

FLÁVIA SILVA REIS MEDEIROS

**Avaliação da dosagem sérica de cistatina C para  
detecção precoce de alterações na função do enxerto  
após o transplante renal**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina  
da Universidade de São Paulo para obtenção  
do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Nefrologia  
Orientador: Prof. Dr. Elias David Neto

**São Paulo**

**2007**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Medeiros, Flávia Silva Reis

Avaliação da dosagem sérica de cistatina C para detecção precoce de alterações na função do enxerto após o transplante renal / Flávia Silva Reis Medeiros. -- São Paulo, 2007.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Nefrologia.

Orientador: Elias David Neto.

Descritores: 1.Cistatinas 2.Taxa de filtração glomerular 3.Inulina 4.Transplante de rim

USP/FM/SBD-415/07

*À minha família:*

*meus pais, **Lourivaldo Cavalcante Reis** e **Maria Vilma Silva Reis**, que me ensinaram os valores nobres da vida e dos quais não me afasto em todos os caminhos que percorro e em todas as conquistas que alcanço;*

*meus irmãos, **Leonardo**, **Maurício** e **Sérgio**, pelo carinho e pela amizade verdadeira que nos mantém unidos e seguros;*

*meu marido, **João Paulo de Mello Medeiros**, por seu companheirismo e seu amor, que me tornam forte diante das dificuldades da vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

A todos os pacientes que participaram deste estudo, pelo carinho e confiança.

Ao meu orientador Professor Dr. Elias David Neto, pelo incentivo e orientação no desenvolvimento deste estudo.

Ao Dr. Luiz Estevam Ianhez, pelo apoio e carinho com que me recebeu na Unidade de Transplante Renal durante a Residência Médica de Nefrologia e nos quatro anos da pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Seguro e à Heloisa Shimizu pelo aprendizado adquirido no Laboratório LIM-12

À Fabiana Agena, enfermeira do grupo de pesquisa clínica, meu imenso agradecimento por sua ajuda na execução deste protocolo de pesquisa. E aos amigos Luciana Fadel, farmacêutica, e Rafael Nascimento dos Santos, auxiliar administrativo.

À minha amiga Elisangela dos Santos Prado, por sua constante companhia.

À Letícia Aparecida Lopes Néri por sua amizade e carinho, e por ter realizado com esmero todas as dosagens de cistatina C.

Ao Dr. Marcelo Tatit Sapienza, médico do Centro de Medicina Nuclear, a Sayuri, biomédica, e a Edislaine pelo empenho na realização dos exames.

À Dra Lílian Araújo e a todos os médicos da UTR, em especial à Dra. Francine Lemos por me ajudar nas decisões médicas do seguimento clínico dos pacientes. A Elisa Midori Yagyu, enfermeira-chefe da UTR.

À Dra Maria do Socorro Gusmão Amorim, por sua amizade e carinho.

Aos amigos Silvia Titan e Alexandre Pereira, meu agradecimento especial.

“Estudar não é um ato de consumir idéias,  
mas de criá-las e recriá-las”

Paulo Freire

# SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	34
3. MÉTODOS.....	36
3.1 Casuística .....	38
3.1.1 Casuística - FASE A e Projeto Piloto.....	38
3.1.2 Casuística - FASE B.....	40
3.2 Desenho do Estudo.....	41
3.3 Metodologia de dosagem dos marcadores de função renal.....	43
3.3.1 Determinação da Depuração Renal de Inulina.....	43
3.3.2 Determinação da depuração plasmática de <sup>51</sup> Cr-EDTA.....	46
3.3.3 Dosagem de Creatinina Sérica.....	49
3.3.4 Dosagem de Cistatina C Sérica.....	49
3.3.5 Dosagem de uréia em amostra de soro.....	50
3.3.6 Medida estimada do RFG por equações.....	51
3.4 Análise Estatística.....	52
4. RESULTADOS.....	56
4.1 FASE A.....	57
4.1.1 Dados demográficos.....	57
4.1.2 Medidas de depuração.....	58
4.1.3 Comparação entre a depuração renal de Inulina e a depuração plasmática de <sup>51</sup> Cr-EDTA.....	60
4.1.4 Variação Intra-individual da depuração plasmática de <sup>51</sup> Cr-EDTA.....	65
4.1.5 Comparação entre a medida de depuração de <sup>51</sup> Cr-EDTA e marcadores.....	66
4.2 FASE B.....	68
4.2.1 Dados demográficos.....	69
4.2.2 Medidas dos marcadores de função renal.....	71
4.2.3 Medidas de associação entre os marcadores – análises transversais.....	71
4.2.4 Medidas de associação entre os marcadores – análises longitudinais.....	77
4.2.5 Determinação da variabilidade intra-individual.....	89
6. DISCUSSÃO.....	90
7. CONCLUSÕES.....	106
8. ANEXOS.....	108
9. REFERÊNCIAS.....	112

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AUC:** área sob a curva

**C-G:** Cockcroft-Gault

**CV:** coeficiente de variação (%)

**CS:** concentração(s) sérica (s)

**<sup>51</sup>Cr-EDTA:** ácido etilenodiaminotetracético marcado com cromo-51

**<sup>99m</sup>Tc-DTPA:** ácido dietilenotriaminopentacético marcado com tecnésio-99m

**MDRD** ou **MDRDa:** Equação abreviada do estudo *Modification of Diet in Renal Disease*

**RFG:** Ritmo de Filtração Glomerular

**ROC:** *Receiver Operating Characteristics*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	FASE A – Fluxograma de Execução .....	41
<b>Figura 2 -</b>	FASE B: Seguimento Clínico .....	42
<b>Figura 3 -</b>	Percentual de redução da atividade radioativa em função do tempo para diferentes faixas de RFG.....	59
<b>Figura 4 -</b>	Comparação da depuração de Inulina e <sup>51</sup> Cr-EDTA: análise Bland&Altman.....	63
<b>Figura 5 -</b>	FASE B: Inclusão de pacientes transplantados recentes .....	69
<b>Figura 6 -</b>	Correlações dos marcadores cistatina C e creatinina com o RFG por <sup>51</sup> Cr-EDTA.....	72
<b>Figura 7 -</b>	Dispersão entre os marcadores cistatina C e creatinina nos meses 1, 3, 6 e 12 em toda a amostra de pacientes transplantados (7A), em transplantados recentes (7B) e tardios (7C).....	73
<b>Figura 8 -</b>	Relação entre os percentuais de mudanças anuais para medidas seriadas de RFG medido por <sup>51</sup> Cr-EDTA e as medidas de CS de Cistatina C (A), equações de Hoek (B) e Larsson (C).....	79
<b>Figura 9 -</b>	Relação entre os percentuais de mudanças anuais para medidas seriadas de RFG medido por <sup>51</sup> Cr-EDTA e as medidas de CS de Creatinina (A), equações de MDRDa (B), Cockcroft-Gault (C) e Nankivell (D).....	80
<b>Figura 10 -</b>	Relação entre os percentuais de mudanças anuais para medidas seriadas de RFG medido por <sup>51</sup> Cr-EDTA e as medidas de CS de Cistatina C, equações de Hoek e Larsson, em pacientes transplantados recentes (A-C) e tardios (D-F). .....	82
<b>Figura 11 -</b>	Relação entre os percentuais de mudanças anuais para medidas seriadas de RFG medido por <sup>51</sup> Cr-EDTA e as medidas de CS de Creatinina, equações de MDRDa, Cockcroft-Gault e Nankivell, em pacientes transplantados recentes (A-D) e tardios (E-H).....	84



- Figura 12** - Relação entre os percentuais de mudanças anuais para medidas seriadas de RFG medido por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  e as medidas de CS de Cistatina C (A), equações de Hoek (B) e Larsson (C), em pacientes transplantados com declínio no RFG por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ . .....86
- Figura 13** - Relação entre os percentuais de mudanças anuais para medidas seriadas de RFG medido por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  e as medidas de CS de Creatinina (A), equações de MDRD (B), Cockcroft-Gault (C) e Nankivell (D), em pacientes transplantados com declínio do RFG por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ . .....87

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b>	Definições de depuração renal e plasmática .....	4
<b>Tabela 2 -</b>	FASE A: inclusão .....	39
<b>Tabela 3 -</b>	Cálculo da depuração plasmática <sup>51</sup> Cr-EDTA.....	48
<b>Tabela 4 -</b>	FASE A: dados demográficos .....	57
<b>Tabela 5 -</b>	Medidas de depuração renal de inulina e depurações plasmáticas de <sup>51</sup> CrEDTA.....	58
<b>Tabela 6 -</b>	Depuração de inulina e <sup>51</sup> Cr-EDTA – análise de Regressão Linear.....	61
<b>Tabela 7 -</b>	Depuração de inulina e <sup>51</sup> CrEDTA - análise Bland&Altman .....	62
<b>Tabela 8 -</b>	Análise Bland&Altman por estágio de DRC .....	64
<b>Tabela 9 -</b>	Características demográficas – doador de rim após doação .....	65
<b>Tabela 10 -</b>	Comparação entre medidas repetidas de RFG por <sup>51</sup> CrEDTA em 22 doadores .....	66
<b>Tabela 11 -</b>	Comparação entre <sup>51</sup> Cr-EDTA, CS de cistatina C e de Creatinina, e RFG estimado por equações. Regressão Linear, Erro, Precisão e Acurácia .....	67
<b>Tabela 12 -</b>	FASE B: dados demográficos.....	70
<b>Tabela 13 -</b>	Valores das medidas de RFG e marcadores cistatina C e creatinina .....	71
<b>Tabela 14 -</b>	Transplante Recente – Mês 1: análise de Regressão Linear e medidas de erro, precisão e acurácia .....	75
<b>Tabela 15 -</b>	Transplante Recente – Mês 12: análise de Regressão Linear e medidas de erro, precisão e acurácia .....	76
<b>Tabela 16 -</b>	Transplante Tardio – Mês 12: análise de Regressão Linear e medidas de erro, precisão e acurácia .....	77
<b>Tabela 17 -</b>	Indicadores de qualidade dos testes de função renal .....	88
<b>Tabela 18 -</b>	Coeficiente de variação intra-individual .....	89

## RESUMO

Medeiros FSR. *Avaliação da dosagem sérica de cistatina C para detecção precoce de alterações na função do enxerto após o transplante renal* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 125p.

**INTRODUÇÃO:** A cistatina C é uma proteína não glicosilada de baixo peso molecular que é produzida por todas as células nucleadas. A medida da concentração sérica (CS) de cistatina C tem sido aclamada como um marcador de função renal superior à medida da CS de creatinina. No presente estudo, avaliou-se a acurácia diagnóstica da proteína cistatina C em estimar mudanças no Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) medido por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ , em análise longitudinal prospectiva de pacientes transplantados renais com tempo de transplante recente e tardio. Em uma fase inicial (Fase A), definimos a melhor estratégia metodológica para a realização do RFG por depuração plasmática de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  em receptores de enxerto renal utilizando a depuração renal de inulina como método padrão-ouro. **MÉTODOS:** Medidas simultâneas de depuração renal de inulina e de depuração plasmática de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  foram feitas em pacientes transplantados renais. A precisão do método de medida do RFG por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  foi avaliada em doadores após um ano de doação de rim. A análise de Bland&Altman foi empregada para avaliar a concordância entre os métodos. Em uma segunda fase, foram realizadas medidas das CS de cistatina C e de creatinina e do RFG por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  nos meses 1, 3, 6 e 12 de seguimento clínico do estudo em pacientes transplantados renais. A cistatina C foi dosada em amostras de soro, por técnica de imunonefelometria (*N Latex Cystatin C kit* - Dade Behring). A tendência da função renal foi obtida por Regressão Linear Simples. **RESULTADOS:** Na fase A, foram incluídos 44 pacientes transplantados renais e 22 doadores de rim com tempo de doação de 12,4 a 53,5 meses. A depuração de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  com amostras de sangue coletadas nos tempos 2, 4, 6 e 8 horas após injeção do radiofármaco apresentou forte correlação e alto grau de concordância com a depuração de inulina; uma estratégia única para todos os níveis de função foi estabelecida com amostras de sangue nos tempos 4 e 6 horas. Em uma segunda fase do estudo, oitenta e dois pacientes foram incluídos, com idade média de  $43,4 \pm 11,9$  anos. A maioria era da raça branca (56%) e do sexo masculino (68%). No mês 1, a média do RFG por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  foi de  $50,6 \pm 17,3$  ml/min/1,73m<sup>2</sup>, e foi de  $1,62 \pm 0,65$  mg/L para a CS de cistatina C e de  $1,40 \pm 0,62$  mg/dL para a CS de creatinina. Na análise transversal, foi encontrada uma forte correlação entre o RFG e a medida de CS de cistatina C. Entretanto, na análise longitudinal do seguimento clínico a CS de cistatina C não estimou a tendência de mudança no RFG. **CONCLUSÕES:** A depuração plasmática de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  é uma medida precisa e acurada de RFG que pode ser utilizada em substituição à depuração renal de inulina, em pacientes transplantados renais. Medidas seriadas da CS de cistatina C não foram capazes de detectar mudanças no RFG em pacientes transplantados renais.

Descritores: Cistatinas, taxa de filtração glomerular, inulina, transplante de rim

## SUMMARY

Medeiros FSR. *Evaluation of the serum concentration of cystatin C to early detection changes in graft function after kidney transplantation* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2007. 125p.

**INTRODUCTION:** Cystatin C is a nonglycosylated protein that is synthesized by all nucleated cells. The present study aimed to analyze the accuracy of serum concentration of cystatin C for detecting longitudinal change in glomerular filtration rate in transplanted recipients, as well to define a better methodological strategy to perform the plasma clearance of  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA in renal transplant patients using inulin clearance as the gold standard method. **METHODS:** in the first phase of the study, simultaneous measurements of plasma clearance of  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA and renal clearance of inulin in stable renal transplanted patients were performed. The within-subject repeatability of the  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA was evaluated in live kidney donors at least 12 months after donation. Bland&Altman statistical approach was used to quantify the degree of agreement between clearance of inulin and plasma clearance of  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA. In a second phase, serial measures of plasma clearance of  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA, serum cystatin C and serum creatinine were examined in following at 1, 3, 6 and 12 months in kidney transplanted patients. Serum cystatin C was measured by a nephelometric immunoassay (N latex cystatin C kit - Dade Behring). The trend in renal function over time was obtained by linear regression. **RESULTS:** In the first phase, 44 transplanted patients and 22 kidney donors at least 12 months after donation (range 12,4 to 53,5 months) were enrolled. Plasma clearance of  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA with four samples taken at 2, 4, 6 and 8 hours presented a strong association and closely agreement with inulin clearance. An abbreviated strategy was recommended with two blood sampling collected at 4 and 6 hours. In the second phase, 82 kidney transplanted patients were enrolled. Mean age was  $43.4 \pm 11.9$  years. The majority were white (56%) and male (68%). The mean of the plasma clearance of  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA was  $50.6 \pm 17.3$ , and it was  $1.62 \pm 0.65$  mg/L and  $1.40 \pm 0.62$  mg/dL for serum cystatin C and creatinine, respectively, at baseline. In cross-section analysis, serum cystatin C was strongly correlated with plasma clearance of  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA. However, in longitudinal analysis serum cystatin C was not able for estimate GFR. **CONCLUSIONS:** Plasma clearance of  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA is a precise method to measure GFR in renal transplanted recipients. The results showed that serial measurements of serum cystatin C are not able to detect trends in renal function in transplanted patients.

Descriptors: Cystatins, glomerular filtration rate, inulin, kidney transplantation

# **1. INTRODUÇÃO**

---

---

O transplante renal é a terapia indicada para a maioria dos pacientes com Doença Renal Crônica, garantindo melhor qualidade de vida e maior sobrevida a essa população. Quando comparado a indivíduos em terapia dialítica, pacientes transplantados têm menor mortalidade, conforme demonstrado por Wolf *et al.* <sup>1</sup> em uma análise retrospectiva de 228.552 pacientes em terapia renal substitutiva nos Estados Unidos.

Muitos fatores são conhecidos por influenciar os resultados do transplante renal: características do doador e do receptor, variáveis relacionadas ao transplante e ao pós-transplante, apresentação de função retardada do enxerto, desenvolvimento de rejeição e o esquema imunossupressor empregado.

Avanços na terapia imunossupressora garantiram menor incidência de rejeição aguda com grande impacto na sobrevida do enxerto renal. Entretanto, a perda tardia do enxerto após o primeiro ano de transplante permanece elevada, o que tem enfatizado a necessidade de novas estratégias terapêuticas e de ferramentas diagnósticas para otimizar a sobrevida do enxerto renal.

Nos últimos anos discutiu-se a identificação de marcadores preditivos de sobrevida do transplante, como índices histológicos e imunológicos, e a função do enxerto <sup>2</sup>. A preservação da função renal no primeiro ano do transplante é apontada como uma variável independente, que influencia na

sobrevida do enxerto em longo prazo. Hariharan *et al.*<sup>3</sup>, em revisão de 105.742 transplantes renais em adultos, realizados nos Estados Unidos entre 1988 a 1998, encontraram um aumento da sobrevida do enxerto no primeiro ano de 89,7% em 1988 para 94,3% em 1998 para transplantes com doador vivo e de 76,0% para 89,3% nos transplantes com doador cadáver. Os autores demonstraram que valores de creatinina sérica acima de 1,5 mg/dl no sexto mês e no 12º mês pós-transplante e um delta de creatinina  $\geq 0,3$  mg/dl (elevação da creatinina sérica do 6º ao 12º mês) estavam associados com um declínio na sobrevida do enxerto.

Sabendo-se do impacto da função renal na sobrevida do enxerto, a descoberta de um marcador de maior sensibilidade propiciaria a rápida detecção de fatores de injúria renal, com possibilidade de intervenções terapêuticas precoces. A demanda por um marcador ideal de função renal tem gerado continuadas pesquisas e conduzido à apreciação da importância de pequenos declínios na função renal eventualmente não perceptíveis com os atuais métodos utilizados no seguimento clínico dos pacientes.

O Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) é considerado o melhor índice de função renal, e a técnica mais utilizada para a sua avaliação é a medida da depuração plasmática de certos compostos, endógenos ou exógenos, pelos rins. A taxa de depuração (*clearance*) é definida como a quantidade de plasma que é clareada de uma substância na unidade de tempo. A determinação rigorosa do Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) requer a medida da depuração de um marcador que não seja reabsorvido e nem secretado pelo túbulo, sendo excretado na urina apenas por filtração glomerular.

O RFG pode ser mensurado pela técnica de infusão endovenosa contínua, com coletas de urina e sangue, a intervalos regulares; esse é o método padrão de depuração renal, e seu valor em ml/minuto é obtido por meio da equação descrita na tabela 1a.

A técnica de injeção única sem coleção de urina é outra maneira de se medir o RFG; com esse método determina-se a depuração plasmática, calculada a partir da dose injetada dividida pela área sob a curva de decaimento plasmático de dada substância, de acordo com a fórmula expressa na tabela 1b. Entretanto, para calcular a área sob a curva de maneira acurada são necessárias várias amostras da concentração ou da atividade do marcador no plasma. Sendo assim, a estimativa dessa área é baseada em equações matemáticas que calculam a inclinação da curva ou constante de clareamento plasmático em função do tempo, que se denomina método da inclinação-intercepto (ou *slope/intercept*), como mostra a tabela 1c.

**Tabela 1 - Definições de depuração renal e plasmática**

---

**1a - Depuração Renal:**  $RFG (ml/min) = \frac{U \cdot V}{P}$

U= concentração urinária do marcador excretado

V= volume urinário em ml/min

P= concentração plasmática do marcador

**1b - Depuração Plasmática: determinação AUC**

$$RFG (ml/min) = \frac{Q}{A}$$

Q= Quantidade do marcador injetado

A= Área sob a curva de decaimento no plasma do marcador

**1c - Depuração Plasmática: método inclinação-intercepto**

$$RFG (ml/min) = V \cdot k$$

V= Volume de distribuição do marcador

k= Constante de clareamento

---



A depuração plasmática de certa substância pode estimar a sua depuração renal, considerando-se que o volume de distribuição da substância e sua excreção renal sejam constantes ao longo do tempo e que não exista excreção extra-renal da mesma. Marcadores, como a inulina, os radioisótopos  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}$  e  $^{125}\text{I-lotalamato}$ , bem como os contrastes Iohexol e Iotalamato são os mais utilizados para medida de RFG, quer por depuração plasmática ou renal. A depuração plasmática pode superestimar a depuração renal na dependência do perfil cinético do marcador utilizado.

A depuração renal de inulina é o padrão-ouro de medida do RFG e, desde que descrito por Homer W. Smith, em 1951, poucas mudanças foram feitas na técnica original. A inulina é um polímero de frutose com peso molecular de 5,2 Kd e é encontrada na natureza em poucas espécies de plantas, como na alcachofra de Jerusalém, na dália e na chicória. Possui todos os atributos de um marcador ideal de filtração glomerular: não se liga às proteínas plasmáticas; distribui-se no fluido extracelular; é livremente filtrada pelos glomérulos e é inerte ao túbulo, não sofrendo reabsorção e nem secreção pela célula tubular renal.

A necessidade da realização do exame em condições padronizadas com infusão contínua endovenosa do marcador, o elevado custo do produto para uso endovenoso em humanos, além de aspectos peculiares da dosagem laboratorial trazem limitações ao uso da depuração renal de inulina na prática clínica, restringindo-a praticamente ao ambiente da pesquisa.

O emprego de contrastes radiológicos para determinação do RFG tem sido utilizado com a técnica de injeção única ou, menos freqüentemente, infusão contínua. Iotalamato (iônico) e Iohexol (não iônico) têm perfil cinético semelhante: são livremente filtrados pelo glomérulo e não sofrem reabsorção nem secreção tubular. Apresentam elevada precisão e acurácia diagnósticas, com alto coeficiente de correlação com inulina<sup>4,5</sup>. A concentração plasmática é determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (*HPLC- High Performance Liquid Chromatography*) ou pelo método analítico de eletroforese capilar. O elevado custo ainda é um fator limitante.

O uso de isótopos radioativos para a medida de filtração glomerular é cada vez mais difundido. As depurações plasmáticas de <sup>51</sup>Cr-EDTA e de <sup>99m</sup>Tc-DTPA são as mais utilizadas e têm se mostrado métodos simples e seguros.

A utilização do <sup>51</sup>Cr-EDTA como marcador de função renal em humanos foi descrita em 1967 por Garnett *et al.*<sup>6</sup>. Desde então, houve necessidade de simplificação da técnica, com tendência a substituir o modelo multicompartimental, que requer coleta de várias amostras de sangue para a determinação da área sob a curva (Tabela 1b), por um modelo unicompartmental em que a depuração é calculada a partir da atividade medida ao final da curva de decaimento com apenas uma ou duas amostras (Tabela 1c)<sup>7</sup>.

O método inclinação-intercepto parte do princípio de que o fármaco é imediatamente distribuído no compartimento único, cujo volume é dado pelo cálculo do volume de distribuição. A simplificação do método introduziu erros

sistemáticos, de modo que o valor do RFG obtido pelo método inclinação-intercepto superestima o valor do RFG dado pelo cálculo da área sob a curva. Dois fatores de correção têm sido empregados: a correção de Chantler *et al.*<sup>8</sup> e o fator de correção proposto por Brochner-Mortensen<sup>9</sup>.

Para comparar medidas de depuração plasmática e de depuração renal, Rehling *et al.*<sup>10</sup> fizeram simultaneamente as duas medidas para os marcadores <sup>51</sup>Cr-EDTA, <sup>99</sup>Tc-DTPA e Inulina em 20 pacientes com nefrectomia unilateral. A depuração plasmática dos 3 marcadores superestimou a depuração renal, sendo de 5,7ml/min para <sup>99</sup>Tc-DTPA, 6,0ml/min para <sup>51</sup>Cr-EDTA e 8,0ml/min para inulina. Sambataro *et al.*<sup>11</sup> também encontraram resultados, em média, de 2,5ml/min/1,73m<sup>2</sup> mais elevados de depuração plasmática em relação à depuração renal, medidas por <sup>51</sup>Cr-EDTA. Moore *et al.*<sup>12</sup> descreveram uma superestimação de 10% da depuração plasmática em relação ao valor da depuração renal de <sup>51</sup>Cr-EDTA. Resultados semelhantes já haviam sido demonstrados por Chantler e Barratt<sup>13</sup>.

Para os radioisótopos, a fração de eliminação extra-renal do marcador, bem como erros no cálculo da área sob a curva ou na estimação desta pelo método inclinação-intercepto são as causas para a superestimação da depuração plasmática em relação à sua depuração renal. Por outro lado, é descrito na literatura médica que a depuração renal de <sup>51</sup>Cr-EDTA subestima a depuração renal de inulina, o que tem sido atribuído à dissociação do isótopo 51-Cromo. Outras hipóteses menos prováveis seriam um percentual de ligação protéica do <sup>51</sup>Cr-EDTA ou ainda alguma reabsorção tubular do radiofármaco<sup>14-17</sup>.

Apesar da discussão acerca da superestimação da depuração plasmática em relação à depuração renal e da referida subestimação da depuração renal de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  sob depuração renal de inulina, a determinação do RFG por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  e por inulina tem resultados comparáveis, conforme descrito em estudos que encontraram elevados coeficientes de correlação entre esses métodos <sup>18-21</sup>.

Bröchner-Mortensen *et al.* <sup>22</sup> encontraram coeficiente de correlação de 0,97 com medidas simultâneas de depuração renal por inulina e  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  em 17 pacientes. Jagenburg *et al.* <sup>23</sup> descreveram resultados semelhantes ao comparar medidas de *clearance* renal por Inulina e  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  em 17 pacientes com insuficiência renal ( $r=0,97$ ).

Em 1976, Brochner-Mortensen e Rodbro <sup>24</sup> avaliaram a influência na reprodutibilidade da técnica de vários tempos de coleta das amostras de sangue e do número de amostras em pacientes com função renal normal ( $n=13$ ) e com doença renal ( $n=14$ ). O objetivo era determinar o método mais prático e adequado para a aplicação em todos os níveis de função renal. Os autores concluíram que, para pacientes com creatinina sérica normal, duas amostras de sangue colhidas em 180 e 240 min eram suficientes. Concluíram também que para todos os níveis de função renal, a depuração plasmática de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  poderia ser alcançada com precisão com uma coleta adicional mais tardia, aos 300 min da infusão do radioisótopo.

A depuração plasmática por radioisótopo é confiável para uso na prática clínica <sup>11, 25</sup>. Em transplante renal, Nyberg *et al.* <sup>26</sup> avaliaram a função renal de 87 pacientes que foram submetidos à depuração de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  aos 06, 12, 24,

36 e 60 meses após o transplante. Na análise individual, a creatinina não foi capaz de estimar o RFG de forma acurada. Ao final de cinco anos, dezoito pacientes haviam perdido o enxerto. Os autores concluíram que decréscimos ou acréscimos no RFG podem ser negligenciados quando apenas a medida da creatinina sérica é empregada como marcador de função.

Valores de referência para a depuração plasmática de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  foram definidos por Granerus e Aurell <sup>27</sup>, que estabeleceram limites de normalidade em função da idade:  $105 \pm 26\text{ml/min}$  até 30anos;  $98 \pm 23\text{ml/min}$  até 50 anos; e  $78 \pm 24\text{ml/min}$  até 70 anos de idade. Não foram encontradas diferenças entre os sexos.

A depuração plasmática de radioisótopo também pode ser determinada a partir da medida de radioatividade de uma única amostra de sangue coletada após a injeção única do radiofármaco. A técnica mais utilizada foi descrita em 1986 por Christensen e Groth <sup>28</sup> e posteriormente aplicada e testada em estudos clínicos <sup>29</sup>. Rydström *et al.*<sup>30</sup> mediram o RFG em 15 pacientes para testar a confiabilidade da técnica de amostra única na determinação da depuração de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ , comparando-a ao método padrão de múltiplas amostras de sangue. A correlação encontrada foi de 0,99 (r).

Nas últimas quatro décadas, a determinação do RFG por  $^{51}\text{CrEDTA}$  tem sido utilizada como uma medida precisa e acurada da função renal. Em relação ao método e ao número de amostras necessárias para a determinação da curva de decaimento plasmático, a recomendação atual é a utilização do método inclinação-intercepto.

Em relação ao número de amostras e tempos de coletas, algumas estratégias são recomendadas. Fleming *et al.*<sup>31</sup> sugerem 2, 3 ou 4 amostras, obtidas entre 2 e 5 horas após injeção do marcador, ou amostra única, obtidas entre 3 ou 4 horas pós-injeção para adultos e 2 horas para crianças. Essas recomendações são baseadas nos estudos de comparação entre depuração de <sup>51</sup>Cr-EDTA e inulina que incluíram voluntários saudáveis e pacientes com patologias renais de diversas etiologias, mas não pacientes transplantados renais. Apenas o estudo de Hangstam *et al.*<sup>16</sup> apresentava 01 paciente transplantado renal em uma casuística de 52 pacientes.

A função renal pode ser estimada através da determinação da CS de proteínas endógenas, como uréia, creatinina,  $\beta$ 2-microglobulina e, mais recentemente, a cistatina C.

A CS de uréia foi introduzida como índice de função renal em 1903, por Strauss. A uréia permanece como um teste de baixa precisão por ter poucos caracteres de um marcador ideal, visto que não tem um ritmo estável de produção e que o seu nível sérico é altamente dependente da ingestão e do catabolismo protéico, além de existir reabsorção tubular dessa proteína.

A  $\beta$ 2-microglobulina, uma proteína de 99 aminoácidos, tem sido proposta como marcador de função renal. Sua CS é independente de massa muscular ou sexo, mas parece ter produção aumentada em doenças inflamatórias e neoplásicas, o que tem limitado o seu uso na prática clínica.

A creatinina sérica é o marcador endógeno mais utilizado para estimar a função renal e, embora seja acessível na maioria dos laboratórios, com técnica simples e rápida de dosagem, a medida da CS de creatinina

apresenta limitações quanto à acurácia de seus resultados, especialmente por variações em sua produção e sua eliminação. A creatinina é formada a partir da hidrólise não-enzimática da creatina e da fosfocreatina musculares. Noventa e oito por cento da creatina é estocada no músculo após ter sido sintetizada no fígado a partir dos aminoácidos glicina e arginina. A outra fonte de creatina é a ingestão de carne. Um percentual de 1,6-1,7 do *pool* de creatina é convertido em creatinina a cada dia. A CS de creatinina é determinada, portanto, não somente por filtração glomerular, pois é altamente dependente da massa muscular do indivíduo, sofrendo variações com peso, idade, sexo, presença de doenças musculares e ingestão protéica <sup>32</sup>.

Muitos constituintes do plasma podem interferir na medida da creatinina quando se utiliza método colorimétrico baseado na reação de Jaffé. Os chamados cromógenos não-creatinina podem elevar a medida da CS de creatinina em até 20%. Ácido ascórbico, ácido úrico, acetoacetato, bilirrubinas, frutose, glicose e proteínas plasmáticas são exemplos de cromógenos endógenos que conduzem a uma falsa elevação da creatinina. As cefalosporinas também podem interferir na reação de Jaffé. Medidas como desproteinização de amostras e o uso de métodos enzimáticos, a exemplo da creatinina iminohidrolase ou amidohidrolase, foram introduzidas na rotina laboratorial para remover esses interferentes <sup>33</sup>.

A depuração de creatinina também traz limitações pela necessidade de armazenar urina por um período de 24 horas, pois fica sujeita a erros de coleta e ao esvaziamento incompleto da bexiga, além do efeito de secreção tubular da creatinina. Por se tratar de uma pequena molécula de 113 daltons

e não se ligar às proteínas plasmáticas, a creatinina é livremente filtrada pelos glomérulos; entretanto, cerca de 10 a 20% da creatinina excretada na urina provém de sua secreção pela célula tubular proximal. A secreção tubular é o principal determinante da superestimação da função renal quando se utiliza a depuração de creatinina; essa secreção pela célula tubular é variável num mesmo indivíduo e se eleva à medida que se reduz a filtração glomerular<sup>34, 35</sup>.

Para aumentar a sensibilidade da depuração de creatinina em estimar o RFG, alguns investigadores têm proposto a inibição da secreção de creatinina por cimetidina. Embora tenham alcançado elevação de creatinina sérica, sem mudança no RFG medido por inulina, <sup>51</sup>Cr-EDTA ou Iotalamato, foram necessárias altas doses da droga (1200mg a 2400mg/dia) para reduzir o transporte tubular de creatinina<sup>36, 37</sup>.

Nos últimos anos, tem sido preconizada a utilização de equações para estimar o RFG em vez do uso da creatinina isolada como marcador de função renal. Essas fórmulas têm o propósito de reduzir a influência dos fatores, não relacionados à filtração glomerular, que determinam a CS de creatinina, tais como peso, altura, idade, sexo, raça, dieta e o método analítico laboratorial utilizado, como já citado acima. As equações mais utilizadas são: Cockcroft-Gault, MDRD e a equação de Nankivell.

A fórmula proposta em 1976 por Donald W. Cockcroft e por Henry Gault<sup>38</sup> é a mais usada na prática clínica. A equação foi derivada da relação encontrada, por regressão linear, entre idade e excreção urinária de creatinina/Kg, em 249 pacientes; todos eram do sexo masculino, com idade



entre 18 e 92 anos, e tinham duas medidas prévias de depuração de creatinina de 24 horas. A redução de 15% para o sexo feminino foi baseada em estudos prévios, que observaram valores de depurações cerca de 10% a 20% mais baixos nas mulheres.

Posteriormente, Sokoll *et al.*<sup>39</sup> validaram a equação proposta por Cockcroft-Gault em 279 mulheres saudáveis, com idade entre 40-95 anos, confirmando o fator de correção de 15%. A equação também superestima a filtração glomerular nas diversas populações em que tem sido aplicada.

Em 1995, Nankivell *et al.*<sup>40</sup> desenvolveram uma equação para estimar o RFG por análise de creatinina sérica, depuração plasmática de <sup>99m</sup>Tc-DTPA e dados demográficos em uma população de 256 pacientes transplantados renais. A fórmula, que inclui peso, altura, uréia e creatinina sérica, foi aplicada em outra amostra similar de 255 transplantados renais, obtendo-se melhor correlação entre a medida de RFG por <sup>99m</sup>Tc-DTPA e a equação proposta ( $r= 0,84$ ) quando comparada à correlação entre o RFG e a equação de Cockcroft-Gault ( $r=0,71$ ).

Em 1999, Levey *et al.*<sup>41</sup> apresentaram uma nova equação para estimar o RFG a partir da CS de creatinina, variáveis demográficas, níveis séricos de albumina e uréia e também a medida de RFG por <sup>125</sup>I-*Iotalamato*. A análise de regressão múltipla foi aplicada aos dados obtidos de 1070 pacientes incluídos no estudo MDRD (*Modification of Diet in Renal Disease*), que teve como objetivo avaliar o efeito da restrição protéica e do estrito controle pressórico na progressão da Doença Renal Crônica. A fórmula MDRD foi validada em outros 558 pacientes desse

mesmo estudo e o percentual de erro em estimar o RFG (medido por  $^{125}\text{I}$ -Iotalamato) foi de 19,8% para a equação de Cockcroft-Gault e de 11,5% para a equação do MDRD.

## **CISTATINA C**

Cistatina C é uma proteína de baixo peso molecular, descoberta em 1961 por Clausen <sup>42</sup> em amostra de líquido e posteriormente descrita por Butler e Flynn <sup>43</sup> como uma proteína de perfil eletroforético gama, isolada de amostras de urina fresca de 46 pacientes com diversas patologias renais, em um estudo desenhado para análise de proteinúria em 193 pacientes.

Em 1982, utilizando anticorpos de coelho contra proteína de traço gama humana, Grubb e Löfberg <sup>44</sup> identificaram a proteína em glândula pituitária e em amostras de urina de pacientes com insuficiência renal aguda. Somente em 1984, Barrett *et al.* <sup>45</sup> descreveram a função biológica dessa proteína como inibidora de cisteína proteinase, sendo proposto o nome cistatina C por sua similaridade estrutural e funcional com cistatinas descobertas em ovos de galinha.

Em 1985, Simonsen *et al.* <sup>46</sup> correlacionaram a CS de cistatina C com a filtração glomerular medida por  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA em 106 pacientes com doenças renais de diversas etiologias; o coeficiente de correlação com o RFG foi de 0,75 e 0,73 para o inverso da CS de cistatina C e de creatinina, respectivamente.

A cistatina C é produzida em ritmo constante por todas as células nucleadas, e sua presença já foi demonstrada no interior de células, assim como sua secreção em diversos fluidos extra-celulares<sup>47, 48</sup>.

Abrahamson *et al.*<sup>49</sup> estudaram a estrutura do gene da cistatina C humana e sua expressão em vários tecidos; as amostras foram coletadas de 79 autópsias. O gene da cistatina C foi localizado no cromossoma 20. O experimento com técnica *Northern-Blot* detectou o RNAm em rim, fígado, pâncreas, intestino, estômago, pulmão, vesícula seminal e placenta. Essa expressão gênica aparentemente não específica de um tecido está relacionada às características encontradas em regiões de sua estrutura que se atribuem aos genes do tipo *housekeeping* ou genes constitutivos, isto é, um gene que é continuamente transcrito num nível relativamente constante e cujos produtos de transcrição são necessários à manutenção das células.

A cistatina C é um inibidor de proteinases cisteínicas, uma das cinco classes de proteinases: metaloproteases, proteases de serina, treonina, ácido aspártico e cisteína proteases. As proteinases ou proteases são enzimas que atuam no processo de degradação protéica e estão envolvidas em uma variedade de reações metabólicas. Essas enzimas têm suas atividades reguladas por seus inibidores, os quais podem proteger a célula de uma proteólise inapropriada e/ou controlar os mecanismos responsáveis pela degradação protéica intra e extracelular<sup>50, 51</sup>.

Nos últimos 20 anos, além da cistatina C, vários inibidores de cisteína protease foram identificados em humanos e com homologia estrutural à cistatina C, sendo agrupados em uma superfamília de cistatinas com

12 membros, subdividida em: Família 1 ou estefinas, que incluem as cistatinas A e B; Família 2 ou cistatinas, que compreendem as cistatinas C, D, E, F, G, S, AS e SN, que têm como característica a presença de duas pontes de sulfeto no terminal carboxi; Família 3, formada por duas glicoproteínas, nomeadas kininogênios, de alto e baixo peso molecular <sup>52, 53</sup>.

A Cistatina C é uma proteína não glicosilada, com peso molecular de 13,35 daltons, constituída por uma cadeia polipeptídica de 120 aminoácidos, com uma ponte de enxofre entre os resíduos 73 e 83 e uma entre os resíduos 97 e 117; o ponto isoelétrico é de 9,3 e tem carga positiva <sup>54</sup>. A seqüência de aminoácidos é dada por arginina (8 resíduos), histidina (3), lisina (7), fenilalanina (5), tirosina (4), leucina (8), isoleucina (2), metionina (3), valina (10), alanina (10), glicina (8), prolina (8), ácido glutâmico (12), serina (9), treonina (7), ácido aspártico (12) e quatro resíduos de cistina.

A cistatina C é livremente filtrada pelo glomérulo e degradada quase que por completo pela célula tubular proximal na presença de função e estrutura tubular normal. O processo de reabsorção e metabolização da cistatina C na célula tubular é cálcio-dependente e se dá por meio de sua ligação direta à megalina, um receptor endocítico presente na membrana apical da célula tubular proximal <sup>55</sup>.

Na presença de doença renal, a detecção de cistatina C na urina parece ser um promissor marcador de disfunção tubular, conforme tem sido sugerido por estudos que avaliaram a concentração urinária de cistatina C em pacientes adultos e crianças com diversas patologias renais <sup>56</sup> e em pacientes adultos com Insuficiência Renal Aguda <sup>57</sup>.

### **CISTATINA C - dosagem laboratorial.**

O primeiro ensaio laboratorial para dosagem de cistatina C foi desenvolvido por Lofberg e Grubb em 1979 por técnica de radioimunoensaio. Outros métodos utilizando essa técnica e outras, como fluorimunoensaio e ensaios enzimáticos, foram desenvolvidos ao longo dos anos<sup>58</sup>.

Em 1993, Pergande *et al.*<sup>59</sup> descreveram um método enzimático utilizando anticorpo de coelho anti-cistatina C humana, com tempo de dosagem mais rápido, porém ainda laborioso para a utilização em grande número de amostras; as dosagens foram realizadas em 66 indivíduos saudáveis, com diferentes valores para o intervalo de referência entre os sexos masculino e feminino.

Ensaio automatizados, mais rápidos e de maior precisão, utilizando a técnica de nefelometria e turbidimetria, possibilitaram a expansão do uso da cistatina C na prática clínica. Em 1994, Kyhse-Andersen *et al.*<sup>60</sup> descreveram o primeiro ensaio laboratorial por turbidimetria (*PETIA - Particle-enhanced immunoturbidimetry assay*) para a dosagem de cistatina C em amostras de soro e plasma. Esses dados também foram corroborados por Newman *et al.*<sup>61</sup> em 1995, ao determinar cistatina C por turbidimetria em 206 pacientes com diversas patologias renais, e por Finney *et al.*<sup>62</sup> em 1997, que descreveu o primeiro ensaio laboratorial baseado na técnica de nefelometria, cujo limite de detecção foi de 0,23-7,25mg/L.

Em muitos estudos, a medida sérica de cistatina C não apresentou interferências laboratoriais com bilirrubinas, paraproteínas, hemoglobina,

triglicérides, fator reumatóide, inflamação sistêmica (nível de PCR), presença de LES (Lúpus Eritematoso Sistêmico), dose de esteróides (prednisolona) e proteinúria<sup>62-64</sup>.

A CS de cistatina C não depende de massa muscular, sexo, raça ou superfície corpórea. Randers *et al.*<sup>65</sup>, em estudo com 250 voluntários doadores de sangue, encontraram diferença de 0,03 mg/L para o limite superior do intervalo de referência entre homens e mulheres, diferença considerada sem relevância clínica; um intervalo de referência comum para ambos os sexos foi calculado em 0,51-1,02mg/L, utilizando ensaio nefelométrico (DadeBehring Nephelometer System, BN II [DB-BN II]).

Em análise de amostras de soro de 270 voluntários doadores de sangue também não foram observadas diferenças na CS de cistatina C referente a sexo; o intervalo comum de referência foi estabelecido em 0,54-1,21 mg/L com a utilização de ensaio turbidimétrico<sup>66</sup>. Outros autores também não encontraram diferença para sexo nos valores de cistatina C<sup>67, 68</sup>.

Entretanto, em estudo de Knight *et al.*<sup>69</sup>, que envolveu 8058 adultos, a CS de cistatina C foi significativamente relacionada a aumento de idade, sexo masculino, tabagismo e níveis elevados de PCR (proteína c reativa), após ajustes para a depuração de creatinina medida em urina de 24 horas.

Em estudo com 309 doadores de sangue e utilização do método nefelométrico, o intervalo de referência para a CS de cistatina C foi de 0,53 a 0,92 mg/dL, para indivíduos com idade inferior a 50 anos, e de 0,58 a 1,02mg/dL, para idade acima de 50 anos; os valores mais elevados em

indivíduos mais velhos foram atribuídos ao envelhecimento renal, refletindo a queda de RFG observada com a senescência do órgão <sup>68</sup>.

Finney H *et al.* <sup>70</sup> estabeleceram intervalos de referência para a CS de cistatina C na população pediátrica, observando que a concentração de cistatina C não sofre influência de variáveis biológicas, como peso e massa muscular, que aumentam com o crescimento. A CS de cistatina C é mais alta em prematuros (0,43-2,77 mg/L), neonatos (0,81-2,32) e gradualmente declina no primeiro ano de vida. Em crianças com idade entre 1 e 17 anos, a CS de cistatina C foi constante com intervalo de referência de 0,50 a 1,27 mg/L. Já a CS de creatinina tem comportamento semelhante nos primeiros meses de vida, porém os níveis séricos crescem gradualmente na infância e na adolescência, independente da filtração glomerular.

Coll *et al.* <sup>71</sup> encontraram coeficientes de variação (CV) intra-ensaio para cistatina C e creatinina de 2,7% e 3%, respectivamente, enquanto o CV interensaio foi de 3,5% e 5,7%. Finney *et al.* <sup>62</sup> descreveram coeficientes de variação intra-ensaio e interensaio para a CS de cistatina C de 2,5% e 4,2%, respectivamente.

Keevil *et al.* <sup>67</sup> observaram maior CV intraindividual para a CS de cistatina C em relação ao CV para a CS de creatinina em amostras de sangue colhidas em duplicatas de 12 indivíduos saudáveis. O coeficiente de variação foi de 13,3% para a CS de cistatina C e de 4,9% para a CS de creatinina. Os autores concluíram que esse fato poderia revelar uma vantagem da CS de cistatina C como método de rastreamento de disfunção

renal, mas inapropriada para seguimento de pacientes com já estabelecida doença renal.

A estabilidade da CS de cistatina C em amostras de soro foi determinada por Erlandsen *et al.*<sup>63</sup>. A CS de cistatina C permaneceu estável por 7 dias em temperaturas de + 20 a -20°C. Para amostras estocadas a temperaturas de -80°C, a CS de cistatina C permaneceu estável por 06 meses.

A determinação da concentração de cistatina C na urina também já foi validada pelo método nefelométrico. Herget-Rosenthal *et al.*<sup>72</sup>, em avaliação de 133 voluntários saudáveis, encontraram valor máximo de 0,28mg/L e não observaram correlação com idade, nem interferências com a presença de bilirrubinas, albumina ou hemoglobina na amostra.

### **CISTATINA C - fatores clínicos de potencial influência na concentração sérica.**

#### **▪ Função tireoidiana**

Jayagopal *et al.*<sup>73</sup> analisaram as CS de cistatina C e de creatinina em 17 pacientes com hipotireoidismo e 19 pacientes com diagnóstico recente de hipertireoidismo. A média da CS de creatinina foi mais alta entre os pacientes hipotireoideos quando comparado com hipertireoideos e, após tratamento, teve queda de 13% no primeiro grupo e elevação de 22% no grupo com hipertireoidismo. Já a CS de cistatina C teve valores mais baixos



no hipotireoidismo e mais altos no hipertireoidismo e, após tratamento, teve elevação de 14% e queda de 21%, respectivamente.

Fricker *et al.*<sup>74</sup> encontraram resultados similares em população de 13 pacientes com hipertireoidismo e 9 com hipotireoidismo. No mesmo ano, Wiesli *et al.*<sup>75</sup> reproduziram esses dados em uma população de 26 pacientes com hipotireoidismo e 14 pacientes com hipertireoidismo subclínicos, mostrando alterações nos dois marcadores, creatinina e cistatina C, mesmo em distúrbios leves da função tireoidiana.

Todos os trabalhos revelam um comportamento paradoxal entre cistatina C e creatinina, tanto no estado hipotireoideo, quanto no hipertireoideo. O que não está claro em definitivo na literatura médica é se as alterações nos níveis séricos dos marcadores são corroboradas por similares mudanças no Ritmo de Filtração Glomerular. Faltam estudos longitudinais que mensurem o RFG por método independente da creatinina sérica, tais como inulina, radioisótopos ou contrastes.

À luz do conhecimento da ação da função tireoidiana sobre a hemodinâmica circulatória, os valores mais baixos de creatinina no hipotireoidismo são esperados com uma redução de fluxo plasmático renal e redução do RFG, já documentados em pacientes com hipotireoidismo<sup>76</sup>.

Por outro lado, sabe-se que os hormônios tireoidianos influenciam o transporte de sal e água nos túbulos renais, bem como o transporte ativo de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{H}^+$ . É possível que a secreção tubular de creatinina seja influenciada pelos hormônios tireoidianos, justificando os valores mais elevados de creatinina sérica no hipotireoidismo, sem corresponder a uma

diminuição do RFG. Os valores mais baixos da CS de cistatina C se justificariam pela menor taxa de metabolismo celular no hipotireodismo, com menor geração da proteína cistatina C <sup>77</sup>.

#### ▪ Corticosteróides

O efeito da terapia imunossupressora sob os níveis séricos de cistatina C tem sido questionado desde a observação feita por Bokenkamp *et al.* <sup>78</sup> de que crianças transplantadas renais teriam níveis mais elevados de cistatina C, quando comparadas a crianças com outras patologias renais, mas com igual nível de RFG medido por inulina. Os autores aventaram a hipótese de que drogas imunossupressoras poderiam induzir dano tubular com reabsorção da cistatina C e promover seu retorno à circulação sistêmica. Em outro estudo, os autores não encontraram mudanças na CS de cistatina C em crianças sob terapia com prednisona para tratamento de recidivas de síndrome nefrótica córtico-sensível <sup>79</sup>.

Risch *et al.* <sup>80</sup> estudaram a influência do glicocorticóide na CS de cistatina C em 73 pacientes transplantados renais, subdivididos de acordo com esquema imunossupressor recebido:

- 1) Ciclosporina (CSA) isolado (n=20);
- 2) CSA e Azatioprina (AZA) (n=20);
- 3) Baixa dose de prednisona (5 a 10mg/dia) associada a AZA ou CSA (n=20);
- 4) Metilprednisolona 500mg por 03 dias (n=13).

Não houve aumento significativo na CS de cistatina C entre os dois primeiros grupos, porém a administração de glicocorticóide esteve associada à elevação da CS de cistatina C. O efeito é dose dependente e sugere que a utilização da CS de cistatina C como marcador de função renal em pacientes transplantados renais possa subestimar a filtração glomerular. Cimerman *et al.*<sup>81</sup> também encontraram níveis mais altos de cistatina C em pacientes asmáticos não esteróide-dependentes após o uso de metilprednisolona - 40mg/dia por 01 semana. In vitro, em culturas de células, a exposição a elevadas doses de dexametasona produz significativo aumento, dose-dependente, na produção de cistatina C por possível aumento na transcrição do gene da cistatina C<sup>82</sup>.

Não há trabalhos publicados que discutam a influência de outras drogas imunossupressoras sob a CS de cistatina C.

#### ▪ Neoplasias

As proteases têm sido relacionadas à progressão de tumores malignos e acredita-se que sua ação é requerida para degradação de matrix extracelular que leva à invasão e à disseminação do tumor. O desenvolvimento de metástases parece depender da relação entre a atividade proteolítica e a concentração dos inibidores de proteases, dos quais a cistatina C é um potente inibidor extracelular da cisteína proteinase<sup>83</sup>.

Em estudo envolvendo 43 pacientes com melanoma metastático, 54 pacientes com melanoma cutâneo tratado e sem nenhuma evidência de metástase e 30 doadores de sangue saudáveis, os níveis das cisteínas

proteases catepsina B e H e do inibidor cistatina C foram significativamente mais elevados nos pacientes com metástases; a correlação entre cistatina C e creatinina foi mais fraca entre os pacientes com câncer em relação aos controles saudáveis. Os autores discutem que:

- 1) Os pacientes com doença neoplásica têm cistatina C mais elevada porque, de fato, têm filtração glomerular reduzida; nessa situação, a creatinina não seria um bom marcador pela reduzida massa muscular;
- 2) A cistatina C foi mais elevada nesses pacientes porque existe um fator não-renal que determina a CS de cistatina C <sup>84</sup>.

Finney *et al.*<sup>85</sup> não encontraram evidências para a associação de malignidade com elevação da CS de cistatina C no soro em estudo com 60 pacientes com Mieloma Múltiplo. Em outra série com 39 pacientes com mieloma múltiplo, os autores não encontraram relação entre concentrações de cistatina C e nível de paraproteínas ou estágios I, II e III da doença. Vinte dos 39 pacientes apresentaram RFG medido por <sup>51</sup>Cr-EDTA < 60ml/min e, destes, todos tiveram elevação de cistatina C, mas apenas 8 tiveram elevação de creatinina. De 19 pacientes com RFG acima de 60ml/min, a cistatina C esteve elevada em 10 pacientes, e nenhum apresentou elevação de creatinina <sup>86</sup>.

### **CISTATINA C – um marcador de função renal.**

A medida da CS de Cistatina C tem sido proposta como um marcador de função renal superior à creatinina por ter um ritmo de produção constante e CS independente de fatores distintos da filtração glomerular. Não está claro na literatura médica se as variáveis clínicas citadas acima, como disfunção tireoidiana, neoplasias e uso de corticosteróide, possam ser limitantes ao emprego da cistatina C na prática clínica.

Na grande maioria dos estudos publicados, a CS de cistatina C revela-se superior ou, pelo menos, igual à creatinina sérica como marcador de função renal<sup>58, 87</sup>. Dharnidharka *et al.*<sup>88</sup> realizaram meta-análise com inclusão de 46 artigos publicados e 8 resumos de congressos que compararam a acurácia das CS de cistatina C e de creatinina com métodos de medida de RFG, tal como Inulina, contrastes ou radioisótopos. Os autores concluíram, por meio da análise do coeficiente de correlação e da AUC, que a cistatina C é superior à creatinina.

Entretanto, outros autores não encontraram superioridade da CS de cistatina C em relação à CS de creatinina. Oddoze *et al.*<sup>89</sup> mostraram que a medida da CS de cistatina C não é mais sensível que a medida da CS de creatinina para detecção de redução de função renal em 49 pacientes diabéticos dependentes ou não de insulina. Os autores não encontraram diferenças entre sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo e negativo para a medida das CS de creatinina e cistatina C no diagnóstico de DRC, utilizando duas definições: RFG por <sup>51</sup>Cr-EDTA menor que 60ml/min/1.73m<sup>2</sup> e RFG menor 80ml/min/1,73m<sup>2</sup>.

Em outro estudo conduzido em 67 pacientes com DRC avançada, com RFG inferior a  $40\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$  medido por inulina, a medida da CS de cistatina C não foi superior à medida da CS de creatinina; na análise Bland&Altman não houve diferenças estatisticamente significantes em médias e desvios-padrão; na análise de curva ROC, usando ponto de corte de  $20\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$  e  $10\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ , também não houve diferença significativa na AUC <sup>90</sup>.

Delanaye P *et al.*<sup>91</sup>, em análise de 27 pacientes receptores de transplante cardíaco, descreveram maior correlação entre o RFG por <sup>51</sup>Cr-EDTA e  $1/\text{creatinina}$  ( $r=0,75$ ) em relação a  $1/\text{cistatina C}$  ( $r=0,66$ ); não houve diferença estatística na AUC calculada para detectar RFG abaixo de  $60\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ .

Stickle *et al.*<sup>92</sup>, em estudo que envolveu 67 crianças com idade entre 1,8 e 18,8 anos e com doenças renais de diversas etiologias, encontraram resultados equivalentes no coeficiente de correlação entre RFG por inulina e a recíproca cistatina C ( $r=0,869$ ) e Creatinina ( $r=0,892$ ).

A utilização da medida de CS de Cistatina C tem sido estudada em diversas populações. Em pacientes diabéticos, Mussap *et al.*<sup>93</sup> encontraram maior acurácia da medida da CS de cistatina C, quando comparado à medida da CS de creatinina, em discriminar pacientes diabéticos tipo 2 com RFG normal (acima  $80\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ ) e aqueles com reduzido RFG medido por <sup>51</sup>Cr-EDTA. Em outro estudo, a sensibilidade e a especificidade foram maiores para a medida da CS de cistatina C do que para a medida da CS de creatinina para distinguir entre pacientes com estágios II (microalbuminúricos)

e III (macroalbuminúricos sem disfunção) da nefropatia diabética, com AUC da cistatina C de 0,76 e da creatinina de 0,66<sup>94</sup>.

Perkins *et al.*<sup>95</sup> realizaram estudo longitudinal com seguimento de 04 anos que incluiu 30 pacientes índios Pima, do Arizona, com diagnóstico de diabetes mellitus. Todos os pacientes foram submetidos a uma medida anual de RFG por Iotalamato e dosagens séricas de cistatina C e de creatinina. Por meio de regressão linear foi determinada a tendência de mudança da função renal em função do tempo; a tendência de 100/cistatina C e Iotalamato foi fortemente correlacionada ( $r$  Spearman=0,77), quando comparado a 100/creatinina ( $r$  Spearman < 0,35), demonstrando a validade preditiva de seriadas medidas de cistatina C em detectar declínio na função renal ao longo do tempo em pacientes diabéticos.

Em idosos, o envelhecimento ocasiona redução no ritmo de filtração glomerular de 0,75 a 01ml/min/1,73m<sup>2</sup>/ano a partir dos 40 anos de idade. Apesar disso, o nível sérico de creatinina pode ser normal, face à menor geração de creatinina pela reduzida massa muscular nessa população. Fliser e Ritz<sup>96</sup> compararam depuração por inulina e medidas da CS de creatinina e cistatina C em indivíduos idosos e adultos saudáveis e, apesar da redução de depuração nos idosos, a média da CS de creatinina foi idêntica em ambos os grupos, enquanto que a média da CS de cistatina C foi significativamente mais elevada nos idosos. Quando comparada à medida da CS de creatinina, a medida da CS de cistatina C parece ter maior acurácia em detectar mudança na filtração glomerular tanto em idosos saudáveis, quanto na presença de comorbidades<sup>97-99</sup>.

Em estudo longitudinal envolvendo 4637 idosos, a medida da CS de cistatina C foi diretamente associada a maiores riscos de morte e de evento cardiovascular, quando comparada à medida da CS de creatinina <sup>100</sup>. Em estudo observacional com seguimento clínico de 3659 idosos sem doença renal, a CS de cistatina C também foi forte preditivo de risco para doença renal crônica <sup>101</sup>. Desse modo, a cistatina C parece ser um melhor marcador de função renal e pode ter implicação prognóstica entre indivíduos idosos sem diagnóstico de doença renal crônica pelos critérios padrões, medidos por creatinina sérica e *clearance* de creatinina. A CS de cistatina C também foi significativamente relacionada à maior mortalidade em análise de 743 homens idosos <sup>102</sup>.

Alguns estudos apontam para uma forte associação entre a CS de cistatina C e risco cardiovascular. Tem sido discutido, entretanto, se a predição do evento é maior porque a medida da CS de cistatina C é, de fato, um melhor marcador de filtração glomerular que a medida de CS de creatinina ou se seu nível sérico estaria aumentado por fatores outros independentes da filtração glomerular. Com base no claro conhecimento de que a disfunção renal está associada à inflamação e maior mortalidade cardiovascular, a medida da CS de cistatina C poderia ser preditiva de risco cardiovascular por ser mais sensível em reconhecer estágios iniciais da doença renal crônica. Atualmente não há evidência concreta de outra associação da CS de cistatina C a risco cardiovascular além de sua relação com o RFG <sup>103</sup>.



Em crianças, a determinação da função renal é particularmente difícil pelas mudanças no desenvolvimento renal, em especial no primeiro ano de vida. A creatinina é o marcador mais utilizado, mas mudanças na massa muscular com o crescimento influenciam os níveis séricos de creatinina, independente do nível de função. Além disso, nessa população, interferências laboratoriais com bilirrubinas são importantes face à prevalência de icterícia neonatal e hemólise, *in vitro*, que pode ocorrer com coleta de pequenas amostras.

Bokenkamp *et al.*<sup>104</sup> encontraram maior coeficiente de correlação para a CS de cistatina C ( $r=0,88$ ) em relação à CS de creatinina ( $r=0,72$ ) em amostras de soro de 184 crianças; diferente da creatinina, a cistatina C estimou o RFG por Inulina, independente de idade, sexo, raça, peso e superfície corpórea.

Helin *et al.*<sup>105</sup> descreveram coeficiente de correlação de 0,83 entre RFG por <sup>51</sup>Cr-EDTA e a medida da CS de cistatina C. Podracka *et al.*<sup>106</sup> encontraram maior variabilidade intra-individual para cistatina C ( $CV=10,3 \pm 4,9\%$ ) em relação à creatinina ( $CV=7,7 \pm 4,2\%$ ), em um total de 178 medidas simultâneas dos dois marcadores, em 20 crianças com transplantes de órgãos sólidos.

A dosagem sérica de creatinina e a depuração de creatinina têm valor limitado para determinar a função renal em pacientes com cirrose. Woitas *et al.*<sup>107</sup> analisaram a associação entre CS de cistatina C, CS de creatinina e o RFG determinado por inulina em 44 pacientes com diagnóstico

de cirrose; a maior correlação com o RFG foi encontrada para 1/cistatina C ( $r=0,661$ ;  $p<0,0001$ ), e não para 1/creatinina ( $r=0,279$ ;  $p=0,0662$ ).

Rocco *et al.*<sup>108</sup> compararam a acurácia da CS de cistatina C e da CS de creatinina em distinguir redução de RFG considerada abaixo de 72ml/min/1.73m<sup>2</sup> e medido por inulina em 36 pacientes cirróticos e 56 pacientes do grupo controle. A sensibilidade da CS de cistatina C foi de 73% no grupo controle e de 88% no grupo cirróticos; os valores para a CS de creatinina foram de 23% e 64%, respectivamente. Pacientes cirróticos, com RFG acima de 72ml/min, exibiram os mais baixos valores de CS de creatinina.

A medida da CS de cistatina C tem sido aclamada como um teste rápido, acessível e de maior sensibilidade diagnóstica também no transplante renal. O paciente transplantado renal está sujeito a mudanças em seu estado nutricional e catabólico pelos eventuais episódios de infecção e rejeições, além do uso crônico de corticosteróides, que, somados, reduzem massa muscular e, portanto, a geração de creatinina. Isso explica, em parte, os erros na estimativa de RFG por medidas séricas de creatinina após o transplante renal.

Leach *et al.*<sup>109</sup> realizaram análise retrospectiva da função do enxerto com medidas da CS de cistatina C, CS de creatinina e da depuração de creatinina no pós-transplante imediato de 21 pacientes. Nos pacientes que evoluíram com complicação pós-transplante, a cistatina C pareceu ser sinalizadora do evento clínico, pois somente esboçou queda expressiva após intervenção terapêutica (timoglobulina, metilprednisolona ou desobstrução

da via urinária); não existiu correlação entre os valores das CS de cistatina C e de creatinina na alta hospitalar e a sobrevida do enxerto em 05 anos.

Em uma análise de 30 pacientes transplantados, a medida da CS de cistatina C foi comparada à medida da CS de creatinina nas 03 primeiras semanas após o transplante. As medidas das CS de cistatina C e de creatinina apresentaram forte correlação ( $r=0,74$ ), mas a correlação foi melhor em pacientes com função imediata do enxerto ( $r=0,81$ ) em relação aos que apresentaram função retardada do enxerto ( $r=0,42$ )<sup>110</sup>. Uma segunda análise, utilizando esse mesmo grupo de pacientes e com medida do RFG por <sup>51</sup>Cr-EDTA, foi conduzida no 3º mês após o transplante; a melhor correlação com o RFG foi obtida com a recíproca da medida de CS de cistatina C ( $r=0,879$ )<sup>111</sup>.

Risch *et al.*<sup>112</sup> analisaram amostras de 30 pacientes estáveis após o transplante, os quais foram submetidos a uma única medida das CS de creatinina e de cistatina C e uma medida de RFG por iotalamato; a melhor correlação com RFG foi vista para cistatina C ( $r=0,83$ ). Para avaliar a acurácia dos dois marcadores em distinguir RFG  $\geq 60$ ml/min e  $<60$ ml/min, os autores utilizaram curva ROC, sendo a AUC de 1/cistatina C maior que a AUC de 1/creatinina ( $p=0,02$ ).

Um fator limitante ao uso da medida da CS de cistatina C na prática nefrológica era a ausência de fórmulas que permitissem a conversão de cistatina C em mg/L para ml/minuto. Sendo assim, à semelhança das equações desenvolvidas para estimar o RFG a partir da CS de creatinina, alguns autores têm proposto equações para estimar RFG com base no nível sérico de cistatina C.

A equação desenvolvida por Hoek *et al.*<sup>113</sup> ( $-4,32 + 80,35x (1/\text{cistatinaC})$ ) foi derivada da regressão linear do RFG por  $^{125}\text{I}$ -Iotalamato e da concentração plasmática de cistatina C medidas em 123 pacientes com idade entre 11 e 77 anos, dos quais 30 eram diabéticos.

Em 2004, em estudo que envolveu 100 pacientes com idade entre 4 e 92 anos, Larsson *et al.*<sup>114</sup> propuseram uma equação ( $77,24 \times \text{Cistatina C}^{-1,2623}$ ) para estimar o RFG a partir da correlação encontrada entre o RFG medido por Iohexol e a CS de cistatina C.

Pöge *et al.*<sup>115</sup> estimaram a filtração glomerular de 44 pacientes a partir de fórmulas baseadas na CS de cistatina C (Hoek; Larsson) ou na CS de creatinina (MDRD; Cockcroft-Gault) e compararam com RFG medido por depuração de inulina. A média do RFG por inulina foi de 28,3ml/min/1.73m<sup>2</sup> e, embora todos os 04 cálculos tenham superestimado a verdadeira medida de função ( $p < 0,0001$ ), o menor *bias* e a maior acurácia foram encontrados para as fórmulas que incluem a medida da CS de cistatina C. Resultados semelhantes foram observados em 2005 por White *et al.*<sup>116</sup> em análise de 117 receptores de enxerto renal.

Um grande número dos estudos transversais citados acima comparou as medidas das CS de cistatina C e creatinina em diversas populações; poucos trabalhos têm sido designados para a avaliação longitudinal do desempenho da cistatina C como marcador de função renal.

No presente estudo, avaliou-se a acurácia diagnóstica da medida da CS da proteína cistatina C em estimar mudanças no RFG medido por  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA em análise longitudinal prospectiva, com período de seguimento

de 12 meses em pacientes transplantados renais com tempo de transplante recente e tardio. Procurou-se também definir a melhor estratégia metodológica para a realização do RFG por depuração plasmática de <sup>51</sup>Cr-EDTA em receptores de enxerto renal.

## **2. OBJETIVOS**

---

---

## **Primário**

- Determinar a acurácia diagnóstica da CS de cistatina C como preditiva de mudança na filtração glomerular em pacientes transplantados renais.

## **Secundário**

- Implementar, no Hospital das Clínicas da FMUSP, a metodologia de mensuração da filtração glomerular pela depuração plasmática de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ , utilizando a depuração de inulina como medida padrão-ouro de RFG.
- Correlacionar a depuração plasmática de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  com a medida da CS de cistatina C, a medida da CS de creatinina e as medidas de RFG estimado por equações (Nankivell, MDRD, Cockcroft-Gault, Larsson, Hoek).

## **3. MÉTODOS**

---

---



O projeto de pesquisa intitulado “*Avaliação da dosagem sérica de cistatina C para detecção precoce de alterações na função do enxerto após o transplante renal*” foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq.) em sessão de 29/01/2004, sob o nº=1042/03, e submetido à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo com aprovação em 29/12/2004, processo nº 2004/059804.

O estudo foi delineado em duas fases, denominadas FASE A e FASE B. A primeira fase consistiu na validação de uma metodologia de medida de RFG por depuração plasmática de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. A depuração renal de Inulina foi utilizada como medida padrão-ouro de RFG. Em adição, a variabilidade intra-individual do método foi determinada em uma população de doadores de rim pós-doação. A FASE A do estudo foi precedida pela realização de um Projeto Piloto.

Na FASE B, fez-se seguimento clínico de pacientes transplantados renais com avaliação de função renal por meio de 03 marcadores: CS de cistatina C, CS de creatinina e determinação do RFG por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ .

## **3.1 Casuística**

### **3.1.1 Casuística - FASE A e Projeto Piloto**

Foram selecionados pacientes transplantados renais e doadores de rim da Unidade de Transplante Renal do HCFMUSP que preencheram todos os critérios de inclusão e nenhum dos critérios de exclusão:

#### **Critérios de Inclusão:**

- Pacientes transplantados renais em qualquer tempo do pós-transplante e doadores renais com tempo de doação superior a um ano.
- Pacientes e doadores que concordaram em assinar o TCLE.
- Idade acima de 18 anos.

#### **Critérios de Exclusão:**

- Pacientes Diabéticos
- Pacientes com antecedentes ou suspeita de uropatias obstrutivas ou refluxo vésico-ureteral.
- Ausência de condições para acesso venoso periférico.
- Gestantes.
- Participação em outro protocolo de pesquisa.

Pacientes transplantados de rim em seguimento regular no ambulatório da UTR foram convidados a participar do estudo, desde que preenchessem todos os critérios de inclusão e nenhum dos critérios de exclusão. Os primeiros 44 pacientes abordados que concordaram em assinar o TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) foram incluídos na FASE A do estudo.

Os pacientes incluídos na FASE A foram alocados de acordo com o RFG estimado pela equação de Cockcroft-Gault e a classificação de Doença Renal Crônica do *National Kidney Foundation* em grupos 1, 2, 3 e 4, conforme apresentado na tabela 2.

**Tabela 2 - FASE A: inclusão**

---

<b>Grupo 1</b> n=11	Estágio 1: RFG = $\geq 90$ ml / min/ 1,73m <sup>2</sup> .
<b>Grupo 2</b> n=11	Estágio 2: RFG = 60-89ml / min/ 1,73m <sup>2</sup> .
<b>Grupo 3</b> n=11	Estágio 3: RFG= 30-59 ml / min/ 1,73m <sup>2</sup> .
<b>Grupo 4</b> n=11	Estágio 4: RFG= 15-29 ml/min/1,73m <sup>2</sup>

---

Para a FASE A também foram selecionados 22 voluntários doadores de rim, com tempo de doação acima de um ano, sem doenças prévias ou uso contínuo de alguma medicação. Os voluntários foram submetidos a duas medidas consecutivas de depuração plasmática por <sup>51</sup>Cr-EDTA, com intervalo de tempo de duas semanas, para determinar o coeficiente de variação intraindividual do RFG por <sup>51</sup>Cr-EDTA.

O anexo A traz a descrição do projeto piloto.

### 3.1.2 Casuística - FASE B

Foram selecionados pacientes transplantados renais na Unidade de Transplante Renal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (UTR-HCFMUSP), no período de 01 de junho de 2005 a 01 de junho de 2006. Também foram incluídos para a FASE B pacientes transplantados renais tardios e em acompanhamento regular no ambulatório da UTR-HCFMUSP. Foram definidos como transplantados renais tardios os pacientes com tempo de transplante acima de um ano. Os pacientes selecionados preencheram todos os critérios de inclusão e nenhum dos critérios de exclusão.

#### **Critérios de Inclusão:**

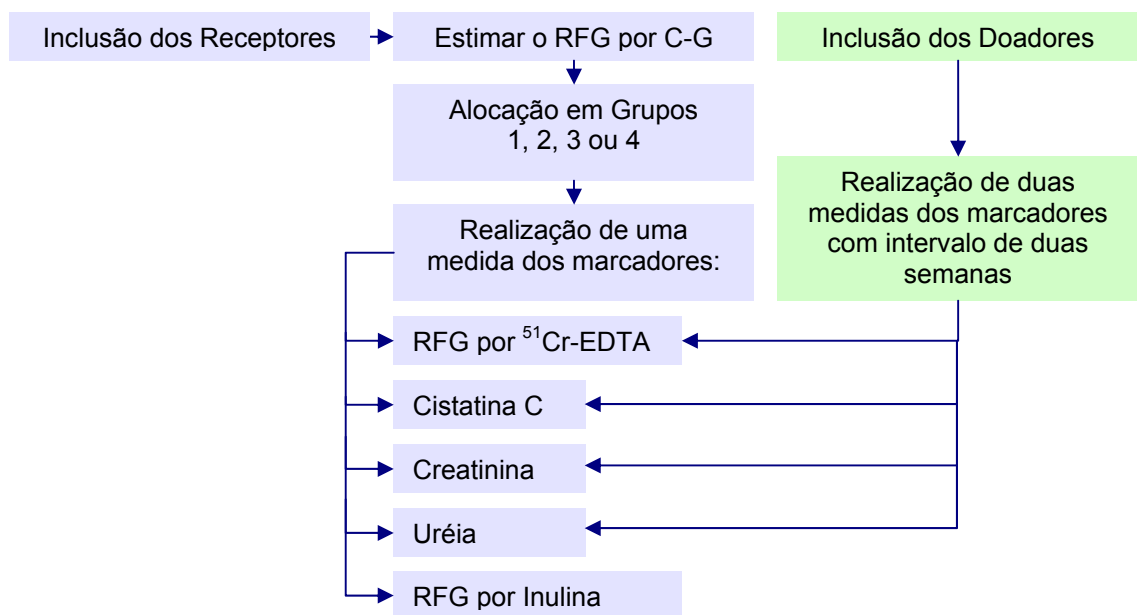
- Pacientes transplantados renais recentes e pacientes transplantados renais com tempo de transplante superior a um ano.
- Pacientes transplantados renais que concordaram em assinar o TCLE.
- Idade acima de 18 anos.

#### **Critérios de Exclusão:**

- Gestantes.
- Participação em outro protocolo de pesquisa.
- Receptor de transplantes múltiplos.
- Alta hospitalar após o 30º dia pós-operatório do transplante renal.

### 3.2 Desenho do Estudo

Para a FASE A, os pacientes alocados nos quatro grupos 1, 2, 3 e 4 foram submetidos a uma medida simultânea de depuração renal de inulina e depuração plasmática de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ ; no mesmo momento foram coletadas amostras de sangue para determinar a CS dos marcadores endógenos: creatinina, cistatina C e uréia. A figura 1 traz um fluxograma de execução da FASE A.

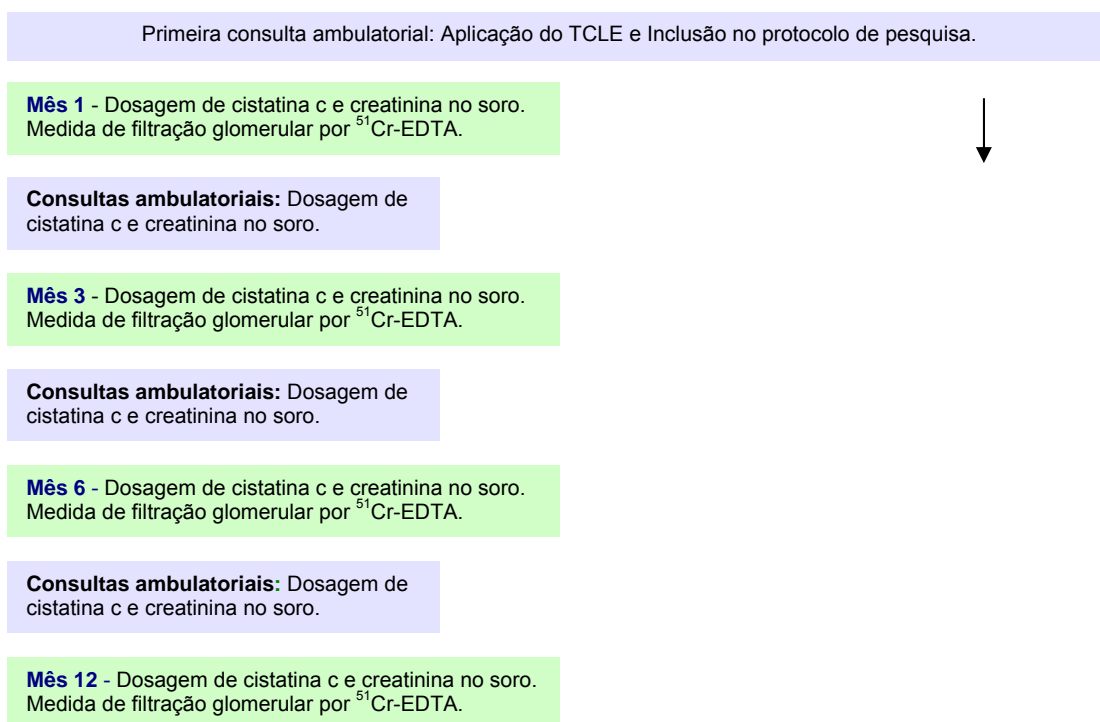


**Figura 1** - FASE A – Fluxograma de Execução

Na FASE B foi realizado seguimento clínico de pacientes transplantados renais com avaliação de função renal por meio de três marcadores: CS de cistatina C, CS de creatinina e determinação do RFG por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ . Os pacientes incluídos no estudo foram acompanhados no

ambulatório da Unidade de Transplante Renal por período de 12 meses. Para os pacientes transplantados renais recentes, a frequência das visitas ambulatoriais foi semanal nos primeiros dois meses após o transplante, quinzenal do 3º ao 5º mês e mensal a partir do 6º mês pós-transplante. Para os pacientes transplantados tardios, a frequência das visitas foi trimestral.

Conforme mostra a figura 2, todos os pacientes foram submetidos à medida de depuração plasmática de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  e às medidas das CS de cistatina C e de creatinina em quatro momentos pré-fixados: na inclusão no estudo, no 3º, 6º e 12º mês após o transplante ou de seguimento, para os transplantados tardios. Além desses momentos pré-fixados, a função do enxerto foi avaliada em todas as visitas ambulatoriais através das medidas da CS de cistatina C e de creatinina.



**Figura 2** - FASE B: Seguimento Clínico

### 3.3 Metodologia de dosagem dos marcadores de função renal

#### 3.3.1 Determinação da Depuração Renal de Inulina

Os pacientes que preencheram os critérios de inclusão e nenhum critério de exclusão foram submetidos à realização concomitante da depuração renal de inulina e depuração plasmática por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ . As medidas de depuração foram feitas na enfermaria da Unidade de Transplante Renal. Os pacientes foram mantidos em repouso absoluto no leito, em decúbito dorsal, após período de jejum de 12 horas e dieta pobre em proteínas nas 18 horas que antecederam ao exame.

A apresentação farmacêutica da inulina utilizada foi o polyfructosan, uma forma sintética de inulina (sinistrin, INUTEST 25%, Fresenius Kabi Austria GmbH, Linz, Austria). Esse polímero de frutose tem elevada solubilidade e conveniência para administração endovenosa, com equivalente permeabilidade na membrana basal glomerular. A inulina foi administrada com técnica de infusão contínua, em veia periférica e com Bomba de Infusão Contínua (marca B.Braun) após dose em bolus de  $1,5\text{g/m}^2$  de superfície corpórea diluída em 100ml de SF 0,9%. O tempo de infusão foi de 05h30min, dando início às 07h30min e término às 13h. Os pacientes receberam aporte hídrico de 400ml antes da infusão do *bolus*, seguidos por 200ml de água a cada 30 minutos, até o final do exame. Após 90 minutos de infusão, tempo necessário para a estabilização da inulina no sangue, foi feita coleta de sangue e solicitado ao paciente esvaziamento espontâneo da bexiga,

dando início ao 1º período de depuração. Para cada paciente foram feitos 04 períodos de *clearance*, e o resultado final dado como a média dos 04 períodos.

O esvaziamento vesical se deu de modo espontâneo. A decisão por não cateterização foi baseada em estudos já publicados de validação de métodos de depuração que utilizaram a depuração renal de inulina como método padrão-ouro e com esvaziamento espontâneo da bexiga<sup>14, 15, 18, 19, 23</sup>.

A metodologia utilizada para a dosagem de inulina na urina e no plasma foi a mesma já estabelecida no laboratório LIM-12 (FMUSP). O método empregado foi espectrofotometria, utilizando o Reagente de Antrona<sup>117</sup>. A primeira diluição da urina foi idêntica (1/11) à técnica já padronizada; entretanto, a 2ª diluição foi adequada e fixada em 1/3.

A partir da realização de uma Curva Padrão de Inulina, o fator de correção encontrado foi de 76,27, com  $r = 1,0$ ;  $p = 0,0028$ .

### **Dosagem de inulina no plasma**

Os plasmas foram desproteinizados por meio da diluição 1:11 do plasma (50 µl) em ácido perclórico a 5% (500 µl) e centrifugação de 06 min; em tubo de ensaio, aos 250 µl do sobrenadante se adicionava 3,0ml do reagente de antrona. Para o tubo branco, adicionava-se 3,0ml de reagente de antrona a 250 µl de ácido perclórico a 5%. Os tubos foram agitados antes e depois do reagente de antrona e colocados em banho-maria por 10 minutos. Após esse período cronometrado, os tubos foram resfriados em água corrente; a leitura da amostra foi feita por



espectrofotometria em 620nm e a concentração plasmática dada pela equação 1, descrita abaixo.

Concentração plasmática de inulina (mg/dL) = (Absorbância da amostra x Fc x 11) / 5.

### **Dosagem de inulina na urina**

Em tubo de ensaio, 100 µl da amostra de urina diluída foi adicionada a 150 µl de ácido perclórico a 5%, seguido por 03ml do Reagente de Antrona. Os tubos foram agitados antes e após a adição do Reagente de Antrona. Para o tubo branco (*blank*), 100 µl de água destilada era adicionada a 150 µl de ácido perclórico a 5%, seguido por 03ml do Reagente de Antrona. O tubo foi agitado antes e após a adição do Reagente de Antrona.

Os tubos de ensaio (amostras e *Blank*) foram colocados em banho-maria a 52°C por 10 minutos, depois resfriados em água corrente; por fim, foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 620nm. A concentração em mg/dL foi calculada pela fórmula abaixo.

Concentração Urinária de inulina (mg/dL) = (Absorbância x Fc x 11 x 3) / 2.

O critério de exclusão de algum período de *clearance* era somente se o débito urinário fosse abaixo de 02ml/min ou se houvesse grande disparidade dos outros 03 períodos de *clearance* acima de 15%. O coeficiente de variação (CV), descrito na literatura médica para períodos de depuração de inulina num mesmo teste é 5 a 15% e de 7,5% para repetidos testes num mesmo indivíduo <sup>118</sup>.

Para exclusão de todo o *clearance*, foram considerados os seguintes critérios: 1) não atingir concentração plasmática mínima de 20mg/dL; 2) não conseguir manter estabilidade da concentração plasmática por possível perda de acesso venoso e absorção inadequada do marcador.

O inibidor da calcineurina foi administrado na 6ª hora após injeção do radiofármaco; o inibidor da enzima conversora de angiotensina não foi administrado durante os testes com intuito de evitar queda na filtração glomerular induzida por estas drogas <sup>119</sup>. Prednisona e micofenolato foram administradas às 08 horas da manhã.

As infusões dos dois marcadores, inulina e <sup>51</sup>Cr-EDTA, foram feitas em braço contralateral, e as coletas de sangue, no braço contralateral à infusão. O acesso em veia periférica em ambos os braços foi mantida com cateter para infusão venosa periférica tipo escalpe número 21 ou 23.

### **3.3.2 Determinação da depuração plasmática de <sup>51</sup>Cr-EDTA**

#### **Procedimento no paciente**

O radiofármaco <sup>51</sup>Cr-EDTA foi administrado em dose única em bolus de 100µCi (01ml) em veia periférica e no braço contralateral à infusão de inulina. As coletas foram feitas no braço contralateral à infusão, nos tempos 120, 240, 360 e 480 minutos após infusão do marcador, com retirada de amostras de 10 ml de sangue. Para cada tempo foi feita anotação rigorosa do horário de coleta. As amostras foram centrifugadas a 3500rpm, por 10 minutos, e encaminhadas ao Centro de Medicina Nuclear – HCFMUSP.

### **Atividade Radioativa**

Uma amostra “padrão” foi obtida a partir da diluição de 100 $\mu$ Ci em 500ml de solução fisiológica a 0,9%. Após homogeneização, retirava-se 03 ml dessa solução como “amostra padrão”. A contagem de radiação em uma amostra do padrão permite recuperar a informação sobre a atividade administrada ao paciente; conforme exemplificado abaixo, essa informação foi utilizada para o cálculo do volume de distribuição (Tabela 3).

Os volumes de plasma e de padrão foram iguais a 03ml. O plasma separado das amostras de sangue e o padrão foram analisados em um contador de poço, calculando-se a atividade radioativa por mL. O tempo de leitura de uma amostra pelo Contador foi de 5 minutos.

O contador de poço é um aparelho que detecta e mede radiação. A atividade radioativa da amostra é definida como o número de transformações ou desintegrações dos núcleos atômicos a cada segundo. A atividade de uma amostra contendo átomos radioativos é medida em Bq ou Ci.

Bq (Becquerel)= uma desintegração por segundo.

Ci (Curie)= $3,7 \times 10^{10}$  Bq.

### **Depuração Plasmática**

A taxa ou constante de clareamento (k) multiplicada pelo volume de distribuição (v) do radiofármaco fornece a depuração plasmática em ml/min.

A tabela 3 define as variáveis utilizadas para o cálculo da depuração:

**Tabela 3** - Cálculo da depuração plasmática <sup>51</sup>Cr-EDTA

---


$$\text{Depuração Plasmática (ml/min)} = k.V$$


---

V= volume de distribuição.

K= Constante de clareamento; obtida pela inclinação da curva (= *slope*); representa a taxa de clareamento do EDTA por unidade de tempo.

Volume de distribuição= *Atividade administrada / Concentração plasmática no tempo zero.*

Atividade administrada = (*atividade/ml do padrão*) x (*volume de diluição do padrão*) x (*relação entre as atividades do paciente e do padrão*).

Concentração plasmática no tempo zero= *o intercepto da curva plasmática (obtido por extrapolação da curva até o ponto zero). Representa a concentração inicial de EDTA no plasma, assumindo-se que haja uma perfeita homogeneização no compartimento único extracelular, antes de se iniciar sua eliminação renal.*

---

As curvas de depuração plasmática foram calculadas através de planilha eletrônica (Excel), com base nos pontos de medida da atividade radioativa nas amostras obtidas em 120, 240, 360 e 480 minutos após injeção do marcador <sup>51</sup>Cr-EDTA. A correção de Brochner-Mortensen foi aplicada aos valores de filtração glomerular obtidos para correção de erros sistemáticos da técnica de inclinação-intercepto <sup>9</sup>:

$Cl_1 = 0.99 \times Cl_2 - 0.0012 \times Cl_2^2$ , onde  $Cl_1$  é o clearance corrigido para 1ª exponencial e  $Cl_2$  é o clearance não corrigido.

Análises de diferentes combinações de coletas usando a técnica inclinação-intercepto (com dois ou mais tempos de coleta) foram também comparadas com a técnica de amostra única proposta por Groth <sup>28, 29, 120</sup>.

Para cálculo do RFG com a técnica de amostra única, o método de Christensen-Groth foi utilizado de acordo a fórmula abaixo:

$Cl = - \ln (ECV / V_t) \times ECV / (t \times g(t))$ , onde  $ECV = 8116.6 \times A - 28.2$  é o volume extracelular, t(min) o tempo de coleta da amostra de

sangue,  $A$  ( $m^2$ ) área de superfície corpórea, e  $g(t)$  é a função  $g(t) = (0.0000017xt - 0.00120) \times CI - 0.00075xt + 1.31$ .

### 3.3.3 Dosagem de Creatinina Sérica

A medida da CS de creatinina foi determinada com a utilização do método de Jaffé modificado. O método tem como princípio a reação de Jaffé, que consiste na reação, em solução alcalina, da creatinina com o ácido pícrico, formando um complexo amarelo avermelhado. A leitura espectrofotométrica foi medida em comprimento de onda de 512 nm; a intensidade da cor é diretamente proporcional à CS de creatinina.

Os insumos empregados foram produzidos pela empresa Roche Diagnóstica Suíça (artigo 11875418). O método foi adaptado para o analisador bioquímico automatizado Modular Hitachi 917 Roche Diagnóstica Suíça.

A sensibilidade e a linearidade para o ensaio de creatinina sérica são, respectivamente, 0,2 e 25 mg/dL. O coeficiente de variação intra-ensaio é de 1,67 e o interensaio é de 1,09.

Os valores de referência foram estabelecidos para homens em 0.7-1.2 mg/dl (62-106  $\mu\text{mol/l}$ ) e, para mulheres, em 0.5-0.9 mg/dl (44-80  $\mu\text{mol/l}$ ).

### 3.3.4 Dosagem de Cistatina C Sérica

A medida da CS de cistatina C foi realizada em amostras de soro por técnica de Nefelometria. As amostras foram dosadas em nefelômetro BN II Dade Behring (Sistema BN), empregando-se insumos da mesma procedência do equipamento (*kit N Latex Cystatin C*).

O método de imunonefelometria utiliza partículas de poliestireno carregadas com anticorpo de coelho específico contra a cistatina C humana, que, na presença de amostras de soro contendo cistatina C, sofrem aglutinação, gerando luminescência. A intensidade de luz dispersa no equipamento depende da concentração da proteína cistatina C na amostra; a concentração analítica da amostra pode ser determinada por comparação com diluições de um padrão de concentração conhecida.

Para o ensaio laboratorial, todos os passos foram executados automaticamente pelo aparelho (Sistema BN), que inclui um *software*. As amostras de soro foram diluídas a 1:100 com diluente N; esse reagente N é composto por uma suspensão de partículas de poliestireno carregadas com aproximadamente 0,03g/L de anticorpo de coelho anti-cistatina C humana.

O controle de qualidade é dado pelos controles do material do calibrador, cuja fonte é um purificado de cistatina C humana (*control cystatin c*). A curva de calibração fornece intervalos de medidas de 0,23-7,25mg/L.

A variação intra-ensaio é de 2,3 a 4,1%; a variação interensaio de 2,6 a 3,3%; o valor de referência é de 0,50 a 0,96mg/L.

### **3.3.5 Dosagem de uréia em amostra de soro**

A uréia foi dosada em amostra de soro pelo método cinético, que utiliza o sistema enzimático urease/ glutamato desidrogenase (GLDH). A uréia contida na amostra é hidrolisada em amônia e CO<sub>2</sub> na presença da

enzima urease. A amônia formada reage com alfacetoglutarato e NADH (dinucleotíde adenina de nicotinamide), na presença de GLDH, gerando NAD, L-glutamato e água. A diminuição na absorvância devido ao consumo de NADH é medida cineticamente.

### 3.3.6 Medida estimada do RFG por equações

Equações baseadas na concentração sérica de creatinina:

-Equação de Cockcroft-Gault<sup>38</sup>(ml/min) = [(140-Idade)xP]/ (72xCr)

-Idade= Anos

-Peso=Kg

-Cr= Concentração de Creatinina no soro em mg/dL

Se sexo feminino, multiplicar pelo fator de correção 0,85.

-Equação de Nankivell<sup>40</sup>(ml/min)= 6700 / [Cr<sup>x</sup>88,4]+ [peso/4] – [uréia/2] – [100/(altura)<sup>2</sup>] + 35 ( se homem) ou 25 (se mulher)

-Cr(mg/dL)

-Peso(Kg)]

-Uréia(mmol/L)

-Altura (metros)

-Equação MDRD<sub>abreviada</sub><sup>41</sup>(ml/min)= (186) x (Cr)<sup>-1.154</sup> x (Idade)<sup>-0.203</sup> x (0.742 se sexo feminino) x (1.21 se raça negra)

-Cr= Concentração de creatinina no soro em mg/dL

Equações baseadas na concentração sérica de cistatina C:

Para converter cistatina C de mg/L para ml/min foram utilizadas as equações de Hoek e de Larsson que estimam o RFG baseado na concentração sérica de cistatina C.

-Equação Hoek <sup>113</sup>(ml/min)= -4,32 + 80,35x(1/cistatinaC)

-Cistatina C em mg/L

-Equação Larsson <sup>114</sup>(ml/min)= 77,24 x Cistatina C <sup>-1,2623</sup>

-Cistatina C em mg/L

### 3.4 Análise Estatística

A análise estatística foi executada com o *Software Sigma Stat* versão 3.0 e os gráficos com o GraphPad/Prisma, ambos licenciados.

O teste t-student foi aplicado para avaliar diferenças entre as variáveis. Os dados foram previamente avaliados quanto à sua distribuição, sendo aplicado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. O teste Mann-Whitney foi utilizado para comparação entre medidas, quando apropriado.

A correlação de Pearson e a Análise de Regressão Linear Simples foram aplicadas para determinar a associação entre medidas de depurações



por Inulina e as 15 possibilidades de medidas para a determinação da depuração plasmática de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ .

A análise estatística de Bland&Altman foi utilizada para avaliar o grau de concordância entre depuração de Inulina e  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ . A média das diferenças representa uma estimativa de erro ou *bias*, uma diferença sistemática entre os métodos de depuração Inulina e  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ ; o desvio-padrão dessas diferenças mede as flutuações ao redor da média. Noventa e nove por cento dessas diferenças estarão entre dois limites definidos como limites de concordância: o limite inferior, dado pela média das diferenças subtraída de  $1.96 \times \text{dp}$ ; e o limite superior, dado pela média das diferenças somado a  $1.96 \times \text{dp}$ . Para medir o grau de concordância, foram considerados o erro (*bias*) e os limites de concordância <sup>121-124</sup>.

Amostras repetidas de depuração por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  foram analisadas para determinar a variabilidade intra-individual do método. O Teste t-student foi utilizado para a comparação de teste e reteste, nomeados test 1 e test 2, respectivamente, e também foi quantificada a média das diferenças entre as duas medidas (erro) e o desvio-padrão dessas diferenças. A repetitividade do método também foi avaliada por cálculo do coeficiente de variação (CV) determinado para cada indivíduo a partir da fórmula:  $\text{CV}(\%) = (\text{desvio-padrão} / \text{média}) \times 100$ . Para cada valor de depuração por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  foi calculado o CV médio.

Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

As medidas de depuração foram normalizadas para  $1,73\text{m}^2$  de superfície corpórea. Para cálculos de superfície corpórea foi utilizada a

equação de DuBois:  $SC (m^2) = (0,007184) * (Altura^{0,725}) * (Peso^{0,425})$ , com peso em Kg e altura em  $cm^{125}$ .

Para a análise transversal de comparação do desempenho das medidas de RFG estimado por equações em prever o RFG medido por  $^{51}Cr$ -EDTA foram calculados três parâmetros:

- 1) Erro sistemático ou *bias*, definido pela média das diferenças entre o RFG estimado e o medido por  $^{51}Cr$ -EDTA;
- 2) Precisão, definida como o desvio-padrão dessas diferenças;
- 3) Acurácia, definida como a descrição do percentual de medidas de RFG estimado que estivessem dentro de 30% das medidas de RFG por  $^{51}Cr$ -EDTA (valor verdadeiro).

Para a análise longitudinal foram utilizadas as quatro medidas dos marcadores nos tempos 1, 3, 6 e 12 meses de seguimento. As medidas das CS de cistatina C e de creatinina foram transformadas na recíproca de seus valores multiplicados por 100. Os valores das medidas de função renal foram transformados em escala logarítmica para todos os marcadores.

A medida de tendência da função renal ao longo do tempo foi determinada por Análise de Regressão Linear Simples. Para cada paciente, foi obtida uma estimativa da tendência da função renal para todos os marcadores; a variação mensal foi dada pela inclinação (*slope*) da reta de regressão, que, multiplicada por 12, forneceu a variação anual; o percentual de mudança anual foi obtido a partir da mudança em relação ao intercepto da curva de regressão. Os percentuais de mudança anual dos marcadores

cistatina C e creatinina foram então comparados ao percentual de mudança do RFG por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  por meio da análise de Regressão Linear Simples <sup>95</sup>.

Uma segunda análise longitudinal foi realizada com base na definição do evento “queda de filtração glomerular”. Para cada marcador, o evento foi definido como uma queda percentual além do CV intra-individual de cada método. O CV foi estabelecido na FASE A. A mudança percentual foi determinada entre os períodos M12-M6 (valor encontrado no mês 12 em relação ao valor no mês 6), M6-M3 e M3-M1. A frequência de número de eventos foi determinada para cada método. Para cada marcador de função foram medidos o valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), a especificidade e a sensibilidade em detectar a queda no RFG medido por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ .

O evento “filtração glomerular estável” foi definido com o propósito de se quantificar a variabilidade intra-individual da cistatina C em amostras repetidas. Somente os pacientes cujo RFG medido por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  não apresentou queda ou elevação além do CV e que não tiveram indicação de internação hospitalar ou diagnóstico de rejeição aguda foram classificados como estáveis. O CV intraindividual da cistatina C foi calculado como descrito acima.

## **4. RESULTADOS**

---

---

## 4.1 FASE A

### 4.1.1 Dados demográficos

Quarenta e quatro pacientes transplantados renais foram incluídos na FASE A; seis pacientes foram alocados no grupo 1 (depuração  $\geq 90$  ml/min/1.73m<sup>2</sup>), doze no grupo 2 (60-89 ml/min/1.73m<sup>2</sup>), vinte pacientes no grupo 3 (30-59ml/min/1.73m<sup>2</sup>) e seis pacientes no grupo 4 (15-29ml/min/1.73m<sup>2</sup>). A idade média dos pacientes foi de  $42,0 \pm 11,3$ . Dos 44 pacientes envolvidos, 73% eram do sexo masculino e 45% eram da raça branca. A tabela 4 traz as características demográficas da amostra populacional estudada.

**Tabela 4 - FASE A: dados demográficos**

<b>Variável (n=44)</b>		
<b>Idade</b> (anos) média $\pm$ dp		42,0 $\pm$ 11,3
<b>Sexo</b> (fem/mas) n; %		12/32; (27 / 73)
<b>Raça</b> (branco;negro;pardo) n; %		20;7;17(45/16/39)
<b>Superfície Corpórea</b> (m <sup>2</sup> ); média $\pm$ dp		1,69 $\pm$ 0,17
<b>Altura</b> (cm); média $\pm$ dp		163,7 $\pm$ 8,1
<b>Peso</b> (Kg) média $\pm$ dp		64,5 $\pm$ 11,9
<b>Tempo após transplante renal</b> (meses) mediana/min-max		21,9 / 4,7-159,3
<b>Imunossupressão:</b> (n;%)	Tacrolimus	24; 55%
	CSA	10; 22,5%
	Sem CNIs	10; 22,5%
<b>Doença Renal Crônica – NKF:</b> (Cockcroft-Gault ml/min/1,73m <sup>2</sup> ) n;%		
	Estágio 1 ( $\geq 90$ )	6; 14%
	Estágio 2 (60-89)	12; 27%
	Estágio 3 (30-59)	20; 45%
	Estágio 4 (15-29)	6; 14%
<b>Uso de IECA/BRA</b> n;%		13; 29,6%

*NKF=National Kidney Foundation; CSA=ciclosporina; CNIs=inibidores da calcineurina; IECA=inibidor da enzima conversora de angiotensina; BRA=bloqueador do receptor da angiotensina*

#### 4.1.2 Medidas de depuração

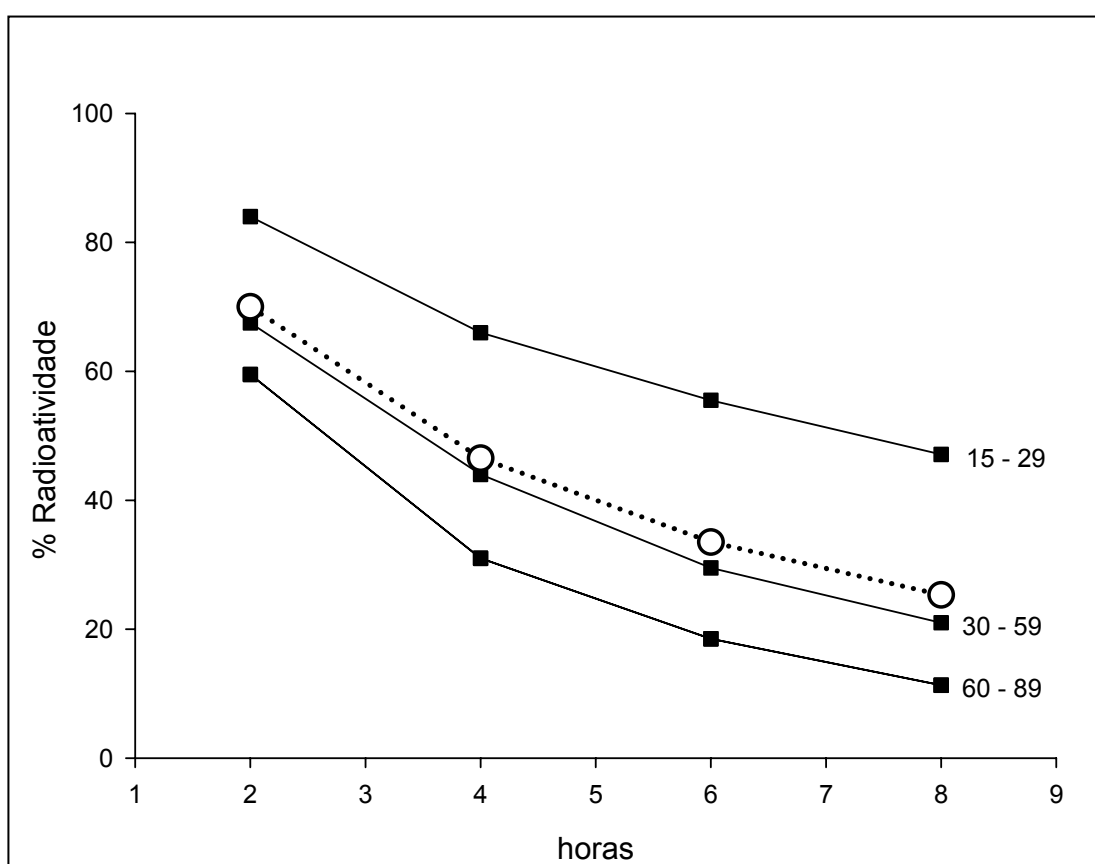
A tabela 5 mostra as médias e os desvios-padrão para depuração de inulina e para as 15 possibilidades de combinações para a determinação da depuração plasmática de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ . Todas as medidas apresentaram distribuição normal.

A média da depuração de inulina foi  $44,5 \pm 17,9$  ml/min/1,73m<sup>2</sup>. A depuração plasmática de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  excedeu a depuração renal de inulina em todas as medidas. Em média, o RFG por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  (2, 4, 6 e 8 horas) superestimou o RFG por Inulina em 9%. Entretanto, não foi encontrada diferença estatística entre as medidas de depuração de Inulina e  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ , exceto quando as medidas de RFG por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  foram determinadas a partir de amostra única coletada na 6<sup>a</sup> ou na 8<sup>a</sup> hora após injeção do radiofármaco; estas últimas medidas foram descartadas das análises subsequentes.

**Tabela 5** - Medidas de depuração renal de inulina e depurações plasmáticas de  $^{51}\text{CrEDTA}$

Variável (n=44)	Média $\pm$ DP	Test-t
<b>Inulina</b> (depuração renal ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	<b>44,5 <math>\pm</math> 17,9</b>	
$^{51}\text{Cr-EDTA}$ (depuração plasmática ml/min/1,73m <sup>2</sup> )		
2,4,6,8 horas	47,0 $\pm$ 16,9	0,50
2,4,6 horas	47,7 $\pm$ 16,5	0,39
2,4,8 horas	46,7 $\pm$ 16,7	0,56
2,6,8 horas	46,7 $\pm$ 16,5	0,56
4,6,8 horas	47,6 $\pm$ 18,8	0,43
2,4 horas	48,6 $\pm$ 15,9	0,26
2,6 horas	47,3 $\pm$ 16,3	0,45
4,6 horas	47,2 $\pm$ 18,0	0,48
4,8 horas	47,3 $\pm$ 18,4	0,47
2,8 horas	46,0 $\pm$ 16,2	0,67
6,8 horas	47,6 $\pm$ 21,0	0,45
2 horas	49,1 $\pm$ 18,1	0,23
4 horas	50,1 $\pm$ 17,1	0,14
6 horas	51,3 $\pm$ 17,8	0,04
8 horas	53,2 $\pm$ 18,6	0,03

O percentual de decaimento da atividade radioativa nos tempos 2, 4, 6 e 8 horas é mostrado na figura 3. O percentual de decaimento da atividade do Cromo-51 no tempo 2 foi determinado a partir da atividade calculada no tempo zero. Os percentuais de decaimento em todos os pontos foram estatisticamente diferentes entre o estágio 4 e os demais estágios de DRC ( $p < 0,001$ ) e entre os estágios 2 e 3 ( $p < 0,002$ ).



**Figura 3** - Percentual de redução da atividade radioativa em função do tempo para diferentes faixas de RFG.

As linhas contínuas mostram o perfil de decaimento a partir da 2ª hora para os pacientes que se apresentavam nos estágios 2 (RFG 60-89), estágio 3 (RFG 30-59) e estágio 4 (RFG 15-29) baseado na determinação da depuração de Inulina. A linha tracejada representa a média de decaimento da atividade radioativa para os 44 pacientes analisados.

#### 4.1.3 Comparação entre a depuração renal de Inulina e a depuração plasmática de $^{51}\text{Cr-EDTA}$

Para medir a associação entre a depuração de inulina e a depuração de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson. Encontrou-se uma correlação direta, com forte associação entre as medidas, conforme está apresentado na tabela 6. A medida de depuração plasmática de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  com 4 coletas, nos tempos 2, 4, 6 e 8 horas após injeção, apresentou elevada correlação com a depuração de Inulina. A depuração de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  com duas amostras, coletadas nos tempos 4 e 8 horas ou 4 e 6 horas, ou com três amostras, nos tempos 2, 4 e 8 horas, apresentaram a mais forte associação, com  $R=0,95$ . A utilização de amostra única de 2 horas para medir o RFG por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  resultou na mais fraca associação, com  $R=0,76$ .

A regressão linear simples foi aplicada para expressar a relação entre a depuração de inulina e a depuração de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ ; o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi de 0,90 para depuração plasmática de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ , com duas amostras (4 e 8 horas; 4 e 6 horas) e três amostras (2, 4 e 8 horas). A tabela 6 também traz a equação da reta de regressão para as medidas de depuração plasmática de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  e depuração renal de inulina.



**Tabela 6** - Depuração de inulina e  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  – análise de Regressão Linear

INULINA n=44	R	R <sup>2</sup>	Equação da Reta de Regressão Linear
<b><math>^{51}\text{Cr-EDTA}</math></b>			
2,4,6,8 horas	0,94	0,89	Inulina = -2,341 + 0,996 x EDTA 2468
2,4,6 horas	0,93	0,87	Inulina = -3,888 + 1,015 x EDTA 246
2,4,8 horas	0,95	0,90	Inulina = -2,813 + 1,014x EDTA248
2,6,8 horas	0,93	0,87	Inulina = -2,699 + 1,012 x EDTA 268
4,6,8 horas	0,94	0,88	Inulina = 1,908 + 0,894 x EDTA 468
2,4 horas	0,92	0,85	Inulina = -5,919 + 1,037 x EDTA 24
2,6 horas	0,93	0,86	Inulina = -3,419 + 1,013 x EDTA 26
4,6 horas	0,95	0,90	Inulina = 0,016 + 0,942 x EDTA 46
4,8 horas	0,95	0,90	Inulina = 0,797 + 0,923 x EDTA48
2,8 horas	0,94	0,89	Inulina = -3,511 + 1,043 x EDTA 28
6,8 horas	0,84	0,71	Inulina = 10,214 + 0,720 x EDTA 68
2 horas	0,76	0,58	Inulina = 7,513 + 0,753 x EDTA 2
4 horas	0,92	0,84	Inulina = -3,618 + 0,960 x EDTA 4

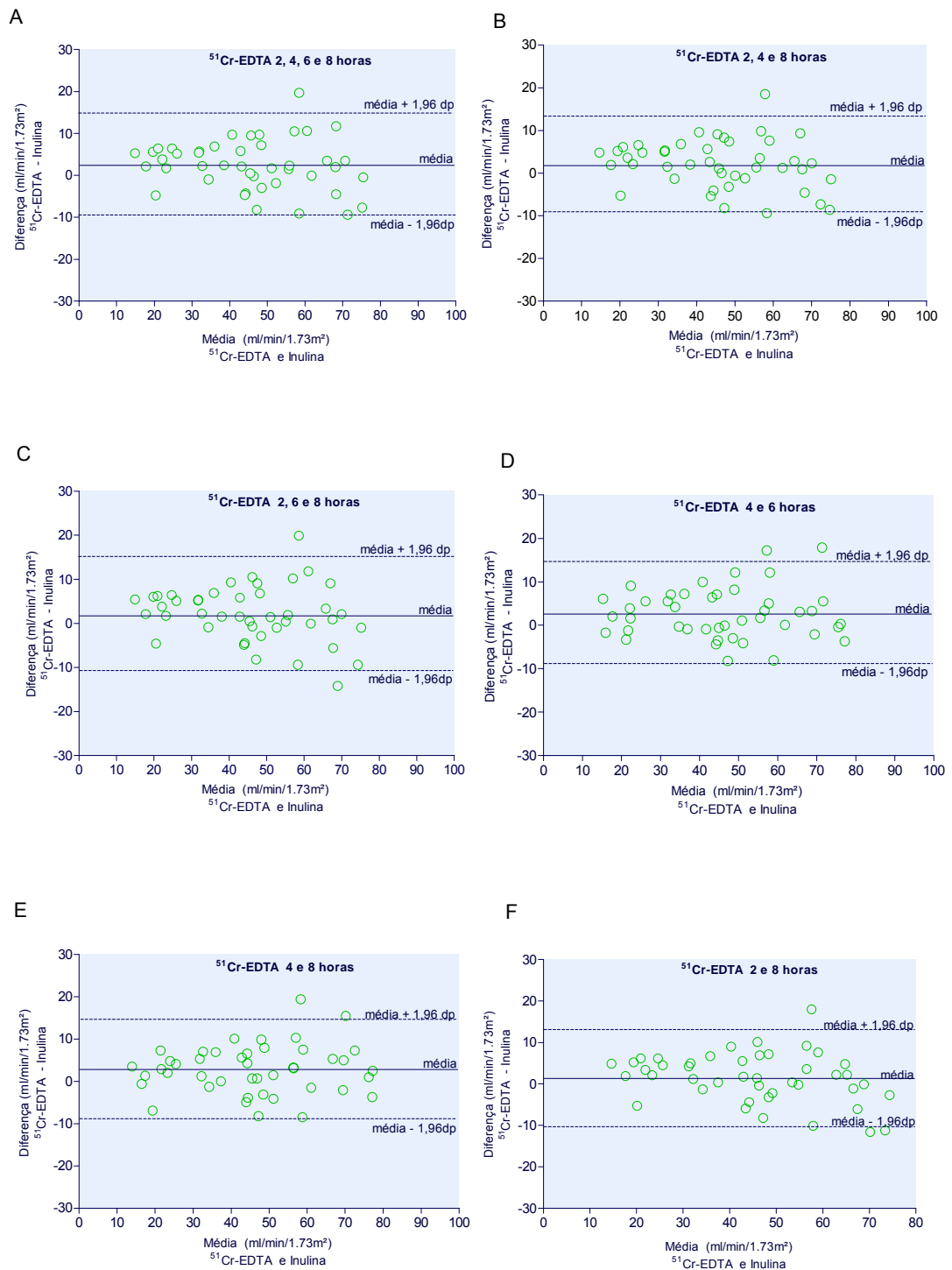
\*Valor de  $p < 0,0001$  para todas as medidas.

Na análise Bland&Altman, a medida da depuração plasmática de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  com quatro amostras apresentou um erro sistemático agregado de 2,5 ml/min/1,73m<sup>2</sup> (*bias*), com o limite de concordância de 12,0 ml/min/1,73m<sup>2</sup> (Tabela 7). O mais estreito limite de concordância foi encontrado para medidas de depuração com duas amostras, nos tempos 4 e 8 horas, quatro e seis horas e duas e oito horas, e com três amostras, nos tempos 2, 4 e 8 horas. A medida de depuração com amostra única de 2 horas apresentou o maior erro (4,6 ml/min/1,73m<sup>2</sup>), com o mais largo limite de concordância. As médias e os desvios-padrão das diferenças são apresentados na tabela 7.

**Tabela 7 - Depuração de inulina e <sup>51</sup>CrEDTA - análise Bland&Altman**

<b>INULINA</b> (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	<b>Média das</b> <b>diferenças</b>	<b>Desvios - padrão</b> <b>das diferenças</b>	<b>95% limite de</b> <b>concordância</b>
<b><sup>51</sup>Cr-EDTA</b> (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )			
2,4,6,8 horas	2,5	6,1	- 9,4 a + 14,4
2,4,6 horas	3,2	6,4	- 9,3 a + 15,7
2,4,8 horas	2,2	5,8	-9,1 a + 13,5
2,6,8 horas	2,2	6,4	-10,3 a + 14,7
4,6,8 horas	3,1	6,5	- 9,6 a + 15,8
2,4 horas	4,1	6,9	- 9,4 a + 17,6
2,6 horas	2,8	6,8	-10,5 a + 16,1
4,6 horas	2,7	5,9	- 8,9 a + 14,3
4,8 horas	2,8	5,8	- 8,5 a + 14,1
2,8 horas	1,5	6,0	-10,3 a + 13,3
6,8 horas	3,1	11,2	-18,9 a + 25,1
2 horas	4,6	12,4	-19,7 a + 28,9
4 horas	5,6	7,2	- 8,5 a + 19,7

A figura 4 traz a representação gráfica da análise Bland&Altman para as 06 medidas de depuração por <sup>51</sup>Cr-EDTA que apresentaram a maior concordância com a depuração de inulina. Verificou-se que a distribuição dos pontos nos limites de concordância foi semelhante para todas as medidas das depurações de <sup>51</sup>Cr-EDTA (fig.4A-F).



**Figura 4** - Comparação da depuração de Inulina e  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ : análise Bland&Altman.

As linhas tracejadas delimitam os limites de concordância superior e inferior. A linha contínua representa a média das diferenças entre os métodos. Depuração de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  com 4 amostras (A), 3 amostras (B e C) e 2 amostras (D-F).

A tabela 8 mostra as médias e os desvios-padrão das diferenças entre as depurações de inulina e de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  por faixa de RFG. De acordo com RFG medido por depuração renal de inulina, dos 44 pacientes envolvidos, 10 se apresentavam no estágio 2 da DRC, 23 no estágio 3, 11 no estágio 4 e nenhum paciente no estágio 1.

As depurações plasmáticas de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  com três amostras nos tempos 2, 4 e 8 horas, ou duas amostras nos tempos 4 e 6 horas ou 4 e 8 horas apresentaram alto grau de concordância com a depuração de inulina quando considerados os 03 estágios de DRC.

**Tabela 8 - Análise Bland&Altman por estágio de DRC**

<b>Estágio de DRC</b>	<b>Estágio 2</b>	<b>Estágio 3</b>	<b>Estágio 4</b>
<b>Inulina (ml/min/1.73m<sup>2</sup>)</b>	60-89	30-59	15-29
n	10	23	11
<b><math>^{51}\text{Cr-EDTA}</math> (ml/min/1.73m<sup>2</sup>)</b>	B&A	B&A	B&A
(horas)	Média±dp	Média±dp	Média±dp
2, 4, 6, 8	1.1 ± 6.7	3.4 ± 6.4	3.9 ± 3.3
2, 4, 6	1.0 ± 6.7	4,0 ± 6.7	5.3 ± 3.5
2, 4, 8	1.5 ± 6.0	3.1 ± 6.1	3.7 ± 3.3
2, 6, 8	2.4 ± 7.1	3.3 ± 6.5	3.9 ± 3.2
4, 6, 8	2.4 ± 8.1	3.6 ± 6.9	2.6 ± 3.8
2, 4	0.4 ± 6.7	4.2 ± 13.8	7.6 ± 5.6
2, 6	2.1 ± 7.3	3.9 ± 7,0	5,0 ± 3.3
4, 6	1.6 ± 6.9	3.0 ± 6.3	3.2 ± 4.0
4, 8	2.1 ± 6.7	3.2 ± 6.3	2.8 ± 4.0
2, 8	3.4 ± 6.0	2.7 ± 6.1	3.5 ± 3.2
6, 8	2.5 ± 18.5	3.9 ± 9.8	2.0 ± 4.6
2	0.2 ± 8.8	4.2 ± 13.8	9.9 ± 11.1
4	3.7 ± 6.7	5,0 ± 7.8	8.7 ± 5.7

B&A=Análise de Bland&Altman; Média= média das diferenças entre os métodos; dp= desvio-padrão das diferenças.

#### 4.1.4 Variação Intra-individual da depuração plasmática de $^{51}\text{Cr-EDTA}$

Para avaliar a repetitividade (precisão) da depuração plasmática de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  foram realizados testes em replicatas com duas medidas em intervalos de tempo de  $15,4 \pm 3,3$  dias, em 22 voluntários doadores de rim com tempo de doação superior a um ano (12,4 a 53,5 meses). A média de idade foi de  $38,6 \pm 8,2$ . A tabela 9 traz as características demográficas dessa amostra populacional.

**Tabela 9** - Características demográficas – doador de rim após doação

Variável	n=22 doadores
<b>Idade</b> (anos) média $\pm$ dp	38,6 $\pm$ 8,2
<b>Sexo</b> (masc/fem) n %	12; 10 (54,5; 45,5)
<b>Raça</b> (Branca/Negra/Parda) n %	9; 10; 3(41; 14; 45)
<b>Tempo de doação</b> (meses) mediana/min;máx	20,5/ 12,4; 53,5
<b>Peso</b> (Kg) média $\pm$ dp	71,3 $\pm$ 14,7
<b>Altura</b> (cm) média $\pm$ dp	166 $\pm$ 0,1
<b>SC</b> (m <sup>2</sup> ) média $\pm$ dp	1,8 $\pm$ 0,2
<b>IMC</b> média $\pm$ dp	25,7 $\pm$ 4,0

A média da medida de depuração plasmática de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  com amostras nos tempos 2, 4, 6 e 8 horas foi de  $69,1 \pm 7,3$  no teste-1 e de  $69,1 \pm 11,2$  ml/min/1,73m<sup>2</sup> no teste-2. Não existiu diferença estatística entre as medidas replicadas em todas as combinações para a determinação da depuração de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ . A tabela 10 mostra a média e os desvios-padrão das diferenças entre teste-1 e teste-2 em 22 doadores; o menor erro (*bias*), dado pela média das diferenças, foi encontrado para

$^{51}\text{Cr-EDTA}$  com 4 amostras e  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  com duas amostras nos tempos 2 e 8 horas, bem como os mais baixos desvios-padrão. O coeficiente de variação foi de 6,4 a 10,1%.

**Tabela 10** - Comparação entre medidas repetidas de RFG por  $^{51}\text{CrEDTA}$  em 22 doadores

$^{51}\text{Cr-EDTA}$ (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	Média das diferenças Teste1-teste2	Desvios- padrão das diferenças	test-t pareado	Coeficiente de Variação (%)
2,4,6,8	0.0	8.7	1.00	6.5
2,8	0.3	7.8	0.85	6.4
4,8	0.4	15.5	0.91	10.1
2,6,8	0.6	8.5	0.76	6.6
4	2.0	10.1	0.38	7.6
4,6	2.9	12.7	0.30	9.7

O CV também foi determinado para os marcadores cistatina C (3,5%), creatinina (4,8%), Uréia (11,6%) e para o RFG estimado por equações de C-G (5,0%), MDRD (5,9%), Nankivell (4,6%), Hoek (3,7%) e Larsson (4,4%).

#### 4.1.5 Comparação entre a medida de depuração de $^{51}\text{Cr-EDTA}$ e marcadores

Para avaliar a correlação entre a depuração de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  com 4 amostras e os marcadores endógenos de filtração glomerular, dos 44 pacientes transplantados envolvidos no estudo, dois foram excluídos para essa análise por não apresentar a medida da CS de cistatina C. A tabela 11 mostra a média e desvios-padrão da depuração plasmática de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$

com 4 amostras nos tempos 2, 4, 6 e 8 horas e o RFG estimado por equações, além dos marcadores séricos, cistatina C e creatinina. A mais alta correlação foi encontrada para 100/cistatina C e para o RFG estimado por equações de Nankivell com coeficiente de determinação de 80% ( $R^2=0,8$ ). As equações de Larsson e Hoek, utilizadas para estimar o RFG com base na CS de cistatina C apresentaram o menor erro, maior precisão e acurácia.

**Tabela 11** - Comparação entre  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ , CS de cistatina C e de Creatinina, e RFG estimado por equações. Regressão Linear, Erro, Precisão e Acurácia

Variável	Média $\pm$ DP	R	R <sup>2</sup>	Erro	Precisão	Acurácia 30%
<b><math>^{51}\text{CrEDTA}</math> 2, 4, 6 e 8 hs</b> (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	45,9 $\pm$ 16,4					
Cockcroft-Gault (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	57,4 $\pm$ 24,2	0,86	0,74	11,5	13,1	69,0
MDRD (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	56,6 $\pm$ 27,6	0,83	0,69	10,7	16,7	69,0
Nankivell (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	58,8 $\pm$ 25,4	0,89	0,80	12,9	13,1	38,0
100/Creatinina	67,8 $\pm$ 27,5	0,86	0,74			
Hoek (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	48,0 $\pm$ 20,8	0,83	0,68	2,1	11,7	76,2
Larsson (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	45,8 $\pm$ 22,1	0,83	0,69	0,1	12,5	71,4
100/CistatinaC	63,1 $\pm$ 23,4	0,89	0,80			

DP=desvios-padrão. Regressão Linear:  $p < 0,001$  para todas as variáveis. Medidas de erro e precisão estão expressas em ml/min/1,73m<sup>2</sup>. Acurácia em percentagem.

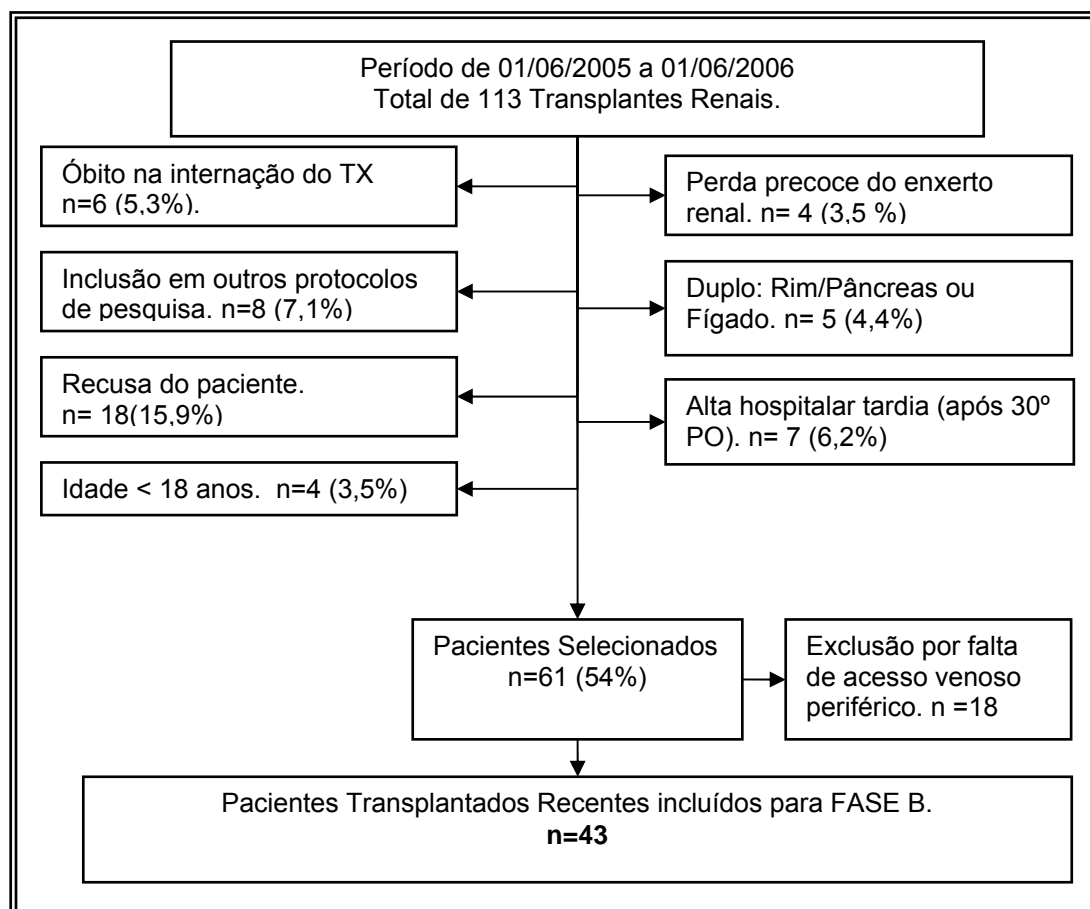
## 4.2 FASE B

Os pacientes transplantados renais na UTR-HCFMUSP de 01/06/2005 a 01/06/2006 foram abordados para participar do estudo. Como mostra a figura 5, dos 113 pacientes transplantados, 43 foram incluídos nessa fase do estudo. No mesmo período, foram incluídos 39 pacientes transplantados tardios em seguimento regular no ambulatório da UTR, com tempo de transplante superior a um ano. Desse modo, o total de pacientes incluídos na FASE B foi de 82 pacientes transplantados, recentes e tardios.

Todos os 43 pacientes transplantados recentes completaram o seguimento de 01 ano. Dos 39 pacientes transplantados tardios, apenas 38 completaram seguimento de um ano; um paciente perdeu seguimento no 10º mês por perda do enxerto renal por choque hemorrágico (tuberculose intestinal) e disfunção prévia por nefropatia crônica do transplante.

Setenta e cinco pacientes (40 transplantados recentes e 35 tardios) tiveram 04 determinações do RFG por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ , e sete pacientes tiveram somente 03 medidas realizadas.





**Figura 5 - FASE B: Inclusão de pacientes transplantados recentes**

#### 4.2.1 Dados demográficos

A tabela 12 traz as características demográficas de todos os pacientes, transplantados recentes e tardios, incluídos na FASE B do estudo. Dos 82 pacientes envolvidos, 58,5% receberam enxertos renais de doadores vivos e 41,5% de doadores cadáveres. A média de idade foi  $43,4 \pm 11,9$  anos; 56% dos pacientes eram da raça branca e 68% eram do sexo masculino. Receberam inibidor de calcineurina 93% dos pacientes (71% receberam tacrolimus e 22% receberam CSA), e todos receberam prednisona.

**Tabela 12 - FASE B: dados demográficos**

Variável	Total	Recente	Tardio
<b>n</b>	82	43	39
<b>Doador</b> Vivo /Cadavérico (%)	58,5/41,5	76,7/23,3	38,5/61,5
<b>Idade</b> ( anos)	43,4 ± 11,9	43,4 ±12,0	42,6 ± 11,8
<b>Raça</b> (Branca/Negra/Parda/ Amarela) n (%)	46/10/25/1 (56,1/12,2/30,5/1,2)	24/6/13 (55,8/14/30,2)	22/4/12/1 (56,4/10,3/30,8/2,6)
<b>Sexo</b> (Masculino/Feminino; %)	68,3/31,7	60,5/ 39,5	76,9 / 23,1
<b>Peso</b> (média±dp;Kg)		62,4 ± 11,8	65,4 ± 12,4
<b>Altura</b> (média±dp;m)		162,5± 8,2	164,4 ± 9,1
<b>Superfície Corpórea</b> (m <sup>2</sup> )		1,7± 0,2	1,7 ± 0,2
<b>Índice de Massa Corpórea</b>		23,6± 4,1	23,6 ± 5,5
<b>Imunossupressores</b> (n)			
Tacrolimus	58 (71%)	35	23
Ciclosporina	18 (22%)	6	12
Prednisona	82 (100%)	43	39
MMF/MFS	72 (88%)	36	36
Sirolimus	11 (13%)	7	4
Azatioprina	3 (4%)	0	3
<b>Nº de transplantes</b>			
Primeiro	77	39	37
Re - transplante	6	4	2
<b>Diagnóstico da Doença Renal</b> (n)			
Nefropatia Diabética	8	7	1
Nefrosclerose hipertensiva	19	12	7
Pielonefrite crônica	10	6	4
(RVU/ Uropatia obstrutiva)			
Doença Renal Policística	5	3	2
GESF	5	-	5
GNMP	2	1	1
Nefrite Lúpica	1	1	-
Nefrocalcinose	1	-	1
Tuberculose Renal	1	1	-
Esclerose Tuberosa	1	1	-
Não Definida	29	11	18

MMF/MMS = Micofenolato Mofetil / Sódico. RVU (Refluxo vésico-ureteral); GESF (glomeruloesclerose segmentar e focal); GNMP (glomerulonefrite membranoproliferativa); dp=desvios-padrão.

#### 4.2.2 Medidas dos marcadores de função renal

A tabela 13 mostra os valores das medidas dos marcadores cistatina C e creatinina e das medidas de RFG por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  nos meses 1, 3, 6 e 12. Para todos os marcadores, foi encontrado ganho de função renal ao longo dos 12 meses; entretanto, apenas para a medida da CS de cistatina C essa diferença foi estatisticamente significativa no mês 12 em relação ao mês 1.

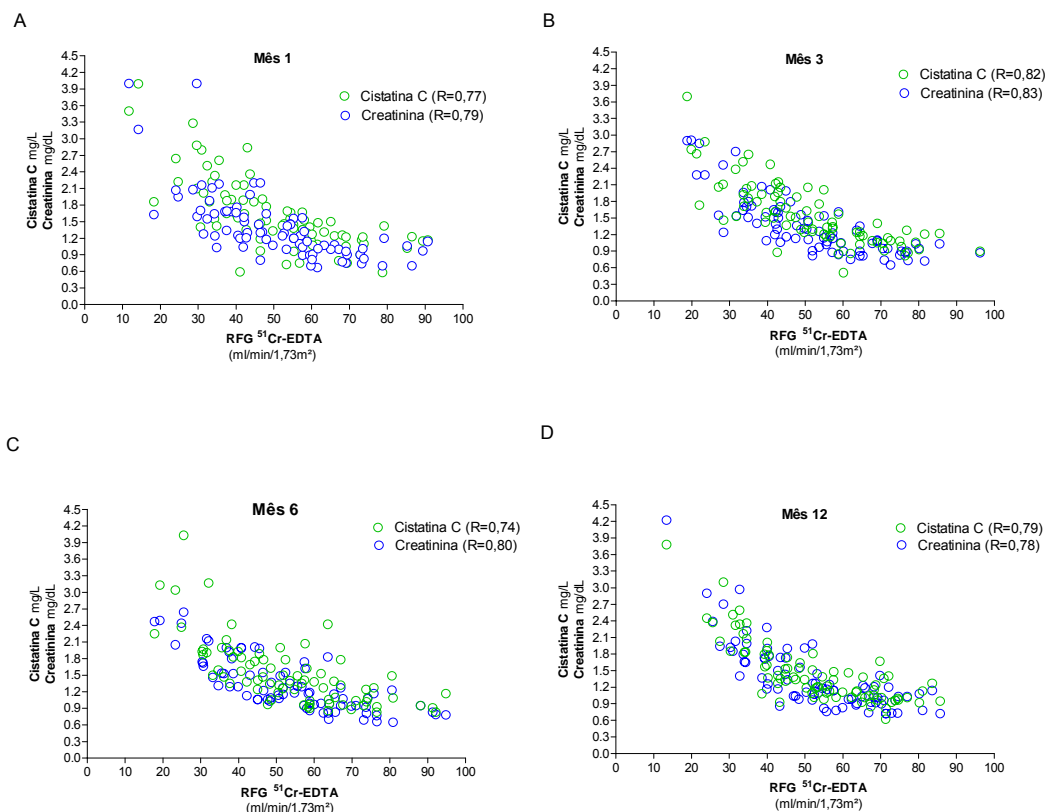
**Tabela 13** - Valores das medidas de RFG e marcadores cistatina C e creatinina

	Mês 1	Mês 3	Mês 6	Mês 12	(p)
$^{51}\text{Cr-EDTA}$ (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	50,5 ± 17,3	51,6 ± 17,2	53,5 ± 17,6	52,8 ± 16,1	NS
Cistatina C mg/L	1,62 ± 0,65	1,55 ± 0,56	1,53 ± 0,60	1,46 ± 0,55	0,043*
Creatinina mg/dL	1,40 ± 0,62	1,36 ± 0,53	1,33 ± 0,48	1,38 ± 0,61	NS

\*p=0,043 M1 em relação M12; demais comparações valores de p não significativos; medidas expressas em médias e desvios-padrão.

#### 4.2.3 Medidas de associação entre os marcadores – análises transversais

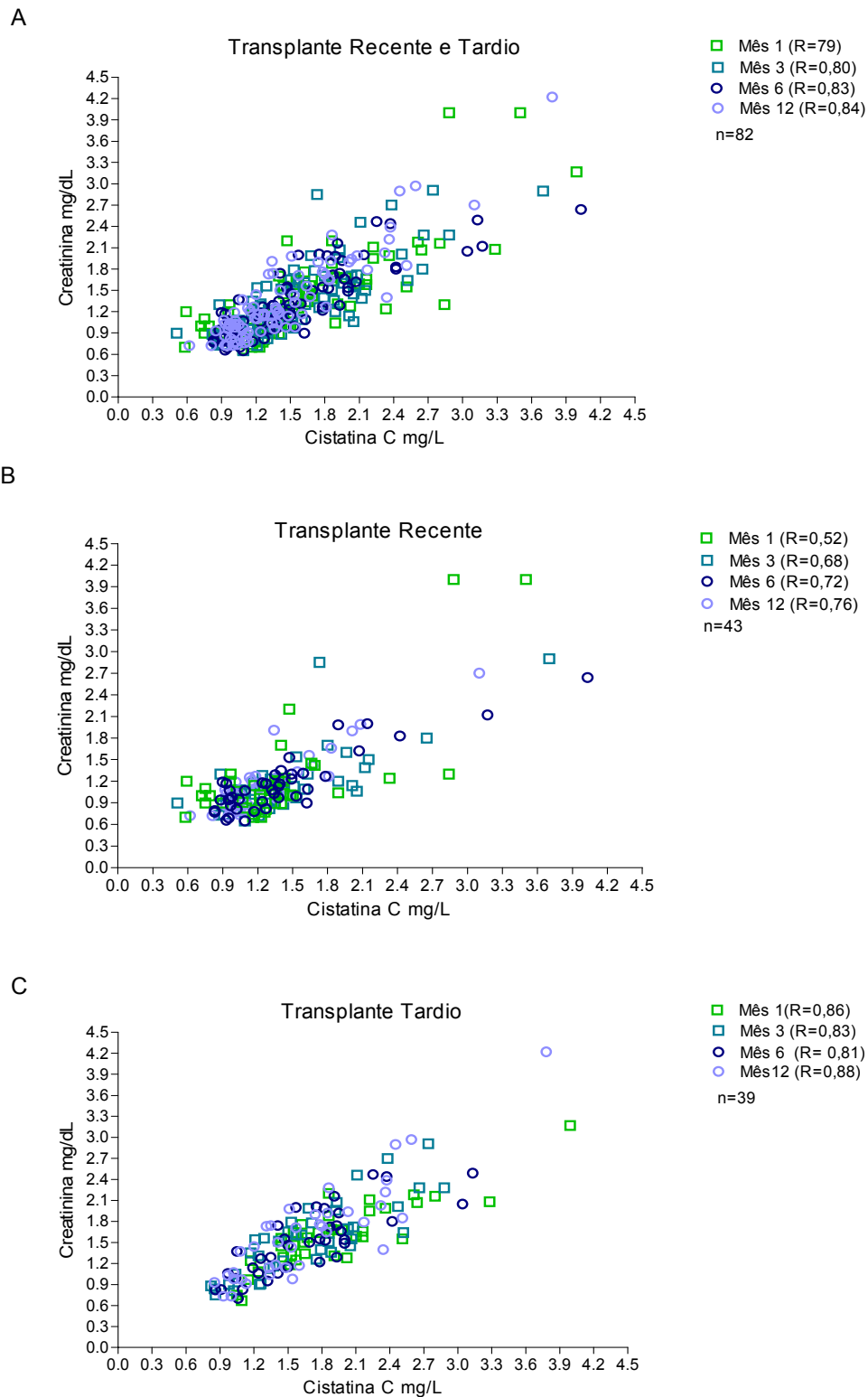
As correlações entre o RFG por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  e os marcadores cistatina C e creatinina são apresentadas na figura 6. O coeficiente de correlação Spearman foi determinado nos quatro momentos em que os marcadores foram medidos (meses 1, 3, 6 e 12). As medidas das CS de Cistatina C e de creatinina apresentaram alta correlação com o RFG. O coeficiente (R) variou de 0,74 a 0,82 para cistatina C e de 0,78 a 0,83 para creatinina. Somente no mês 12 (fig.6D) a CS de cistatina C apresentou valor de R superior ao encontrado para a CS de creatinina.



**Figura 6** - Correlações dos marcadores cistatina C e creatinina com o RFG por <sup>51</sup>Cr-EDTA. (R coeficiente de correlação Spearman; n=82).

A correlação entre os marcadores cistatina C e creatinina também foi avaliada nos quatro tempos (fig. 7A), sendo encontrada correlação direta e com variabilidade do coeficiente de correlação de 0,79 a 0,84 do 1º ao 12º mês de seguimento.

Para mostrar se o tempo após o transplante interferiu na relação entre as variáveis cistatina C e creatinina foram realizadas análises nas amostras populacionais de transplantados recentes (fig. 7B) e tardios (fig. 7C). Para os transplantes recentes, percebeu-se maior dispersão dos pontos nos meses 1 e 3, em relação aos meses 6, 12 e também ao transplante tardio.



**Figura 7** - Dispersão entre os marcadores cistatina C e creatinina nos meses 1, 3, 6 e 12 em toda a amostra de pacientes transplantados (7A), em transplantados recentes (7B) e tardios (7C).

Nos pacientes transplantados recentes foram aplicadas análise de regressão linear simples entre o RFG medido por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  e os marcadores cistatina C e creatinina, nos meses 1 e 12. Os dados são apresentados nas tabelas 14 e 15.

O coeficiente de explicação da regressão ( $R^2$ ) de 100/cistatina C foi de 0,16, mostrando uma fraca associação entre a medida da CS de cistatina C e o RFG no mês 1, mas com significância estatística ( $p=0,01$ ); entretanto, na mesma amostra populacional, em análise transversal no mês 12 após o transplante, o coeficiente de explicação foi de 0,34, mostrando uma correlação mais forte em relação à primeira e com maior significância estatística (tabela 15). Para a medida de 100/creatinina o coeficiente de explicação encontrado foi de 0,42 no mês 1 e de 0,34 no mês 12.

O desempenho da cistatina C e creatinina para estimar O RFG medido por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  foram comparados por meio da quantificação do erro sistemático (*bias*), precisão e acurácia.

Na análise de regressão linear simples, o RFG estimado por equações baseadas na concentração sérica de cistatina C teve uma maior correlação com o RFG por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  no mês 12 (tabela 15) em relação ao mês 1 (tabela 14), semelhante ao comportamento apresentado para 100/cistatina C descrito acima.

No mês 1, quando comparado à equação Larsson, a equação Hoek apresentou o maior coeficiente de explicação, maior acurácia e precisão e o menor erro para estimar o RFG.

**Tabela 14 -** Transplante Recente – Mês 1: análise de Regressão Linear e medidas de erro, precisão e acurácia

TX Recente n=43							
Mês 1	Média ± DP	R	R <sup>2</sup>	p	Erro	Precisão	Acurácia 30%
<sup>51</sup> Cr-EDTA (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	57,5 ± 16,4						
Cockcroft-Gault (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	75,9 ± 21,8	0,62	0,39	p<0,0001	18,4	17,3	39,5
MDRD (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	79,4 ± 26,8	0,61	0,38	p<0,0001	22	21,2	44,2
Nankivell (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	80,0 ± 22,6	0,68	0,46	p<0,0001	22,5	16,7	32,6
100/Creatinina	95,0 ± 26,9	0,65	0,42	p<0,0001			
Hoek (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	66,6 ± 27,8	0,37	0,14	p=0,01	9,1	26,6	62,8
Larsson (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	66,8 ± 32,9	0,35	0,12	p=0,02	9,3	31,3	58,1
100/Cistatina C	84,0 ± 31,2	0,40	0,16	p=0,01			

Medidas de erro e precisão estão expressas em ml/min/1,73m<sup>2</sup>. Acurácia em percentagem.

Na avaliação de mês 12 de pacientes transplantados recentes, ainda que tenham apresentado o menor coeficiente de explicação, as equações Larsson e Hoek apresentaram o menor erro e a maior acurácia quando comparadas ao desempenho das equações MDRD, Cockcroft-Gault e Nankivell.

**Tabela 15 -** Transplante Recente – Mês 12: análise de Regressão Linear e medidas de erro, precisão e acurácia

TX Recente n=43							
Mês12	Média±DP	R	R <sup>2</sup>	p	Erro	Precisão	Acurácia 30%
<sup>51</sup> Cr-EDTA (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	59,8 ± 14,1						
Cockcroft-Gault (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	79,1 ± 19,5	0,60	0,36	p<0,0001	19,2	15,7	51,2
MDRD (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	76,7 ± 26,9	0,56	0,32	p<0,0001	16,9	22,2	55,8
Nankivell (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	79,6 ± 20,0	0,61	0,37	p<0,0001	19,7	15,9	48,8
100/Creatinina	94,7 ± 25,7	0,59	0,34	p<0,0001			
Hoek (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	65,3 ± 22,2	0,50	0,25	p<0,0001	5,4	19,4	81,4
Larsson (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	65,0 ± 25,5	0,50	0,25	p<0,0001	5,2	22,2	69,8
100/Cistatina C	84,8 ± 22,6	0,58	0,34	p<0,0001			

Medidas de erro e precisão estão expressas em ml/min/1,73m<sup>2</sup>. Acurácia em percentagem.

Em pacientes transplantados tardios, uma análise transversal foi realizada no mês 12 do seguimento clínico (tabela 16). O mais alto coeficiente de explicação foi encontrado para o inverso da CS de cistatina C multiplicado por 100 (100/Cistatina C) com R<sup>2</sup> de 0,89. Esse resultado foi semelhante ao encontrado na fase A deste estudo.

A despeito do menor valor de R<sup>2</sup> (0,68 e 0,69), as equações Hoek e Larsson foram superiores para estimar o RFG medido por <sup>51</sup>Cr-EDTA, quando comparadas às equações baseadas na concentração sérica de creatinina. A equação de Nankivell apresentou o maior erro e a menor acurácia para estimar o RFG, quando comparada à equação de Cockcroft-Gault e MDRD (tabela 16).



**Tabela 16 - Transplante Tardio – Mês 12: análise de Regressão Linear e medidas de erro, precisão e acurácia**

TX Tardio n=38							
Mês 12	Média ± DP	R	R <sup>2</sup>	p	Erro	Precisão	Acurácia 30%
<sup>51</sup> CrEDTA (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	44,8 ± 14,6						
Cockcroft-Gault (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	60,1 ± 21,0	0,84	0,70	p<0,0001	15,3	11,8	44,7
MDRD (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	59,1 ± 27,8	0,85	0,72	p<0,0001	14,4	17,3	55,3
Nankivell (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	63,3 ± 22,8	0,86	0,75	p<0,0001	18,5	12,5	23,7
100/Creatinina	71,6 ± 27,5	0,87	0,75	p<0,0001			
Hoek (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	51,2 ± 20,8	0,87	0,77	p<0,0001	6,4	10,7	84,2
Larsson (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	49,1 ± 22,8	0,87	0,76	p<0,0001	4,3	12,4	86,8
100/Cistatina C	67,3 ± 22,5	0,89	0,79	p<0,0001			

Medidas de erro e precisão estão expressas em ml/min/1,73m<sup>2</sup>. Acurácia em percentagem.

#### 4.2.4 Medidas de associação entre os marcadores – análises longitudinais

4.2.4.1 - Cálculo da inclinação (*slope*) da reta de regressão de medidas seriadas dos marcadores de filtração glomerular em função do tempo e expresso como percentual de mudança anual.

#### 4.2.4.1.1 Comparação do percentual de mudança anual na amostra total de pacientes

A análise longitudinal foi realizada com os dados coletados dos 75 pacientes submetidos às quatro medidas de RFG por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  e das CS de cistatina C, de creatinina e de uréia nos meses 1, 3, 6 e 12.

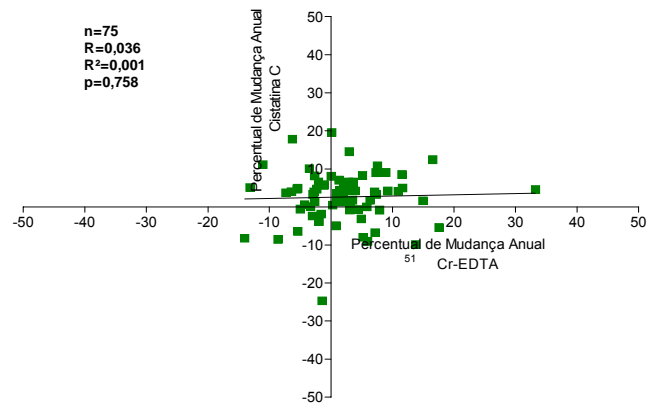
O percentual de mudança anual da concentração sérica de cistatina C, concentração sérica de creatinina e do RFG estimado por equações foram comparados ao percentual de mudança anual do RFG medido por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ .

Os percentuais de mudança dos marcadores cistatina C, creatinina e RFG estimado por equações não apresentaram diferença estatística em comparação ao percentual de mudança do RFG por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  cujo valor médio foi de  $2,07\% \pm 7,30\%$ . A média do percentual de mudança para a creatinina foi de  $0,36\% \pm 4,96\%$  e foi de  $2,61\% \pm 5,25\%$  para a cistatina C.

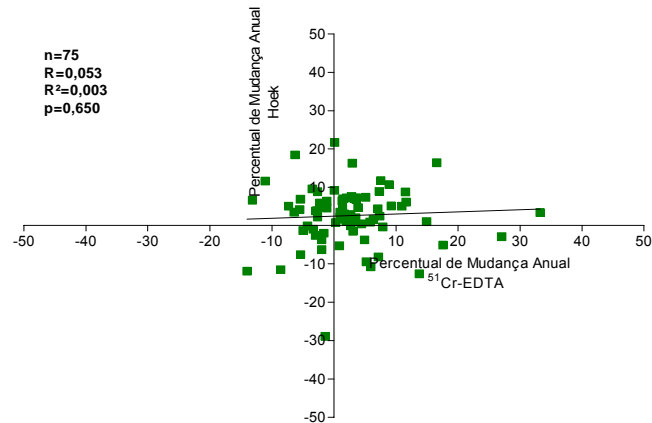
A figura 8 ilustra a correlação entre o percentual de mudança anual do RFG por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  e a concentração sérica de cistatina C (figura 8A) e o RFG estimado pelas equações de Hoek (8B) e de Larsson (8C).

Evidenciou-se uma correlação nula entre o percentual de mudança anual da medida de RFG e a concentração sérica de cistatina C ou o RFG estimado pelas equações de Hoek e de Larsson.

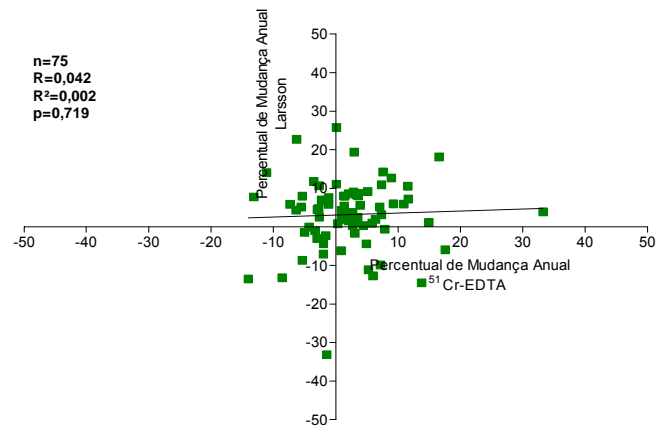
A



B

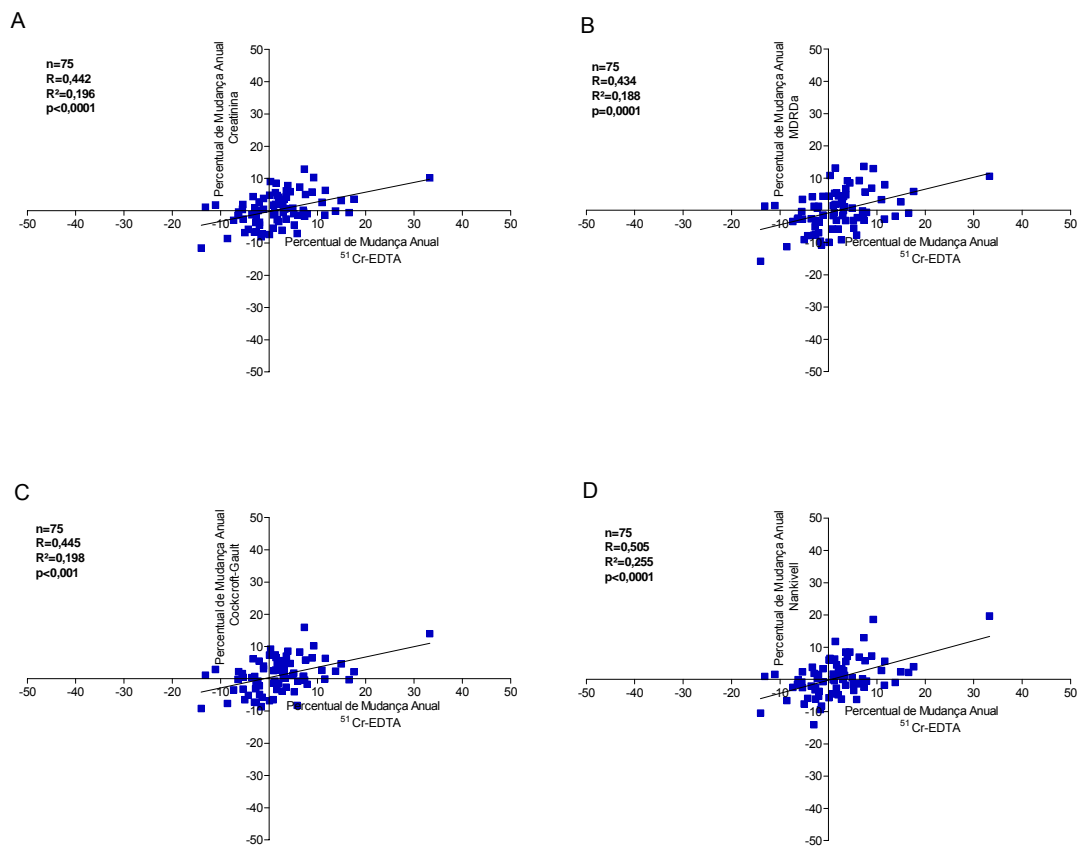


C



**Figura 8** - Relação entre os percentuais de mudanças anuais para medidas seriadas de RFG medido por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  e as medidas de CS de Cistatina C (A), equações de Hoek (B) e Larsson (C). Os pontos distribuídos no quadrante inferior direito do diagrama representam os resultados falso-positivos para redução de função renal representado por um declínio  $<$  que zero no percentual de mudança anual do RFG medido por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ . Os pontos distribuídos no quadrante superior esquerdo representam os resultados falso-negativos.

A figura 9 mostra a relação entre o percentual de mudança anual do RFG medido por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  com o percentual de mudança anual da concentração sérica de creatinina (figura 9A), do RFG estimado pelas equações do MDRD (9B), de Cockcroft-Gault (9C) e de Nankivell (9D). Foi encontrada uma relação direta com coeficientes de explicação que variaram de 0,188 a 0,255.



**Figura 9** - Relação entre os percentuais de mudanças anuais para medidas seriadas de RFG medido por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  e as medidas de CS de Creatinina (A), equações de MDRDa (B), Cockcroft-Gault (C) e Nankivell (D). Os pontos distribuídos no quadrante inferior direito do diagrama representam os resultados falso-positivos para redução de função renal representado por um declínio  $<$  que zero no percentual de mudança anual do RFG medido por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ . Os pontos distribuídos no quadrante superior esquerdo representam os resultados falso-negativos.

#### 4.2.4.1.2 Comparação do percentual de mudança anual em transplantes recentes e tardios

Uma subanálise foi realizada para investigar se o tempo de transplante influencia na predição de seriadas medidas da CS de cistatina C em detectar mudança no RFG medido por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ .

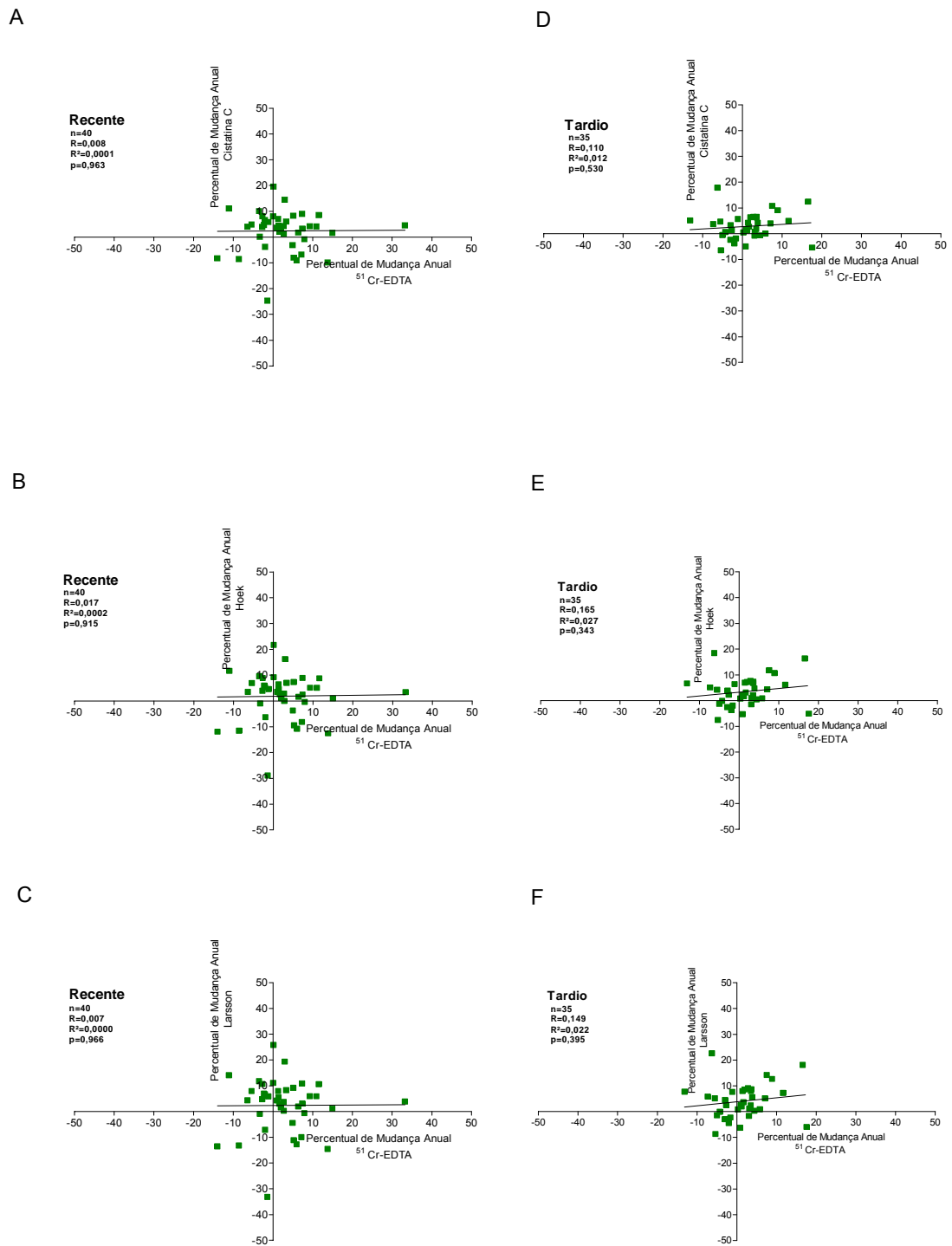
No transplante recente, a média do percentual de mudança do RFG por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  foi de  $2,59\% \pm 8,05\%$  (média  $\pm$  desvio-padrão). O valor médio para o percentual de mudança da creatinina e da cistatina C foi de  $0,11\% \pm 5,05\%$  e de  $3,39\% \pm 7,82\%$ , respectivamente.

No transplante tardio, o valor médio do percentual de mudança para o RFG por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  foi de  $1,47\% \pm 6,36\%$ ; para a creatinina foi encontrado valor de  $0,64\% \pm 4,93\%$  e para a cistatina C o percentual de mudança foi de  $2,85\% \pm 5,07\%$ , ambos sem diferença estatística em relação ao valor encontrado para o percentual de mudança do RFG medido por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ .

A figura 10 mostra a relação entre os percentuais de mudanças anuais para medidas seriadas de RFG medido por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  e as medidas de CS de Cistatina C, equações de Hoek e de Larsson, em pacientes transplantados recentes (A-C) e tardios (D-F).

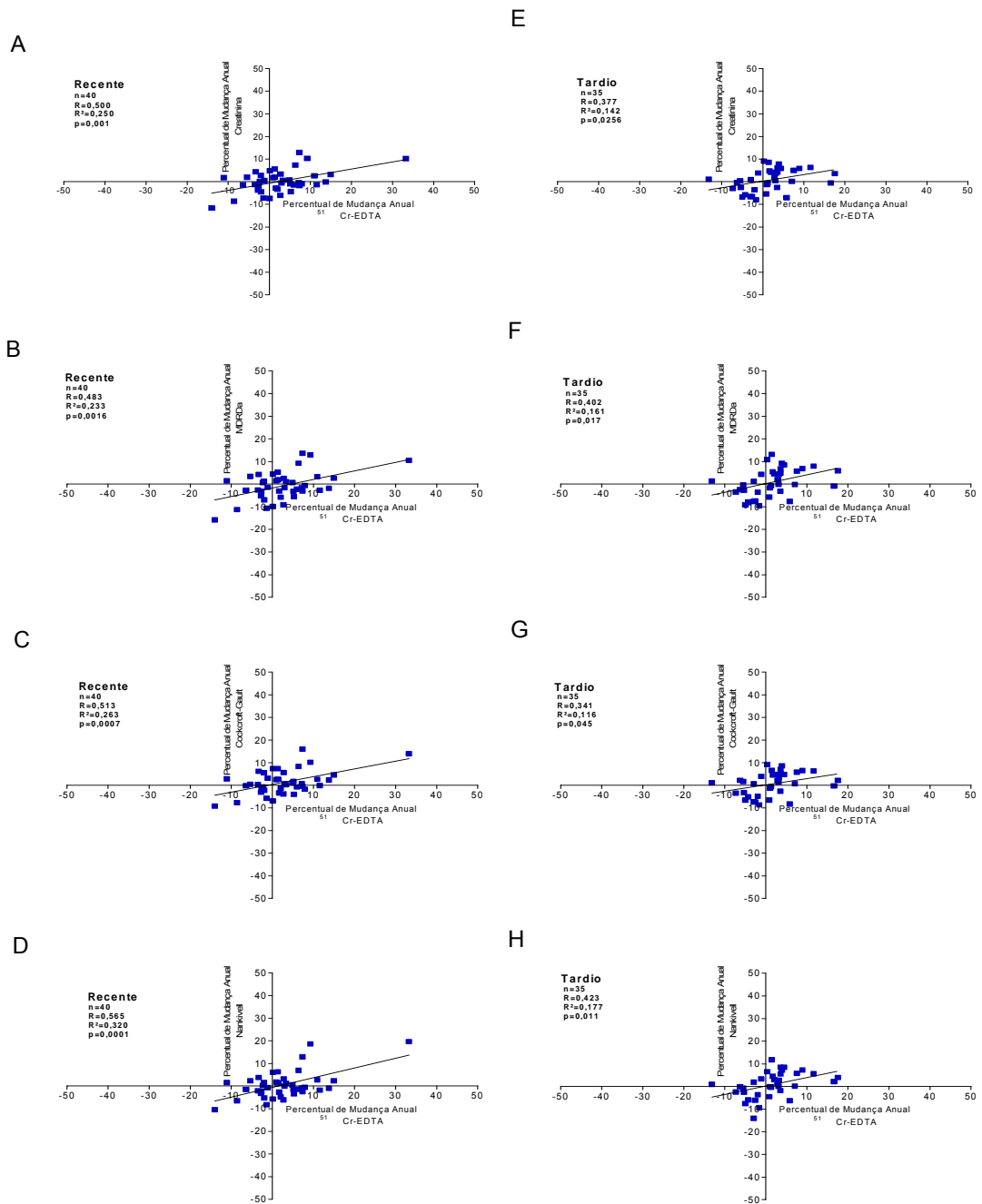
Na amostra de 40 pacientes transplantados recentes não foi encontrada relação entre os percentuais de mudança do RFG medido e os percentuais de mudanças dos marcadores de função renal.

Quando se analisou a amostra de pacientes transplantados tardios, verificou-se uma correlação direta entre os percentuais de mudança, com discreta inclinação na nuvem de dispersão dos pontos (Figura 10 D-F), mas com baixos coeficientes de explicação e estatisticamente não significativas.



**Figura 10** - Relação entre os percentuais de mudanças anuais para medidas seriadas de RFG medido por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  e as medidas de CS de Cistatina C, equações de Hoek e Larsson, em pacientes transplantados recentes (A-C) e tardios (D-F).

Ao contrário dos resultados apresentados para o marcador cistatina C, o percentual de mudança no RFG medido por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  manteve relação direta com o percentual de mudança da CS de creatinina e do RFG estimado pelas equações baseadas na CS de creatinina em transplantados recentes e tardios (**Figura 11**). O RFG estimado pela equação de Nankivell (Figura 11 D e H) teve o melhor desempenho em estimar mudanças no RFG medido por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ , mas a correlação foi maior em transplantados recentes ( $R=0,565$ ), quando comparado aos transplantados tardios ( $R=0,423$ ). Neste último a relação foi próxima à encontrada para equação do MDRD ( $R=0,402$ ) – Figura 11F.



**Figura 11** - Relação entre os percentuais de mudanças anuais para medidas seriadas de RFG medido por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  e as medidas de CS de Creatinina, equações de MDRDa, Cockcroft-Gault e Nankivell, em pacientes transplantados recentes (A-D) e tardios (E-H).



#### 4.2.4.1.3 Comparação do percentual de mudança anual em pacientes que apresentaram redução do RFG por $^{51}\text{Cr-EDTA}$

Uma outra análise foi realizada para avaliar a acurácia das medidas da CS de cistatina C, da CS de creatinina e das equações de Hoek, de Larsson, do MDRD, de Nankivell e de C-G em estimar queda no RFG.

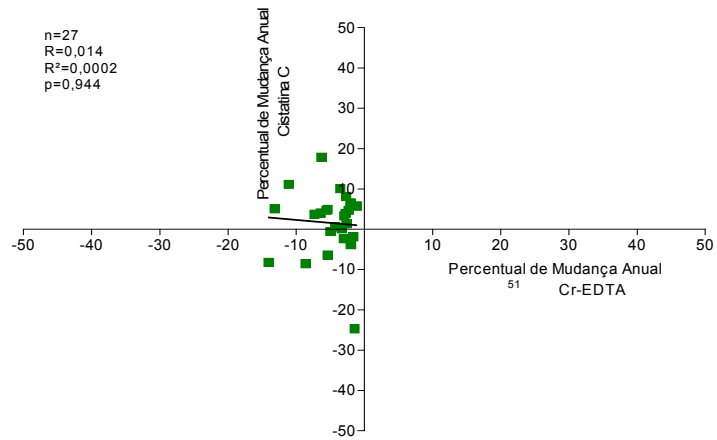
Foram identificados 27 pacientes transplantados renais recentes e tardios, que evoluíram com declínio de função renal definido como percentual de mudança anual negativo para o RFG medido por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ .

O RFG medido por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  apresentou percentual de mudança de  $-4,70\% \pm 3,52\%$  (média  $\pm$  desvio-padrão) que foi estatisticamente diferente dos valores encontrados para a creatinina ( $-2,46\% \pm 4,16\%$ ,  $p=0,03$ ) e ao valor médio do percentual de mudança da cistatina C ( $+1,54\% \pm 7,94\%$ ,  $p=0,001$ ).

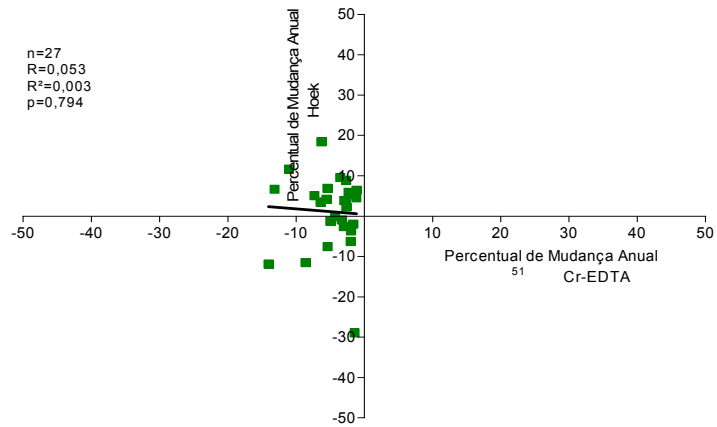
Os percentuais de mudança encontrados para as equações C-G, Nankivell, Hoek e Larsson também foram estatisticamente diferentes dos percentuais de mudança do RFG medido por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ . Entretanto, nesse grupo de 27 pacientes, a equação do MDRD foi a única medida estimada do RFG que apresentou percentual de mudança ( $-3,55\% \pm 5,17\%$ ) mais próximo do valor encontrado para o RFG medido por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  e sem diferença estatística ( $p=0,31$ ).

Foi observada uma fraca correlação estatisticamente não significativa entre o percentual de mudança do RFG por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  e os percentuais de mudança de todos os marcadores de função renal (Figuras 12 e 13). A melhor correlação foi observada para a equação do MDRD com  $R=0,150$ , mas ainda sem significância estatística (fig.13.B).

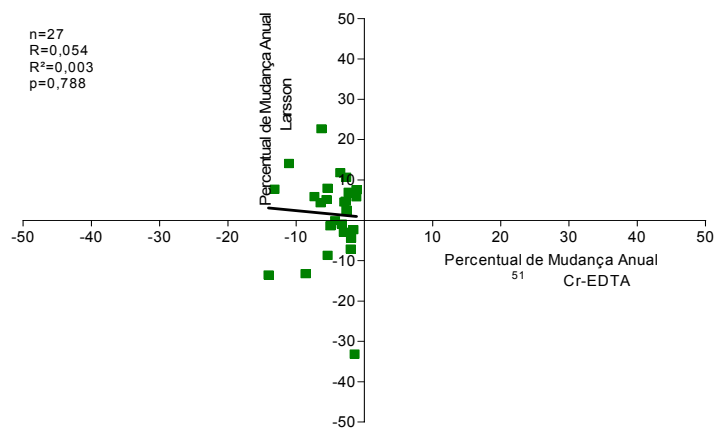
A



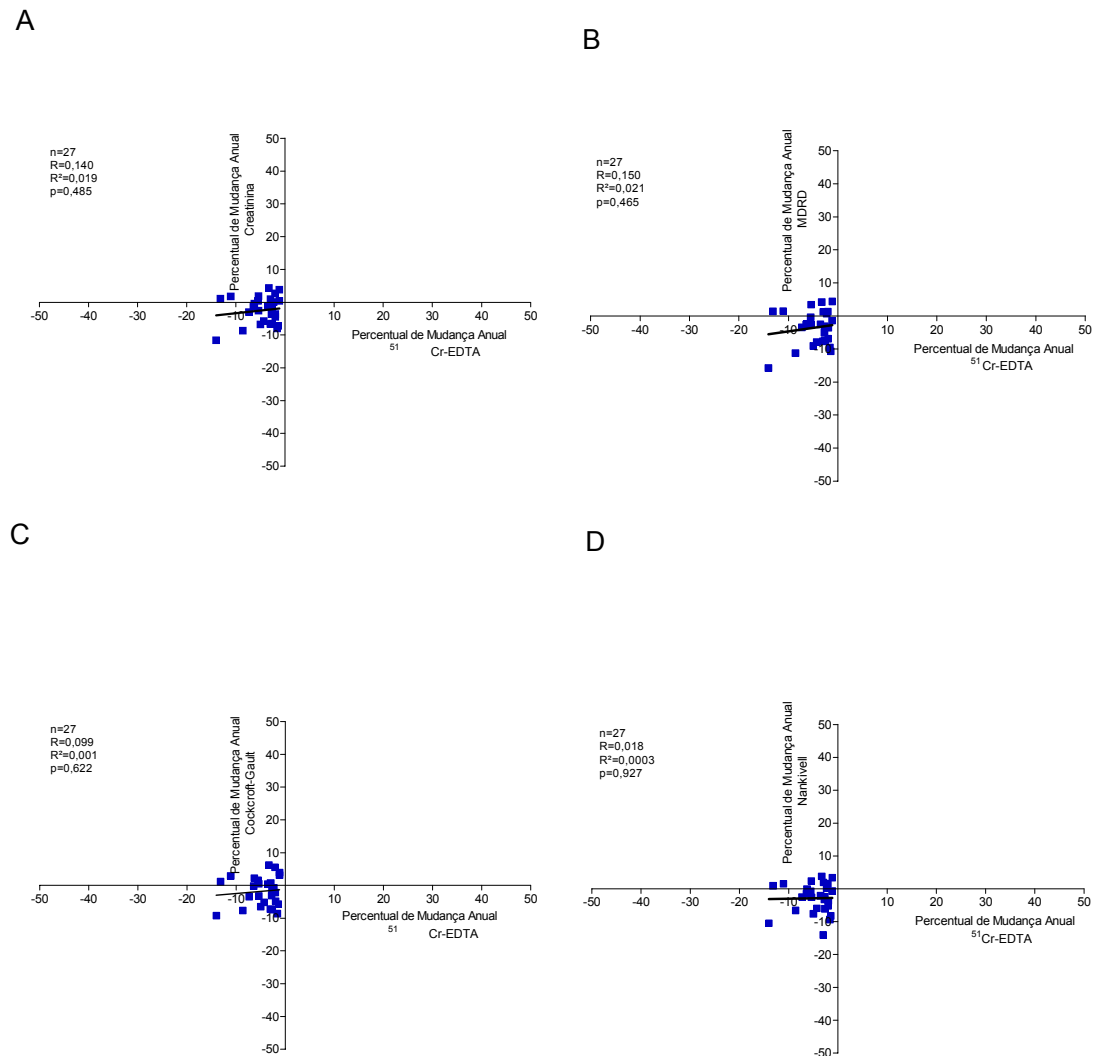
B



C



**Figura 12** - Relação entre os percentuais de mudanças anuais para medidas seriadas de RFG medido por <sup>51</sup>Cr-EDTA e as medidas de CS de Cistatina C (A), equações de Hoek (B) e Larsson (C), em pacientes transplantados com declínio no RFG por <sup>51</sup>Cr-EDTA.



**Figura 13** - Relação entre os percentuais de mudanças anuais para medidas seriadas de RFG medido por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  e as medidas de CS de Creatinina (A), equações de MDRD (B), Cockcroft-Gault (C) e Nankivell (D), em pacientes transplantados com declínio do RFG por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ .

#### 4.2.4.2 Análise longitudinal a partir da quantificação do evento “queda de filtração glomerular”

Uma análise categórica para o evento “queda de filtração glomerular” foi determinada entre os meses 1-3, 3-6 e 6-12; a quantificação desse evento em três períodos distintos permitiu a análise dos dados do mesmo paciente em três momentos, que resultou em 234 contagens.

Para a medida do RFG por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  das 234 contagens, a frequência do evento “queda de filtração glomerular” foi de 74. Portanto, a ausência do evento foi de 160.

A frequência de distribuição do evento foi determinada para os testes de função renal: CS de cistatina C, a CS de creatinina e o RFG estimado por equações.

A sensibilidade da medida de CS de cistatina C em detectar um declínio no RFG em seguimento clínico de 12 meses foi de 36,5% com VPP de 35,5%. Resultados semelhantes foram encontrados para o RFG estimado por equações de Hoek e de Larsson (Tabela 17).

Para a medida da CS de creatinina também foram encontrados baixos valores de sensibilidade e de VPP, porém superiores aos valores determinados para a CS de cistatina C, equações Hoek e Larsson.

A especificidade e VPN foram semelhantes para a CS de cistatina C e CS de Creatinina, bem como do RFG estimado por equações.

**Tabela 17** - Indicadores de qualidade dos testes de função renal

Teste	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
Creatinina (mg/dL)	52,7	71,9	46,4	76,7
MDRD (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	52,7	70,6	45,4	76,4
Cockcroft-Gault (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	50,0	75,0	48,1	76,4
Nankivell (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	54,1	71,9	47,1	77,2
Cistatina C (mg/L)	36,5	69,4	35,5	70,2
Hoek (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	37,8	70,6	37,3	71,1
Larsson (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	36,5	70,6	36,5	70,6

Valores expressos em percentagens; VPP (valor preditivo positivo); VPN (Valor preditivo negativo)

#### 4.2.5 Determinação da variabilidade intra-individual

A variabilidade intra-individual da medida das CS de cistatina C e de creatinina foi determinada nos pacientes classificados como estáveis.

Foram encontrados 15 pacientes estáveis no período M1-M3, 25 pacientes no M3-M6 e 17 pacientes no M6-M12. As dosagens das CS de creatinina e de cistatina C foram realizadas nas consultas ambulatoriais, e cada paciente contribuiu com 2 a até 10 dosagens por período analisado.

A tabela 18 mostra a média do CV intra-individual por período analisado na amostra total do estudo e na amostra de transplantados recentes e tardios. Na amostra total a CS de cistatina C apresentou, em média, valores para o CV maiores que os valores encontrados para a CS de creatinina; entretanto, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa. O maior valor médio para o CV foi 17,4 para a CS de cistatina C no período M1-M3, mas com valor de  $p=0,589$ .

**Tabela 18 - Coeficiente de variação intra-individual**

Variável (período)	CV Total (%)	CV Recente (%)	CV Tardio (%)
<b>Cistatina C</b>			
M1-M3	12,5 ± 11,7 n=15	17,4 ± 15,1 n=6	9,2 ± 3,1 n=9
M3-M6	8,5 ± 4,9 n=25	9,3 ± 5,6 n=13	7,7 ± 4,0 n=12
M6-M12	11,2 ± 3,6 n=17	10,8 ± 3,4 n=12	12,2 ± 4,2 n=5
<b>Creatinina</b>			
M1-M3	8,7 ± 4,6 n=15	9,5 ± 3,5 n=6	8,1 ± 5,4 n=9
M3-M6	8,7 ± 3,8 n=25	8,5 ± 3,0 n=13	8,9 ± 4,8 n=12
M6-M12	9,3 ± 5,0 n=17	8,7 ± 3,5 n=12	10,7 ± 7,8 n=5

Valores apresentados em média e desvio-padrão

## **6. DISCUSSÃO**

---

---

Em uma primeira fase deste estudo, mostramos:

- 1) A implantação do método de depuração renal de inulina e de depuração plasmática de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  no Hospital das Clínicas da FMUSP.
- 2) Que a depuração plasmática de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  pode substituir a depuração renal de inulina na avaliação de RFG em pacientes transplantados renais.
- 3) Uma estratégia única para medida de depuração plasmática de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  em todos os níveis de função renal com a utilização de duas amostras de sangue para a construção da curva de decaimento plasmático de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ .

Decidimos validar a depuração plasmática em razão do não requerimento de coleta de urina, não tendo, portanto, os interferentes relacionados ao esvaziamento incompleto de bexiga, especialmente em mulheres, crianças e idosos. A medida do RFG com método de injeção única do marcador  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  é também um procedimento simples que pode ser repetido com regularidade e com baixo custo, quando comparado a outros marcadores de medida de RFG como Iohexol, Iotalamato e Inulina (polyfructosan).

A necessidade do uso de um marcador de RFG de fácil utilização é ilustrada neste trabalho, no qual mostramos que o RFG estimado por

equações superestima a função renal. Na inclusão no estudo, seis pacientes apresentavam-se no estágio 1 de DRC, mas nenhum paciente apresentou depuração por inulina acima de 90ml/min/1,73m<sup>2</sup>.

Nossos dados mostraram que a depuração plasmática de <sup>51</sup>Cr-EDTA superestimou a depuração renal em concordância com prévios estudos <sup>10-13</sup>. A eliminação extra-renal do <sup>51</sup>Cr-EDTA tem sido sugerida como a provável razão para este achado.

Este estudo mostrou uma forte correlação entre a depuração por Inulina e <sup>51</sup>Cr-EDTA com quatro amostras, nos tempos 2, 4, 6 e 8 horas, com o menor erro sistemático e uma alta precisão. Quando analisamos as estratégias de coleta resumida, a mais forte correlação encontrada foi para depuração de <sup>51</sup>Cr-EDTA com duas amostras, nos tempos 4 e 6 ou 4 e 8 horas (r=0,95). Prévios estudos descreveram valores de coeficiente de correlação de 0,92 a 0,97 <sup>18, 20, 21, 23</sup>.

O coeficiente de correlação tem sido utilizado em publicações que compararam depuração por inulina e <sup>51</sup>Cr-EDTA, mas essa abordagem estatística trata apenas de uma medida de associação entre os métodos e não determina se eles concordam o suficiente para serem utilizados na prática clínica de modo intercambiável. Assim, avaliamos a concordância entre os métodos, baseada na média das diferenças (bias) e nos limites de concordância, uma análise mais apropriada quando se compara métodos.

Quando todos os pacientes foram analisados juntos, mostramos que a depuração por <sup>51</sup>Cr-EDTA, em diversas combinações de tempos de amostras, apresenta alta concordância com depuração por inulina, embora muitas delas



apresentem maior correlação e concordância em relação às demais. Garnett *et al.* <sup>6</sup> fez a primeira descrição acerca do uso da depuração de <sup>51</sup>Cr-EDTA e recomendou amostras de plasma de 2 a 4 horas após injeção.

Em 1996, um comitê em *clearance* renal indicou diferentes estratégias para o número de amostras e de tempos de coleta de acordo com o RFG estimado; nesse consenso, para pacientes com RFG estimado acima de 30ml/min, a depuração plasmática pode ser avaliada por amostra única, mas para RFG estimado entre 15-30 ml/min, uma amostra tardia é requerida entre 3 e 5 horas após injeção <sup>7</sup>. Fleming *et al.* <sup>31</sup> sugeriram duas, três ou quatro amostras de sangue coletadas entre 2 e 5 horas após injeção, ou uma amostra na 3ª ou 4ª hora após injeção, para adultos, ou na 2ª hora, para crianças.

Nós acreditamos que a recomendação de diferentes estratégias com base no nível de RFG estimado é de algum modo confuso para uma rotina laboratorial. Além disso, para pacientes transplantados existe a possibilidade de mudança na função renal entre o intervalo de tempo de prescrição do exame e a sua realização, tornando difícil a escolha da estratégia a ser usada em cada paciente.

Assim, nós recomendamos que a depuração plasmática por <sup>51</sup>Cr-EDTA com duas amostras coletadas na 4ª e 6ª hora após injeção deva ser utilizada para todos os níveis de função do enxerto renal; esta estratégia única apresenta um erro sistemático aceitável do ponto de vista clínico (1,6 a 3,2 ml/min/1,73m<sup>2</sup> nos estágios 2 a 4 de DRC), um estreito limite de concordância e alta precisão, além de ser mais adequada para o paciente e para a logística de um laboratório.

Em 1969, Masey et al.<sup>87</sup> mostraram que em indivíduos normais o radiofármaco <sup>51</sup>Cr-EDTA é equilibrado quase que completamente nas primeiras duas horas após a injeção do <sup>51</sup>Cr-EDTA. Em pacientes transplantados renais, que habitualmente apresentam RFG abaixo de 80ml/min/1,73m<sup>2</sup>, é provável que o equilíbrio não ocorra por completo em duas horas, e a pequena fração não equilibrada tenha impacto na determinação do RFG, justificando a nossa estratégia que requer a coleta de amostras mais tardias com 06 horas.

Na prática clínica nefrológica, existe uma necessidade de monitorização da função renal, sendo importante o conhecimento do coeficiente de variação intra-individual de cada método para distinguir uma mudança real, no RFG, daquelas em decorrência da variabilidade fisiológica ou laboratorial. Para esse propósito nós selecionamos doadores após um ano de doação de rim porque nessa população não se espera que haja mudança real no RFG em um curto intervalo de tempo.

Encontramos valores de 6,4% a 10,1% para o CV que nos parece aceitável quando comparado aos valores descritos na literatura médica. Para a depuração renal de inulina, por exemplo, tem sido descrito um CV intra-individual de 7,5%<sup>118, 126</sup>.

Um coeficiente de 3,9% (2,4% a 6,7%) para RFG por <sup>51</sup>Cr-EDTA foi descrito por Chantler e Barratt a partir de medidas em replicatas de somente cinco adultos saudáveis<sup>13</sup>. Brochner-Mortensen e Rodbro encontraram valores de 5,5% e 11,6% para pacientes com função renal acima ou abaixo de 30ml/min, respectivamente<sup>127</sup>; Dois outros estudos retrospectivos

descreveram valores para o CV de 9,8% e 10,4%<sup>128, 129</sup>. Em pacientes diabéticos o CV descrito por Sambataro *et al.*<sup>11</sup> foi de 3,5% ± 2,5%.

Em nosso conhecimento, este foi o primeiro estudo que realizou a validação de uma metodologia para medir depuração plasmática de <sup>51</sup>Cr-EDTA em pacientes transplantados renais usando a depuração renal de inulina como método padrão-ouro.

Um potencial limitador dos nossos resultados foi a não utilização de um monitor de radiação para verificar a ocorrência de extravasamento do radiofármaco durante sua infusão na veia; entretanto, é pouco provável que essa tenha sido uma fonte de erro para o cálculo da medida do RFG, já que a ausência de acesso venoso periférico foi um critério de exclusão da fase A do estudo. Além disso, a exigência do monitor de radiação impede que o método seja rapidamente absorvido na maioria dos centros médicos brasileiros.

Em uma segunda fase – Fase B - este estudo apresentou:

- 1) A evolução das medidas de RFG por <sup>51</sup>Cr-EDTA e das medidas das CS de cistatina C e de creatinina em período de 12 meses em pacientes transplantados renais;
- 2) A relação entre o RFG medido por <sup>51</sup>Cr-EDTA e as medidas de RFG estimado por equações, as medidas das CS de cistatina C e de creatinina;
- 3) Uma análise transversal que mostra a acurácia dos marcadores de função renal em estimar o RFG medido por <sup>51</sup>Cr-EDTA, com uma subanálise em transplante recente e tardio;

- 4) Uma análise longitudinal do desempenho de medidas seriadas das CS de cistatina C e de creatinina em estimar a tendência de mudança anual da depuração plasmática de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ .

Desde 1985, quando uma associação entre a concentração sérica de cistatina C e o RFG foi descrita por Simonsen *et al.*<sup>46</sup>, a literatura médica apresenta um crescente interesse pelo estudo dessa proteína como um marcador de função renal. Há duas décadas os estudos mostram a relação entre a CS de cistatina C e o RFG e discutem as possíveis variáveis biológicas que possam influenciar na CS de cistatina C. Os trabalhos publicados, que em sua maioria são análises transversais, apresentam resultados conflitantes do desempenho da CS de cistatina C em estimar o RFG.

Neste estudo mostramos uma forte correlação entre a CS de cistatina C e o RFG medido por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  em quatro análises realizadas nos meses 1, 3, 6 e 12 do seguimento clínico e também que a relação entre o RFG e as medidas das CS cistatina C e creatinina foram equivalentes. Esses resultados são corroborados por outros autores. Schuck *et al.*<sup>90</sup>, em estudo com 67 pacientes com DRC avançada e RFG medido por inulina, mostrou um coeficiente de correlação de 0,81 e 0,82 para o inverso das CS de cistatina C e de creatinina, respectivamente. O'Riordan *et al.*<sup>98</sup> encontraram um coeficiente de correlação de 0,84 para o inverso da CS de cistatina C e de 0,83 para o inverso da CS de creatinina em uma amostra de 53 pacientes com doença renal e RFG medido por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ .

Em uma população pediátrica (n=67) e RFG medido por inulina, Stickle *et al.*<sup>92</sup> encontraram uma correlação mais forte entre o RFG e o inverso da CS de creatinina (R=0,84) em comparação ao inverso da CS de cistatina C (R=0,77), mas sem diferença estatística entre os valores de R. Odozze *et al.*<sup>89</sup>, em um estudo com 49 pacientes diabéticos, também mostraram melhor correlação do RFG com a medida da CS de creatinina (R=0,77) do que com a medida de CS de cistatina C (R=0,65), ambas com valor de  $p < 0,001$ .

Em contrapartida, vários estudos descrevem uma superioridade da CS de cistatina C em relação à CS de creatinina em estimar a função renal.<sup>65 94</sup> Woitas *et al.*<sup>107</sup> mostraram uma correlação de 0,661 ( $p < 0,0001$ ) e de 0,279 ( $p = 0,066$ ) para o inverso das CS de cistatina C e de creatinina, respectivamente, com a medida da depuração renal de inulina em 44 pacientes cirróticos; no entanto, nesse estudo, a ausência de correlação para o inverso da CS de creatinina com  $p = 0,066$  pode ser explicada pela perda de massa muscular e menor geração de creatinina freqüentemente observada em pacientes com cirrose hepática. Coll *et al.*<sup>71</sup> encontraram uma melhor correlação entre o RFG e a CS de cistatina C (R=0,77) do que para a CS de creatinina (R=0,73), com valor de  $p$  idêntico ( $p < 0,0001$ ). Fliser *et al.*<sup>96</sup>, em uma análise com 39 idosos, descreveram coeficiente de correlação de 0,65 para a CS de cistatina C e de 0,30 para CS de creatinina em comparação com o RFG medido por inulina.

Em pacientes transplantados renais, uma relação com R de 0,83 e 0,67 para os inversos das CS de cistatina C e de creatinina, respectivamente, foi descrita por Risch *et al.*<sup>112</sup>, mas esse estudo envolveu uma pequena amostra

de 30 pacientes transplantados renais. Daniel *et al.*<sup>130</sup>, com uma avaliação de 60 transplantados renais estáveis, mostraram um coeficiente de explicação de 0,42 para relação entre RFG por inulina e o inverso da CS de cistatina C; para a equação de C-G e o inverso da CS de creatinina, a relação foi semelhante com R<sup>2</sup> de 0,40 (1/creatinina) e 0,44 (C-G); também não houve diferença na AUC na análise de curva ROC.

Nosso estudo não somente apresentou a relação entre a CS de cistatina C e o RFG, como também a influência do tempo de transplante na relação entre essas duas variáveis. Mostramos uma mudança na relação entre a CS de cistatina C e o RFG quando analisamos somente a amostra de transplantados recentes nos meses 1 e 12, encontrando valores mais baixos para o coeficiente de explicação no mês 1 (0,16 e p=0,01) em relação ao valor encontrado no mês 12, com uma melhora do coeficiente de explicação (R<sup>2</sup>= 0,34) e maior significância estatística (p<0,001).

A pior relação da CS de cistatina C com o RFG medido por <sup>51</sup>Cr-EDTA no mês 1 em relação o mês 12 pode ter como provável explicação a exposição a doses mais elevadas de corticosteróide no primeiro mês após o transplante. A influência dos glicocorticóides na CS de cistatina C tem sido discutida na literatura médica. Em cultura de células, a exposição a elevadas doses de dexametasona produz significativo aumento, dose-dependente, na produção de cistatina C por possível aumento na transcrição do gene da cistatina C<sup>82</sup>. O efeito da metilprednisolona em aumentar a CS de cistatina C já foi bem documentado também por estudo clínico em pacientes asmáticos<sup>81</sup>. Em transplantados renais Risch *et al.*<sup>80</sup> mostraram não só a influência da

metilprednisolona em elevar a CS de cistatina C, como também que pacientes com baixas doses de prednisona (5 a 10mg/dia) apresentaram CS de cistatina C mais elevada quando comparados com o grupo de pacientes em uso de AZA ou CSA e sem corticosteróide. Bokenkamp *et al.*<sup>78</sup> descreveram que crianças transplantadas renais têm níveis mais elevados de cistatina C, quando comparadas a crianças com outras patologias renais e com igual nível de RFG medido por inulina; entretanto, em um segundo estudo que envolveu crianças com síndrome nefrótica e sob corticoterapia, os autores não conseguiram demonstrar a mesma relação entre a prednisona e a CS de cistatina C<sup>79</sup>.

Outra particularidade do nosso estudo é que as medidas das CS de cistatina C e de creatinina foram comparadas com RFG medido por <sup>51</sup>Cr-EDTA nos meses 1 e 12 não somente por análise de regressão linear, mas também pela medida do erro sistemático, pela precisão e pela acurácia de 30%. Essa é uma análise estatística mais apropriada quando se avalia a eficiência de um teste e quando se compara métodos diagnósticos.

Mostramos que o RFG calculado por equações superestimou a depuração plasmática de <sup>51</sup>Cr-EDTA, mas o erro sistemático foi maior para as equações baseadas na CS de creatinina em comparação às equações baseadas na CS de cistatina C. As equações de Hoek e Larsson apresentaram maior acurácia nos meses 1 e 12 nas amostras de transplantados recentes e de transplantados tardios. Em relação às equações baseadas na CS de creatinina, encontramos maior acurácia para a equação do MDRD, seguido por Cockcroft-Gault e Nankivell.

Zahran *et al.*<sup>131</sup>, em uma análise transversal de 110 pacientes transplantados renais estáveis e RFG medido por inulina, mostraram que as equações superestimam a depuração de inulina e que as equações baseadas na CS de cistatina C não são superiores às baseadas na CS de creatinina. Em contraposição, em uma análise de 117 pacientes transplantados renais estáveis, a equação de Le Bricon apresentou a maior acurácia, com 89% de seus valores dentro de 30% dos valores de RFG medido por <sup>99m</sup>Tc-DTPA; e para as equações baseadas na creatinina sérica, foi encontrada maior acurácia, em 30%, para a equação de Cockcroft-Gault (80% dos valores) em comparação à equação de Nankivell (79) e MDRD abreviada (74%)<sup>116</sup>. Mais recentemente, e com uma amostra maior, de 198 pacientes, os mesmos autores publicaram resultados que também mostraram maior acurácia para as equações baseadas na CS de cistatina C<sup>132</sup>.

A análise longitudinal mostrou que todos os marcadores de função renal avaliados no estudo não apresentaram suficiente acurácia para estimar a tendência de mudança no RFG medido por <sup>51</sup>Cr-EDTA em seguimento clínico de 12 meses em pacientes transplantados renais. Mostrou também que a CS de creatinina e as equações C-G, Nankivell, e MDRD são superiores, quando comparada às CS de cistatina C e às equações Hoek e Larsson, para estimar a mudança do RFG. E ainda, que o desempenho da cistatina C foi pior no transplante recente quando comparado ao transplante tardio.

Até o presente momento, não é de nosso conhecimento nenhum outro trabalho que tenha envolvido pacientes transplantados renais e cujos desenhos ou resultados possam ser comparados ao estudo apresentado.



Outros autores analisaram a CS de cistatina C em estudos longitudinais, mas com uma amostra menor de pacientes e sem uma medida de RFG. Um estudo que avaliou a CS de cistatina C no pós-transplante imediato e no 3º mês após o transplante foi conduzido por Le Bricon *et al.*<sup>110</sup> com avaliação de função do enxerto renal através da dosagem diária das CS de cistatina C e de creatinina nas primeiras 03 semanas após o transplante, mas sem uma medida de RFG; os autores utilizaram a equação de Cockcroft-Gault para estimar o RFG e incluíram um número pequeno de pacientes (n=30). Em uma segunda análise, 03 meses após o transplante, os pacientes foram submetidos à depuração plasmática de <sup>51</sup>Cr-EDTA, e o coeficiente de correlação encontrado para a recíproca da CS de cistatina C e para a recíproca da CS de creatinina com o RFG foi de 0,879 e de 0,784, respectivamente, ambos com valor de  $p < 0,0001$ <sup>111</sup>. Um outro estudo, também com pequena amostra de pacientes transplantados (n=21), foi desenhado para avaliar a validade de medidas de CS de cistatina C no pós-transplante imediato na predição da sobrevida do enxerto em 1, 3 e 5 anos; nenhuma medida de depuração foi feita, e o RFG foi estimado pela equação de Cockcroft-Gault<sup>109</sup>.

Em elegante estudo que envolveu pacientes diabéticos, com filtração glomerular normal ou elevada, Perkins *et al.*<sup>95</sup> empregaram a metodologia estatística utilizada em nosso estudo com a aplicação da análise da regressão linear para obter a tendência anual de mudança na função renal; os autores mostraram uma forte correlação entre a tendência da depuração renal de Iotalamato e a tendência da CS de cistatina C ( $R=0,77$ ), que foi

superior à encontrada para a tendência da CS de creatinina (0,32). Nosso estudo, entretanto, não reproduziu os resultados encontrados por Perkins *et al.*, e alguns aspectos merecem ser pontuados:

1) O estudo não incluiu pacientes transplantados, e sim pacientes diabéticos, uma população em que é descrito ter um CV intra-individual para a cistatina C mais baixo em relação ao CV encontrado em transplantados renais. Hoek *et al.*<sup>113</sup>, em análise de 21 pacientes diabéticos e medidas em duplicatas de cistatina C com intervalo de 2 a 3 dias, encontraram CV intra-individual de  $3,1\% \pm 2,5\%$ . Keevil *et al.*<sup>67</sup> encontraram CV intra-individual de 13,3% para CS de cistatina C e 4,9% para a CS de creatinina em amostras em duplicatas de indivíduos saudáveis; entretanto, esse estudo incluiu apenas 12 indivíduos.

A variabilidade intra-individual da CS de cistatina C em pacientes transplantados foi demonstrada por Risch *et al.*<sup>112</sup> que, em análise de 85 transplantados com média de 06 dosagens laboratoriais por paciente, encontraram maior CV para a CS de cistatina C do que para a CS de creatinina, com  $p < 0,001$ . E Podracka *et al.*<sup>106</sup> mostraram CV intra-individual para a CS de cistatina C de  $10,3 \pm 4,9\%$  e para a CS de creatinina de  $7,7 \pm 4,2\%$  ( $p=0,04$ ) em estudo com 20 crianças transplantadas (rim isolado ou duplo rim-fígado), com média de 8 dosagens por paciente. Nós também encontramos valores mais altos de CV para a CS de cistatina C do que para a CS de creatinina, mas a diferença foi estatisticamente não significativa.

Em resumo, há indícios de que CS de cistatina C tenha uma maior variabilidade em pacientes transplantados, o que pode ter determinado a

ausência de relação com percentual de mudança do RFG por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  encontrada em nosso estudo.

Acreditamos que a discrepância para a variabilidade intra-individual da medida de RFG por Iotalamato e da CS de cistatina C nos pacientes diabéticos tenha sido inferior à encontrada em nosso estudo para o RFG por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  e a CS de cistatina C. O CV interteste para  $^{125}\text{I-Iotalamato}$ , com intervalo de três meses entre os testes, foi descrito por Levey *et al.*<sup>133</sup> em amostra de pacientes incluídos nos estudos MDRD e DCCT (*Diabetes Control and Complications Trial*); o valor mediano encontrado foi de 6,3%, sendo descritos valores mais baixos quanto maior o RFG; nos pacientes com RFG entre 56-90ml/min/1,73m<sup>2</sup>, o valor mediano foi de 4%.

2) No estudo de Perkins *et al.*, os pacientes tinha função renal normal ou elevada, com média de  $153 \pm 27$  ml/min/1,73m<sup>2</sup> na inclusão e de  $136 \pm 42$  ml/min/1,73m<sup>2</sup> no 3º ano de seguimento. Em nosso estudo, o RFG por  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  foi de  $50,6 \pm 17,3$  no primeiro mês e  $52,2 \pm 16,1$  ml/min/1,73m<sup>2</sup> no 12º mês. Não está estabelecido se o CV intra-individual da cistatina C modifica com níveis mais baixos de RFG.

Em relação à creatinina, mostramos um melhor desempenho tanto para a CS, quanto para as equações baseadas na CS de creatinina. Para a equação de MDRD, por exemplo, descrevemos um valor de  $R=0,43$  ( $p<0,001$ ) na amostra total ( $n=75$ ), distinto aos resultados de Perkins *et al.*, que mostraram valor de  $R = 0,31$ , sem significância estatística ( $p=0,09$ ). Vale ressaltar que os pacientes diabéticos tinham RFG normal ou elevado, uma faixa de filtração na qual a medida da CS de creatinina tem baixa acurácia para detectar declínio de função renal.

Quando avaliamos somente os pacientes que evoluíram com declínio da função renal, a CS de creatinina não foi capaz de estimar a queda no RFG.

Uma limitação do nosso estudo foi que nós não aplicamos para a dosagem de creatinina sérica o fator de calibração do *Cleveland Clinic laboratory*, requerido quando se utiliza a equação do MDRD *study*<sup>134</sup>.

Existem controvérsias com respeito à acurácia diagnóstica da medida da CS de cistatina C. Além da influência dos corticosteróides na CS de cistatina C, outros fatores foram sugeridos por Knight *et al.*<sup>69</sup> em estudo que envolveu 8058 adultos e mostrou que a concentração sérica de cistatina C foi significativamente relacionada ao aumento de idade, ao sexo masculino, ao tabagismo e a níveis elevados de Proteína C Reativa. Uma crítica a esse estudo é que os fatores foram ajustados para o *clearance* de creatinina medido em urina de 24 horas, e não com uma medida de RFG não dependente da CS de creatinina.

Na análise longitudinal medimos também a sensibilidade, especificidade, VPP e VPN dos marcadores cistatina C e creatinina para detectar o evento “queda de filtração glomerular”; a baixa sensibilidade da cistatina C em detectar a mudança no RFG corrobora os resultados mostrados na análise de cálculo da tendência do “*slope*” e já discutidos acima. Uma limitação dessa análise foi a utilização dos valores de CV intra-individual calculados em doadores na FASE A deste estudo para definir o evento “queda de filtração glomerular”; a variabilidade dos marcadores pode ser distinta nessas populações; para a CS de cistatina C, utilizamos o CV de

3,5%, um valor inferior ao descrito na literatura médica para pacientes transplantados renais.

Nossos resultados confirmaram dados de estudos transversais, que mostram elevada correlação entre a medida da CS de cistatina C e o RFG. Mostramos uma discreta tendência de superioridade para a CS de cistatina C devido à maior acurácia, ao menor erro sistemático e ao mais forte coeficiente de explicação, evidenciados somente na amostra de pacientes transplantados tardios e em análise transversal. Entretanto, no transplante recente, a CS de cistatina C teve fraca correlação com o RFG, sendo possível que outros fatores, não dependentes da filtração glomerular, influenciem na CS de cistatina C nessa fase do transplante renal.

Um aspecto importante no desempenho da medida da CS de cistatina C foi demonstrado na análise longitudinal que evidenciou uma baixa acurácia da CS de cistatina C em estimar mudança no RFG no seguimento clínico de pacientes transplantados renais.

## **7. CONCLUSÕES**

---

---

- A depuração plasmática de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  é uma medida precisa e acurada de RFG que pode ser utilizada em substituição à depuração renal de inulina, em pacientes transplantados renais.
  
- Medidas seriadas da CS de cistatina C não apresentam validade preditiva para detectar mudanças no Ritmo de Filtração Glomerular, em pacientes transplantados renais.

## **8. ANEXOS**

---

---



### **Projeto Piloto**

A medida da depuração renal de Inulina e da depuração plasmática de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  não faziam parte da rotina de avaliação de função renal no Hospital das Clínicas da FMUSP, o que gerou a necessidade de desenvolver um projeto piloto antes do início da FASE A deste estudo.

O objetivo do projeto piloto foi adquirir conhecimento prático e teórico das técnicas de laboratório e fazer adequação dos métodos de depuração por inulina e  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ .

O projeto piloto foi iniciado após aprovação do projeto de pesquisa e do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pela CAPPesq.

Durante o projeto piloto, foram feitos ajustes nos tempos de coleta e no número de amostras coletadas para a depuração plasmática de  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ . Nos primeiros 10 pacientes, foram coletadas duas amostras de sangue nos tempos 2 e 4 horas após injeção do radiofármaco. A partir da inclusão do 11º paciente e com o objetivo de alcançar uma melhor correlação com a depuração de inulina, o número de amostras foi ampliado para quatro amostras nos tempos 2, 4, 6 e 8 horas. A administração de 10 ml de SF 0,9% imediatamente após a infusão do  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  também foi iniciada a partir da inclusão do 11º paciente. Outra medida implantada nessa fase foi estabelecer o tempo de centrifugação das amostras de sangue em 10 minutos.

Para a depuração renal de inulina, a dose de infusão contínua foi inicialmente de 10mg/m<sup>2</sup>/min; entretanto, os cinco primeiros pacientes apresentaram concentração sérica de inulina inferior à concentração sérica recomendada - de 20 a 40mg/dL -, o que motivou a elevação da dose de manutenção para 12mg/m<sup>2</sup>/min.

A partir da inclusão do 11º paciente, não foram feitas modificações nos métodos.

Quinze pacientes transplantados renais foram incluídos no projeto piloto. A tabela 1 traz os dados demográficos da população estudada e as medidas de RFG realizadas nessa fase do estudo. A Tabela 2 exemplifica a depuração de inulina.

Tabela 1- Dados demográficos e medidas de RFG por inulina e <sup>51</sup>Cr-EDTA

n	Nome	Idade	Sexo	Inulina	<sup>51</sup> Cr-EDTA
1	A. A. F.O.	56	M	Perda da infusão	-
2	R. C. M	23	F	79,0	44,4
3	C. C. L.S.S	25	F	40,9	52,1
4	J. S.J.	28	M	56,3	52,3
5	W.A.L	42	M	36,0	49,2
6	V. F.F	54	M	52,6	72,9
7	V. A	53	M	49,3	51,6
8	P. J. S.	35	M	52,7	61,6
9	M.D.P	42	M	120,2	75,5
10	N. A.O	51	M	82,3	52,8
11	S. I. R. S	55	M	Perda da infusão	-
12	D. R. S.M	33	F	78,2	81,6
13	D. R.S	34	F	95,1	97,3
14	D. P. Y	26	F	Perda da infusão	-
15	M.T.S. A	40	F	81,8	64,3

Tabela 2 - Depuração renal de inulina em paciente transplantado renal

Período	Concentração urinária de inulina (U) mg/dL	Concentração plasmática de inulina (P) mg/dL	(U/P)inulina	V.U (ml/min)	Cl.In (ml/min)
Zero (90 min)		27,92			
1º	489,22	28,50	17,17	3,22	55,27
2º	359,69	32,93	10,92	4,82	52,64
3º	566,27	32,55	17,39	3,05	53,06
4º	411,22	29,85	13,77	3,61	49,67
<i>Clearance</i> Médio					52,66

Cl.In= *Clearance* de inulina; V.U= Volume urinário.

## **9. REFERÊNCIAS**

---

---

1. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* 1999;341(23):1725-30.
2. Hariharan S, McBride MA, Cohen EP. Evolution of endpoints for renal transplant outcome. *Am J Transplant* 2003;3(8):933-41.
3. Hariharan S, McBride MA, Cherikh WS, Tolleris CB, Bresnahan BA, Johnson CP. Post-transplant renal function in the first year predicts long-term kidney transplant survival. *Kidney Int* 2002;62(1):311-8.
4. Gaspari F, Perico N, Ruggenenti P, Mosconi L, Amuchastegui CS, Guerini E, et al. Plasma clearance of nonradioactive iohexol as a measure of glomerular filtration rate. *J Am Soc Nephrol* 1995;6(2):257-63.
5. Gaspari F, Perico N, Remuzzi G. Application of newer clearance techniques for the determination of glomerular filtration rate. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998;7(6):675-80.
6. Garnett ES, Parsons V, Veall N. Measurement of glomerular filtration-rate in man using a <sup>51</sup>Cr-edetic-acid complex. *Lancet* 1967;1(7494):818-9.
7. Blaufox MD, Aurell M, Bubeck B, Fommei E, Piepsz A, Russell C, et al. Report of the Radionuclides in Nephrourology Committee on renal clearance. *J Nucl Med* 1996;37(11):1883-90.
8. Chantler C, Garnett ES, Parsons V, Veall N. Glomerular filtration rate measurement in man by the single injection methods using <sup>51</sup>Cr-EDTA. *Clin Sci* 1969;37(1):169-80.
9. Brochner-Mortensen J. A simple method for the determination of glomerular filtration rate. *Scand J Clin Lab Invest* 1972;30(3):271-4.
10. Rehling M, Moller ML, Thamdrup B, Lund JO, Trap-Jensen J. Simultaneous measurement of renal clearance and plasma clearance of <sup>99m</sup>Tc-labelled diethylenetriaminepenta-acetate, <sup>51</sup>Cr-labelled ethylenediaminetetra-acetate and inulin in man. *Clin Sci (Lond)* 1984;66(5):613-9.

11. Sambataro M, Thomaseth K, Pacini G, Robaudo C, Carraro A, Bruseghin M, et al. Plasma clearance rate of <sup>51</sup>Cr-EDTA provides a precise and convenient technique for measurement of glomerular filtration rate in diabetic humans. *J Am Soc Nephrol* 1996;7(1):118-27.
12. Moore AE, Park-Holohan SJ, Blake GM, Fogelman I. Conventional measurements of GFR using <sup>51</sup>Cr-EDTA overestimate true renal clearance by 10 percent. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003;30(1):4-8.
13. Chantler C, Barratt TM. Estimation of glomerular filtration rate from plasma clearance of <sup>51</sup>-chromium edetic acid. *Arch Dis Child* 1972;47(254):613-7.
14. Heath DA, Knapp MS, Walker WH. Comparison between inulin and <sup>51</sup>Cr-labelled edetic acid for the measurement of glomerular filtration-rate. *Lancet* 1968;2(7578):1110-2.
15. Lavender S, Hilton PJ, Jones NF. The measurement of glomerular filtration-rate in renal disease. *Lancet* 1969;2(7632):1216-8.
16. Hagstam KE, Nordenfelt I, Svensson L, Svensson SE. Comparison of different methods for determination of glomerular filtration rate in renal disease. *Scand J Clin Lab Invest* 1974;34(1):31-6.
17. Fogh-Andersen N. Binding of the chromium-ethylenediaminetetraacetic acid complex (CrEDTA) to human albumin. *Scand J Clin Lab Invest* 1980;40(8):805-8.
18. Stamp TC, Stacey TE, Rose GA. Comparison of glomerular filtration rate measurements using inulin, <sup>51</sup>CrEDTA, and a phosphate infusion technique. *Clin Chim Acta* 1970;30(2):351-8.
19. Ditzel J, Vestergaard P, Brinklov M. Glomerular filtration rate determined by <sup>51</sup>Cr-EDTA-complex. A practical method based upon the plasma disappearance curve determined from four plasma samples. *Scand J Urol Nephrol* 1972;6(2):166-70.
20. Rehling M, Moller ML, Thamdrup B, Lund JO, Trap-Jensen J. Reliability of a <sup>99m</sup>Tc-DTPA gamma camera technique for determination of single kidney glomerular filtration rate. A comparison to plasma clearance of <sup>51</sup>Cr-EDTA in one-kidney patients, using the renal clearance of inulin as a reference. *Scand J Urol Nephrol* 1986;20(1):57-62.

21. Monteiro MC, Alonso G, Ajzen H, Pereira AB. Assessment of glomerular filtration rate utilizing subcutaneously injected <sup>51</sup>Cr-EDTA. *Braz J Med Biol Res* 1994;27(11):2557-64.
22. Brochner-Mortensen J, Giese J, Rossing N. Renal inulin clearance versus total plasma clearance of <sup>51</sup>Cr-EDTA. *Scand J Clin Lab Invest* 1969;23(4):301-5.
23. Jagenburg R, Attman PO, Aurell M, Bucht H. Determination of glomerular filtration rate in advanced renal insufficiency. *Scand J Urol Nephrol* 1978;12(2):133-7.
24. Brochner-Mortensen J, Rodbro P. Optimum time of blood sampling for determination of glomerular filtration rate by single-injection [<sup>51</sup>Cr]EDTA plasma clearance. *Scand J Clin Lab Invest* 1976;36(8):795-800.
25. Brochner-Mortensen J, Rohbrandt K, Lauritzen RB. Precision of single injection (<sup>51</sup>Cr)EDTA plasma clearance and endogenous creatinine clearance determinations in children. *Scand J Clin Lab Invest* 1977;37(7):625-9.
26. Nyberg G, Norden G, Svalander C, Blohme I. Long-term renal allograft function. *Transpl Int* 1994;7(4):284-7.
27. Granerus G, Aurell M. Reference values for <sup>51</sup>Cr-EDTA clearance as a measure of glomerular filtration rate. *Scand J Clin Lab Invest* 1981;41(6):611-6.
28. Christensen AB, Groth S. Determination of <sup>99m</sup>Tc-DTPA clearance by a single plasma sample method. *Clin Physiol* 1986;6(6):579-88.
29. Martensson J, Groth S, Rehling M, Gref M. Chromium-51-EDTA clearance in adults with a single-plasma sample. *J Nucl Med* 1998;39(12):2131-7.
30. Rydstrom M, Tengstrom B, Cederquist I, Ahlmen J. Measurement of glomerular filtration rate by single-injection, single-sample techniques, using <sup>51</sup>Cr-EDTA or iohexol. *Scand J Urol Nephrol* 1995;29(2):135-9.
31. Fleming JS, Zivanovic MA, Blake GM, Burniston M, Cosgriff PS. Guidelines for the measurement of glomerular filtration rate using plasma sampling. *Nucl Med Commun* 2004;25(8):759-69.
32. Levey AS, Perrone RD, Madias NE. Serum creatinine and renal function. *Annu Rev Med* 1988;39:465-90.

33. Narayanan S, Appleton HD. Creatinine: a review. *Clin Chem* 1980;26(8):1119-26.
34. Shemesh O, Golbetz H, Kriss JP, Myers BD. Limitations of creatinine as a filtration marker in glomerulopathic patients. *Kidney Int* 1985; 28(5):830-8.
35. Levey AS. Measurement of renal function in chronic renal disease. *Kidney Int* 1990;38(1):167-84.
36. Kemperman FA, Surachno J, Krediet RT, Arisz L. Cimetidine improves prediction of the glomerular filtration rate by the Cockcroft-Gault formula in renal transplant recipients. *Transplantation* 2002;73(5):770-4.
37. Hilbrands LB, Artz MA, Wetzels JF, Koene RA. Cimetidine improves the reliability of creatinine as a marker of glomerular filtration. *Kidney Int* 1991;40(6):1171-6.
38. Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 1976;16(1):31-41.
39. Sokoll LJ, Russell RM, Sadowski JA, Morrow FD. Establishment of creatinine clearance reference values for older women. *Clin Chem* 1994;40(12):2276-81.
40. Nankivell BJ, Gruenewald SM, Allen RD, Chapman JR. Predicting glomerular filtration rate after kidney transplantation. *Transplantation* 1995;59(12):1683-9.
41. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999;130(6):461-70.
42. Clausen J. Proteins in normal cerebrospinal fluid not found in serum. *Proc Soc Exp Biol Med* 1961;107:170-2.
43. Butler EA, Flynn FV. The occurrence of post-gamma protein in urine: a new protein abnormality. *J Clin Pathol* 1961;14:172-8.
44. Grubb A, Lofberg H. Human gamma-trace, a basic microprotein: amino acid sequence and presence in the adenohypophysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79(9):3024-7.



45. Barrett AJ, Davies ME, Grubb A. The place of human gamma-trace (cystatin C) amongst the cysteine proteinase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;120(2):631-6.
46. Simonsen O, Grubb A, Thysell H. The blood serum concentration of cystatin C (gamma-trace) as a measure of the glomerular filtration rate. *Scand J Clin Lab Invest* 1985;45(2):97-101.
47. Grubb A, Lofberg H. Human gamma-trace. Structure, function and clinical use of concentration measurements. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1985;177:7-13.
48. Abrahamson M, Grubb A, Olafsson I, Lundwall A. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA coding for the precursor of the human cysteine proteinase inhibitor cystatin C. *FEBS Lett* 1987;216(2):229-33.
49. Abrahamson M, Olafsson I, Palsdottir A, Ulvsback M, Lundwall A, Jensson O, et al. Structure and expression of the human cystatin C gene. *Biochem J* 1990;268(2):287-94.
50. Turk V, Bode W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett* 1991;285(2):213-9.
51. Puente XS, Sanchez LM, Gutierrez-Fernandez A, Velasco G, Lopez-Otin C. A genomic view of the complexity of mammalian proteolytic systems. *Biochem Soc Trans* 2005;33(Pt 2):331-4.
52. Brown WM, Dziegielewska KM. Friends and relations of the cystatin superfamily--new members and their evolution. *Protein Sci* 1997;6(1):5-12.
53. Filler G, Bokenkamp A, Hofmann W, Le Bricon T, Martinez-Bru C, Grubb A. Cystatin C as a marker of GFR--history, indications, and future research. *Clin Biochem* 2005;38(1):1-8.
54. Janowski R, Kozak M, Jankowska E, Grzonka Z, Grubb A, Abrahamson M, et al. Human cystatin C, an amyloidogenic protein, dimerizes through three-dimensional domain swapping. *Nat Struct Biol* 2001;8(4):316-20.

55. Kaseda R, Iino N, Hosojima M, Takeda T, Hosaka K, Kobayashi A, et al. Megalin-mediated endocytosis of cystatin C in proximal tubule cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;357(4):1130-4.
56. Herget-Rosenthal S, van Wijk JA, Brocker-Preuss M, Bokenkamp A. Increased urinary cystatin C reflects structural and functional renal tubular impairment independent of glomerular filtration rate. *Clin Biochem* 2007;40(13-14):946-51.
57. Herget-Rosenthal S, Poppen D, Husing J, Marggraf G, Pietruck F, Jakob HG, et al. Prognostic value of tubular proteinuria and enzymuria in nonoliguric acute tubular necrosis. *Clin Chem* 2004;50(3):552-8.
58. Laterza OF, Price CP, Scott MG. Cystatin C: an improved estimator of glomerular filtration rate? *Clin Chem* 2002;48(5):699-707.
59. Pergande M, Jung K. Sandwich enzyme immunoassay of cystatin C in serum with commercially available antibodies. *Clin Chem* 1993;39(9):1885-90.
60. Kyhse-Andersen J, Schmidt C, Nordin G, Andersson B, Nilsson-Ehle P, Lindstrom V, et al. Serum cystatin C, determined by a rapid, automated particle-enhanced turbidimetric method, is a better marker than serum creatinine for glomerular filtration rate. *Clin Chem* 1994;40(10):1921-6.
61. Newman DJ, Thakkar H, Edwards RG, Wilkie M, White T, Grubb AO, et al. Serum cystatin C measured by automated immunoassay: a more sensitive marker of changes in GFR than serum creatinine. *Kidney Int* 1995;47(1):312-8.
62. Finney H, Newman DJ, Gruber W, Merle P, Price CP. Initial evaluation of cystatin C measurement by particle-enhanced immunonephelometry on the Behring nephelometer systems (BNA, BN II). *Clin Chem* 1997;43(6 Pt 1):1016-22.
63. Erlandsen EJ, Randers E, Kristensen JH. Evaluation of the Dade Behring N Latex Cystatin C assay on the Dade Behring Nephelometer II System. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59(1):1-8.
64. Kazama JJ, Kutsuwada K, Ataka K, Maruyama H, Gejyo F. Serum cystatin C reliably detects renal dysfunction in patients with various renal diseases. *Nephron* 2002;91(1):13-20.

65. Randers E, Erlandsen EJ, Pedersen OL, Hasling C, Danielsen H. Serum cystatin C as an endogenous parameter of the renal function in patients with normal to moderately impaired kidney function. *Clin Nephrol* 2000;54(3):203-9.
66. Erlandsen EJ, Randers E, Kristensen JH. Reference intervals for serum cystatin C and serum creatinine in adults. *Clin Chem Lab Med* 1998;36(6):393-7.
67. Keevil BG, Kilpatrick ES, Nichols SP, Maylor PW. Biological variation of cystatin C: implications for the assessment of glomerular filtration rate. *Clin Chem* 1998;44(7):1535-9.
68. Finney H, Newman DJ, Price CP. Adult reference ranges for serum cystatin C, creatinine and predicted creatinine clearance. *Ann Clin Biochem* 2000;37 ( Pt 1):49-59.
69. Knight EL, Verhave JC, Spiegelman D, Hillege HL, de Zeeuw D, Curhan GC, et al. Factors influencing serum cystatin C levels other than renal function and the impact on renal function measurement. *Kidney Int* 2004;65(4):1416-21.
70. Finney H, Newman DJ, Thakkar H, Fell JM, Price CP. Reference ranges for plasma cystatin C and creatinine measurements in premature infants, neonates, and older children. *Arch Dis Child* 2000;82(1):71-5.
71. Coll E, Botey A, Alvarez L, Poch E, Quinto L, Saurina A, et al. Serum cystatin C as a new marker for noninvasive estimation of glomerular filtration rate and as a marker for early renal impairment. *Am J Kidney Dis* 2000;36(1):29-34.
72. Herget-Rosenthal S, Feldkamp T, Volbracht L, Kribben A. Measurement of urinary cystatin C by particle-enhanced nephelometric immunoassay: precision, interferences, stability and reference range. *Ann Clin Biochem* 2004;41(Pt 2):111-8.
73. Jayagopal V, Keevil BG, Atkin SL, Jennings PE, Kilpatrick ES. Paradoxical changes in cystatin C and serum creatinine in patients with hypo- and hyperthyroidism. *Clin Chem* 2003;49(4):680-1.
74. Fricker M, Wiesli P, Brandle M, Schwegler B, Schmid C. Impact of thyroid dysfunction on serum cystatin C. *Kidney Int* 2003;63(5):1944-7.

75. Wiesli P, Schwegler B, Spinass GA, Schmid C. Serum cystatin C is sensitive to small changes in thyroid function. *Clin Chim Acta* 2003;338(1-2):87-90.
76. Villabona C, Sahun M, Roca M, Mora J, Gomez N, Gomez JM, et al. Blood volumes and renal function in overt and subclinical primary hypothyroidism. *Am J Med Sci* 1999;318(4):277-80.
77. den Hollander JG, Wulkan RW, Mantel MJ, Berghout A. Is cystatin C a marker of glomerular filtration rate in thyroid dysfunction? *Clin Chem* 2003;49(9):1558-9.
78. Bokenkamp A, Domanetzki M, Zinck R, Schumann G, Byrd D, Brodehl J. Cystatin C serum concentrations underestimate glomerular filtration rate in renal transplant recipients. *Clin Chem* 1999;45(10):1866-8.
79. Bokenkamp A, van Wijk JA, Lentze MJ, Stoffel-Wagner B. Effect of corticosteroid therapy on serum cystatin C and beta2-microglobulin concentrations. *Clin Chem* 2002;48(7):1123-6.
80. Risch L, Herklotz R, Blumberg A, Huber AR. Effects of glucocorticoid immunosuppression on serum cystatin C concentrations in renal transplant patients. *Clin Chem* 2001;47(11):2055-9.
81. Cimerman N, Brguljan PM, Krasovec M, Suskovic S, Kos J. Serum cystatin C, a potent inhibitor of cysteine proteinases, is elevated in asthmatic patients. *Clin Chim Acta* 2000;300(1-2):83-95.
82. Bjarnadottir M, Grubb A, Olafsson I. Promoter-mediated, dexamethasone-induced increase in cystatin C production by HeLa cells. *Scand J Clin Lab Invest* 1995;55(7):617-23.
83. Kos J, Stabuc B, Cimerman N, Brunner N. Serum cystatin C, a new marker of glomerular filtration rate, is increased during malignant progression. *Clin Chem* 1998;44(12):2556-7.
84. Kos J, Stabuc B, Schweiger A, Krasovec M, Cimerman N, Kopitar-Jerala N, et al. Cathepsins B, H, and L and their inhibitors stefin A and cystatin C in sera of melanoma patients. *Clin Cancer Res* 1997;3(10):1815-22.
85. Finney H, Williams AH, Price CP. Serum cystatin C in patients with myeloma. *Clin Chim Acta* 2001;309(1):1-6.

86. Lamb EJ, Stowe HJ, Simpson DE, Coakley AJ, Newman DJ, Leahy M. Diagnostic accuracy of cystatin C as a marker of kidney disease in patients with multiple myeloma: calculated glomerular filtration rate formulas are equally useful. *Clin Chem* 2004;50(10):1848-51.
87. Massey D. Commentary: clinical diagnostic use of cystatin C. *J Clin Lab Anal* 2004;18(1):55-60.
88. Dharnidharka VR, Kwon C, Stevens G. Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: a meta-analysis. *Am J Kidney Dis* 2002;40(2):221-6.
89. Oddoze C, Morange S, Portugal H, Berland Y, Dussol B. Cystatin C is not more sensitive than creatinine for detecting early renal impairment in patients with diabetes. *Am J Kidney Dis* 2001;38(2):310-6.
90. Schuck O, Teplan V, Jabor A, Stollova M, Skibova J. Glomerular filtration rate estimation in patients with advanced chronic renal insufficiency based on serum cystatin C levels. *Nephron Clin Pract* 2003;93(4):c146-51.
91. Delanaye P, Nellessen E, Cavalier E, Depas G, Grosch S, Defraigne JO, et al. Is cystatin C useful for the detection and the estimation of low glomerular filtration rate in heart transplant patients? *Transplantation* 2007;83(5):641-4.
92. Stickle D, Cole B, Hock K, Hruska KA, Scott MG. Correlation of plasma concentrations of cystatin C and creatinine to inulin clearance in a pediatric population. *Clin Chem* 1998;44(6 Pt 1):1334-8.
93. Mussap M, Dalla Vestra M, Fioretto P, Saller A, Varagnolo M, Nosadini R, et al. Cystatin C is a more sensitive marker than creatinine for the estimation of GFR in type 2 diabetic patients. *Kidney Int* 2002;61(4):1453-61.
94. Shimizu A, Horikoshi S, Rinnno H, Kobata M, Saito K, Tomino Y. Serum cystatin C may predict the early prognostic stages of patients with type 2 diabetic nephropathy. *J Clin Lab Anal* 2003;17(5):164-7.
95. Perkins BA, Nelson RG, Ostrander BE, Blouch KL, Krolewski AS, Myers BD, et al. Detection of renal function decline in patients with diabetes and normal or elevated GFR by serial measurements of serum cystatin C concentration: results of a 4-year follow-up study. *J Am Soc Nephrol* 2005;16(5):1404-12.

96. Fliser D, Ritz E. Serum cystatin C concentration as a marker of renal dysfunction in the elderly. *Am J Kidney Dis* 2001;37(1):79-83.
97. Burkhardt H, Bojarsky G, Gretz N, Gladisch R. Creatinine clearance, Cockcroft-Gault formula and cystatin C: estimators of true glomerular filtration rate in the elderly? *Gerontology* 2002;48(3):140-6.
98. O'Riordan SE, Webb MC, Stowe HJ, Simpson DE, Kandarpa M, Coakley AJ, et al. Cystatin C improves the detection of mild renal dysfunction in older patients. *Ann Clin Biochem* 2003;40(Pt 6):648-55.
99. Wasen E, Suominen P, Isoaho R, Mattila K, Virtanen A, Kivela SL, et al. Serum cystatin C as a marker of kidney dysfunction in an elderly population. *Clin Chem* 2002;48(7):1138-40.
100. Shlipak MG, Sarnak MJ, Katz R, Fried LF, Seliger SL, Newman AB, et al. Cystatin C and the risk of death and cardiovascular events among elderly persons. *N Engl J Med* 2005;352(20):2049-60.
101. Shlipak MG, Katz R, Sarnak MJ, Fried LF, Newman AB, Stehman-Breen C, et al. Cystatin C and prognosis for cardiovascular and kidney outcomes in elderly persons without chronic kidney disease. *Ann Intern Med* 2006;145(4):237-46.
102. Larsson A, Helmersson J, Hansson LO, Basu S. Increased serum cystatin C is associated with increased mortality in elderly men. *Scand J Clin Lab Invest* 2005;65(4):301-5.
103. Shlipak MG, Praught ML, Sarnak MJ. Update on cystatin C: new insights into the importance of mild kidney dysfunction. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006;15(3):270-5.
104. Bokenkamp A, Domanetzki M, Zinck R, Schumann G, Byrd D, Brodehl J. Cystatin C--a new marker of glomerular filtration rate in children independent of age and height. *Pediatrics* 1998;101(5):875-81.
105. Helin I, Axenram M, Grubb A. Serum cystatin C as a determinant of glomerular filtration rate in children. *Clin Nephrol* 1998;49(4):221-5.
106. Podracka L, Feber J, Lepage N, Filler G. Intra-individual variation of cystatin C and creatinine in pediatric solid organ transplant recipients. *Pediatr Transplant* 2005;9(1):28-32.

107. Woitas RP, Stoffel-Wagner B, Flommersfeld S, Poege U, Schiedermaier P, Klehr HU, et al. Correlation of serum concentrations of cystatin C and creatinine to inulin clearance in liver cirrhosis. *Clin Chem* 2000;46(5):712-5.
108. Orlando R, Mussap M, Plebani M, Piccoli P, De Martin S, Floreani M, et al. Diagnostic value of plasma cystatin C as a glomerular filtration marker in decompensated liver cirrhosis. *Clin Chem* 2002;48(6 Pt 1):850-8.
109. Leach TD, Kitiyakara C, Price CP, Stevens JM, Newman DJ. Prognostic significance of serum cystatin c concentrations in renal transplant recipients: 5-year follow-up. *Transplant Proc* 2002;34(4):1152-8.
110. Le Bricon T, Thervet E, Benlakehal M, Bousquet B, Legendre C, Erlich D. Changes in plasma cystatin C after renal transplantation and acute rejection in adults. *Clin Chem* 1999;45(12):2243-9.
111. Le Bricon T, Thervet E, Froissart M, Benlakehal M, Bousquet B, Legendre C, et al. Plasma cystatin C is superior to 24-h creatinine clearance and plasma creatinine for estimation of glomerular filtration rate 3 months after kidney transplantation. *Clin Chem* 2000;46(8 Pt 1):1206-7.
112. Risch L, Blumberg A, Huber A. Rapid and accurate assessment of glomerular filtration rate in patients with renal transplants using serum cystatin C. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14(8):1991-6.
113. Hoek FJ, Kemperman FA, Krediet RT. A comparison between cystatin C, plasma creatinine and the Cockcroft and Gault formula for the estimation of glomerular filtration rate. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18(10):2024-31.
114. Larsson A, Malm J, Grubb A, Hansson LO. Calculation of glomerular filtration rate expressed in mL/min from plasma cystatin C values in mg/L. *Scand J Clin Lab Invest* 2004;64(1):25-30.
115. Poge U, Gerhardt T, Stoffel-Wagner B, Klehr HU, Sauerbruch T, Woitas RP. Calculation of glomerular filtration rate based on cystatin C in cirrhotic patients. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21(3):660-4.
116. White C, Akbari A, Hussain N, Dinh L, Filler G, Lepage N, et al. Estimating glomerular filtration rate in kidney transplantation: a comparison between serum creatinine and cystatin C-based methods. *J Am Soc Nephrol* 2005;16(12):3763-70.

117. Davidson WD, Sackner MA. Simplification of the Anthrone Method for the Determination of Inulin in Clearance Studies. *J Lab Clin Med* 1963;62:351-6.
118. Levey AS. Use of glomerular filtration rate measurements to assess the progression of renal disease. *Semin Nephrol* 1989;9(4):370-9.
119. Curtis JJ, Laskow DA, Jones PA, Julian BA, Gaston RS, Luke RG. Captopril-induced fall in glomerular filtration rate in cyclosporine-treated hypertensive patients. *J Am Soc Nephrol* 1993;3(9):1570-4.
120. Groth S, Aasted M. <sup>51</sup>Cr-EDTA clearance determined by one plasma sample. *Clin Physiol* 1981;1(4):417-25.
121. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;1(8476):307-10.
122. Bland JM, Altman DG. Comparing methods of measurement: why plotting difference against standard method is misleading. *Lancet* 1995;346(8982):1085-7.
123. Bland JM, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. *Stat Methods Med Res* 1999;8(2):135-60.
124. Mantha S, Roizen MF, Fleisher LA, Thisted R, Foss J. Comparing methods of clinical measurement: reporting standards for bland and altman analysis. *Anesth Analg* 2000;90(3):593-602.
125. Du Bois D, Du Bois EF. A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. . *Arch Intern Med* 1916;17:863-871.
126. Davies DF, Shock NW. The variability of measurement of inulin and diodrast tests of kidney function. *J Clin Invest* 1950;29(5):491-5.
127. Brochner-Mortensen J, Rodbro P. Selection of routine method for determination of glomerular filtration rate in adult patients. *Scand J Clin Lab Invest* 1976;36(1):35-43.
128. Blake GM, Roe D, Lazarus CR. Long-term precision of glomerular filtration rate measurements using <sup>51</sup>Cr-EDTA plasma clearance. *Nucl Med Commun* 1997;18(8):776-84.



129. Grewal GS, Blake GM. Reference data for <sup>51</sup>Cr-EDTA measurements of the glomerular filtration rate derived from live kidney donors. *Nucl Med Commun* 2005;26(1):61-5.
130. Daniel JP, Chantrel F, Offner M, Moulin B, Hannedouche T. Comparison of cystatin C, creatinine and creatinine clearance vs. GFR for detection of renal failure in renal transplant patients. *Ren Fail* 2004;26(3):253-7.
131. Zahran A, Qureshi M, Shoker A. Comparison between creatinine and cystatin C-based GFR equations in renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22(9):2659-68.
132. White C, Akbari A, Hussain N, Dinh L, Filler G, Lepage N, et al. Chronic kidney disease stage in renal transplantation classification using cystatin C and creatinine-based equations. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22(10):3013-20.
133. Levey AS, Greene T, Schluchter MD, Cleary PA, Teschan PE, Lorenz RA, et al. Glomerular filtration rate measurements in clinical trials. Modification of Diet in Renal Disease Study Group and the Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *J Am Soc Nephrol* 1993;4(5):1159-71.
134. Stevens LA, Levey AS. Clinical implications of estimating equations for glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2004;141(12):959-61.