar envolvida na disfunção endotelial, comumente presente nestes pacientes<sup>3</sup>. Estudos comprovam que elevadas concentrações de PCS, em pacientes com DRC em estágios mais avançados, promovem simultaneamente disfunção vascular e remodelação vascular. Em estágios mais severos, podem contribuir para o desenvolvimento da hipertensão e falência cardiovascular<sup>5</sup>. O IS induz o estresse oxidativo nas células tubulares, células mesangiais, osteoblastos, células musculares lisas vasculares e células endoteliais<sup>23</sup>. O aumento do estresse oxidativo induzido por moléculas ativas de oxigênio *Reactive oxygen species* (ROS) está associado com aterosclerose e mortalidade cardiovascular não só na população em geral, mas principalmente nos pacientes com DRC. A patogênese do estresse oxidativo nos pacientes com DRC é multifatorial. Isto inclui diversas causas exógenas e endógenas, tais como os fatores relacionados à uremia, suplementação intravenosa de ferro e fatores relacionados à diálise<sup>26</sup>. De forma geral, pode-se dizer que a disfunção endotelial nos pacientes com DRC se deve ao desequilíbrio entre a formação de ROS, níveis de NO e falhas na defesa antioxidante, que são achados comuns nestes pacientes<sup>27</sup>.

Para avaliar *in vitro* a citotoxicidade de compostos urêmicos, utilizam-se técnicas laboratoriais, como o teste de exclusão de Trypan Blue, que determina a viabilidade através do dano à membrana celular, o ensaio de lactato desidrogenase (LDH), uma enzima citosólica de células que tiveram a sua membrana plasmática rompida e o ensaio por MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), que mede a função mitocondrial da célula, ou seja, avalia o nível de funcionalidade da célula e não de sua estrutura. Estes ensaios são utilizados para medir os resultados da proliferação de células, verificar efeitos citotóxicos de compostos e para multiplexagem, como um controle interno de determinação do número de células viáveis<sup>28</sup>.

O ensaio de MTT baseia-se na comprovação da citotoxicidade induzida por um determinado composto ou toxina no metabolismo celular de glicídeos, usualmente através da avaliação da atividade de enzimas desidrogenases mitocondriais (enzima mitocondrial redutase) e do seu respectivo potencial redox. A viabilidade é quantificada pela redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água), pela atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADHP, a formazan (um sal de coloração roxa e insolúvel em água)<sup>29</sup> (Figura 1).



**Figura 1. Reação do MTT com a enzima mitocondrial redutase.** A viabilidade é quantificada pela redução do MTT (um sal de coloração amarela), pela atividade metabólica celular a formazan (um sal de coloração violeta)<sup>29</sup>.

Para este ensaio são plaqueadas aproximadamente  $10^4$  células/poço em placa de 96 poços. As células são mantidas em cultura com o meio específico para cada tipo celular, 10% SFB a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ , até atingirem 90% de confluência. As células são incubadas com as toxinas em diferentes concentrações por 24 horas. Após esse período, acrescenta-se uma solução a 5 mg/mL de MTT deixando as células incubadas por mais 3 horas a  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$  para a incorporação do MTT e consequente formação dos cristais de formazan. Posteriormente, todo o meio é retirado e os cristais são solubilizados em DMSO. A absorbância é lida a  $570\text{ nm}$ <sup>29</sup>.

Uma variedade de compostos de tetrazólio tem sido utilizada para detectar células viáveis. Os compostos mais frequentemente utilizados são MTT, MTS, XTT e WST-1. Estes compostos se dividem em duas categorias: MTT, que é carregado positivamente e penetra prontamente em células eucarióticas viáveis e MTS, XTT, WST-1, os quais são carregados negativamente, o que dificulta sua penetração no interior das células. São tipicamente utilizados com um aceptor intermediário de elétrons que pode transferir elétrons da membrana plasmática ou citoplasma para facilitar a redução do tetrazólio a formazan<sup>30</sup>.

Em diversos estudos para avaliação da toxicidade urêmica, utiliza-se o ensaio de MTT. Sugere-se que PCS, por ser um composto fenólico pequeno com propriedades lipofílicas, facilmente penetre a membrana celular e desorganize a sua função e consequentemente das células como um todo<sup>31</sup>. De acordo com Mozar *et al.*, o tratamento de células tubulares proximais com IS induz um decréscimo na viabilidade da célula e, por isso, a toxina promove a progressão da insuficiência renal crônica através da indução de produção de radicais livres

pelas células tubulares renais<sup>32</sup>. O estresse oxidativo e o efeito antiproliferativo causados pelo IS podem ser atribuídos à disfunção mitocondrial, podendo ser tratados com antioxidantes<sup>7</sup>.

## CONCLUSÃO

O ensaio de MTT é comumente utilizado como ferramenta em experimentos *in vitro* para avaliação da citotoxicidade após o tratamento de células com toxinas urêmicas.

Há diversos ensaios de citotoxicidade, como Trypan Blue e LDH, que determinam apenas o dano estrutural celular, ao passo que o ensaio de viabilidade por MTT avalia o dano funcional da célula através da sua atividade mitocondrial.

## REFERÊNCIAS

1. SESSO RC, LOPES AA, THOMÉ FS, LUGON JR, SANTOS DR DOS. **Brazilian Chronic Dialysis Survey 2013 - Trend analysis between 2011 and 2013**. J Bras Nefrol [Internet]. 2014;36(4):476–81. Available from: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/0101-2800.20140068>
2. CAI H, HARRISON DG. **Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress**. Circ Res. 2000;87(10):840–4.
3. SCHEPERS E, MEERT N, GLORIEUX G, GOEMAN J, VAN DER EYCKEN J, VANHOLDER R. **P-cresylsulphate, the main in vivo metabolite of p-cresol, activates leucocyte free radical production**. Nephrol Dial Transplant [Internet]. 2007 Feb [cited 2014 Nov 27];22(2):592–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17040995>
4. MEIJERS BKI, VAN KERCKHOVEN S, VERBEKE K, DEHAEN W, VANRENTERGHEM Y, HOYLAERTS MF, et al. **The uremic retention solute p-cresyl sulfate and markers of endothelial damage**. Am J Kidney Dis [Internet]. Elsevier Inc.; 2009 Nov [cited 2014 Nov 27];54(5):891–901. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19615803>
5. GROSS P, MASSY Z A., HENAUT L, BOUDOT C, CAGNARD J, MARCH C, et al. **Para-Cresyl Sulfate Acutely Impairs Vascular Reactivity and Induces Vascular Remodeling**. J Cell Physiol [Internet]. 2015;(April 2015):n/a – n/a. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.25018>

6. TUMUR Z, SHIMIZU H, ENOMOTO A, MIYAZAKI H, NIWA T. **Indoxyl sulfate upregulates expression of ICAM-1 and MCP-1 by oxidative stress-induced NF- $\kappa$ B activation.** Am J Nephrol. 2010;31:435–41.
7. MOZAR A, LOUVET L, GODIN C, MENTAVERRI R, BRAZIER M, KAMEL S, et al. **Indoxyl sulphate inhibits osteoclast differentiation and function.** Nephrol Dial Transplant. 2012;27(6):2176–81.
8. PENG Y SEN, DING HC, LIN YT, SYU JP, CHEN Y, WANG SM. **Uremic toxin p-cresol induces disassembly of gap junctions of cardiomyocytes.** Toxicology [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2012;302(1):11–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2012.07.004>
9. PENG Y SEN, LIN YT, CHEN Y, HUNG KY, WANG SM. **Effects of indoxyl sulfate on adherens junctions of endothelial cells and the underlying signaling mechanism.** J Cell Biochem. 2012;113(3):1034–43.
10. Of OJOS, **Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group.** KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. Kidney Int Suppl. 2013;3(1):4–4.
11. SESSO R DE CC, LOPES AA, THOMÉ FS, LUGON JR, WATANABE Y, SANTOS DR. **Diálise Crônica no Brasil - Relatório do Censo Brasileiro de Diálise, 2011.** J Bras Nefrol. 2012;34(3):272–7.
12. EL NAHAS M. **Cardio-Kidney-Damage: a unifying concept.** In: Kidney international. 2010. p. 14–8.
13. LUSIS AJ. **Atherosclerosis.** Nature. 2000;407(6801):233–41.
14. VANHOLDER R, MASSY Z, ARGILES A, SPASOVSKI G, VERBEKE F, LAMEIRE N. **Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality.** Nephrol Dial Transplant [Internet]. 2005 Jun [cited 2014 Oct 9];20(6):1048–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15814534>
15. SELIGER SL, GILLEN DL, TIRSCHWELL D, WASSE H, KESTENBAUM BR, STEHMAN-BREEN CO. **Risk factors for incident stroke among patients with end-stage renal disease.** J Am Soc Nephrol. 2003;14(10):2623–31.

16. HERZOG CA, ASINGER RW, BERGER AK, CHARYTAN DM, DÍEZ J, HART RG, et al. **Cardiovascular disease in chronic kidney disease**. A clinical update from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 2011;80(6):572–86.
17. HIMMELFARB J. **Uremic toxicity, oxidative stress, and hemodialysis as renal replacement therapy**. *Semin Dial.* 2009;22(6):636–43.
18. GLASSOCK RJ. **Uremic Toxins: What Are They? An Integrated Overview of Pathobiology and Classification**. *J Ren Nutr.* 2008;18(1):2–6.
19. PANNIER B, GUERIN AP, MARCHAIS SJ, METIVIER F, SAFAR ME, LONDON GM. **Postischemic vasodilation, endothelial activation, and cardiovascular remodeling in end-stage renal disease**. In: *Kidney International*. 2000. p. 1091–9.
20. VANHOLDER R, BAURMEISTER U, BRUNET P, COHEN G, GLORIEUX G, JANKOWSKI J. **A bench to bedside view of uremic toxins**. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(5):863–70.
21. 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.
22. VANHOLDER R, ARGILÉS A, BAURMEISTER U, BRUNET P, CLARK W, COHEN G, et al. **Uremic toxicity: Present state of the art**. *International Journal of Artificial Organs*. 2001. p. 695–725.
23. NIWA T. **Uremic toxicity of indoxyl sulfate**. *Nagoya J Med Sci.* 2010;72:1–11.
24. LIABEU F, DRÜEKE TB, MASSY Z a. **Protein-bound uremic toxins: New insight from clinical studies**. *Toxins (Basel)*. 2011;3:911–9.
25. BARRETO FC, STINGHEN AEM, OLIVEIRA RB DE, FRANCO ATB, MORENO AN, BARRETO DV, et al. **The quest for a better understanding of chronic kidney disease complications: an update on uremic toxins**. *J Bras Nefrol [Internet]*. 2014;36:221–35. Available from: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/0101-2800.20140033>
26. MASSY ZA, STENVINKEL P, DRUEKE TB. **The role of oxidative stress in chronic kidney disease**. *Semin Dial.* 2009;22(4):405–8.

27. ANNUK M, ZILMER M, LIND L, LINDE T, FELLSTRÖM B. **Oxidative stress and endothelial function in chronic renal failure.** J Am Soc Nephrol. 2001;12(12):2747–52.
28. STODDART MJ. **Cell viability assays: introduction.** Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). 2011. p. 1–6.
29. MOSMANN T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** J Immunol Methods. 1983;65:55–63.
30. RISS T, MORAVEC R, NILES A, BENINK H. **Cell Viability Assays. Assay Guid Man** [Internet]. 2013;(Md):21. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/#\\_mmtassays\\_References\\_\nhttp://europepmc.org/abstract/MED/23805433](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/#_mmtassays_References_\nhttp://europepmc.org/abstract/MED/23805433)
31. MEIJERS BKI, DE LOOR H, BAMMENS B, VERBEKE K, VANRENTERGHEM Y, EVENEPOEL P. **p-Cresyl sulfate and indoxyl sulfate in hemodialysis patients.** Clin J Am Soc Nephrol [Internet]. 2009 Dec [cited 2014 Nov 27];4(12):1932–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2798868&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
32. MOZAR A, LOUVET L, MORLIÈRE P, GODIN C, BOUDOT C, KAMEL S, et al. **Uremic toxin indoxyl sulfate inhibits human vascular smooth muscle cell proliferation.** Ther Apher Dial. 2011;15(2):135–9.