

Letícia Aparecida Lopes Neri

**Validação do método imunonefelométrico para dosagem
de cistatina C, como marcador de função renal**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Mestre em Ciências

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

São Paulo

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Neri, Leticia Aparecida Lopes

Validação do método imunonefelométrico para dosagem de cistatina C, como
marcador de função renal / Leticia Aparecida Lopes Néri. -- São Paulo, 2007.

Dissertação(mestrado)--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.Nefelometria e
turbidimetria 4.Testes de função renal 5.Transplante de rim 6.Imunossuppressores

USP/FM/SBD-406/07

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus.

Aos meus pais, João Evangelista Neri e Maria Aparecida Lopes Neri, meus pais, que sempre me incentivaram, protegeram e ensinaram a importância da verdade, da honestidade e da amizade para uma vida feliz.

Aos meus irmãos Lenyrcia de Cassya Lopes Neri e João Evangelista Neri Júnior pelo apoio e amizade sempre.

A *Denis Geraldini Pio* pela compreensão, companheirismo, carinho e incentivo nos momentos decisivos desta tese.

Ao meu orientador, *Prof. Dr. Elias David-Neto*, pelo apoio durante o desenvolvimento deste trabalho, pelas lições e treinamentos que tanto me incentivaram o espírito inquiridor e a aprimorar minhas atividades acadêmicas.

Aos amigos *Prof. Dr. Nairo Massakazu Sumita* e *Dra. Maria Elizabete Mendes*, Diretor e Chefe do Laboratório de Bioquímica Clínica da Divisão de Laboratório Central (LIM 03) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo incentivo em toda a minha carreira e apoio integral neste estudo.

Ao *Prof. Dr. Marcelo Burattini*, Diretor da Divisão de Laboratório Central-LIM 03 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com admiração pelo seu trabalho administrativo e incentivo.

Ao Prof. Dr. Rui Toledo, coordenador da pós-graduação na nefrologia, pelo apoio e oportunidade.

Aos meus amigos *Paschoalina Romano, Izabel de Fátima Luiz Patrão Miranda, Vânia da Rocha Morsoleto, Lucimara de Lourdes Cazott do Nascimento, Guiomar Leite de Assis, Atecla Nunciatta Lopes Alves, Pérsio de Almeida Ebner, Alexandre Fortini, e Roberto Carlos Dionísio Novais* pelo carinho e pelos ótimos momentos de convívio. A ajuda de vocês fez com que este trabalho ficasse melhor e fosse de fato concluído.

Aos médicos da Unidade de Transplante Renal, principalmente, as minhas amigas, *Elisângela Santos Prado Andrade e Flávia Silva Reis Medeiros*, pela competência profissional, apoio técnico e por estarem sempre dispostas a ouvir, tirar dúvidas e ajudar. Sem elas esta tese não existiria.

Ao Grupo de Pesquisa Clínica da Unidade de Transplante Renal, extremamente profissional e dedicado na condução de estudos de grande relevância científica. Meu agradecimento sincero ao Prof. Dr. *Elias* (chefe), às farmacêuticas, *Mellissa, Kelly e Luciana*, à enfermeira, *Fabiana*, ao auxiliar administrativo, *Rafael* e a auxiliar de enfermagem *Margarete*, pessoas maravilhosas, que através de nossa amizade fizeram com que eu me sentisse inserida na equipe. Esta experiência multiprofissional foi única.

Aos amigos *Maria José, Vilma, Ricardo Alexandre, Ricardo Araújo, Márcio Garcia, Cecília, Cida, Andréa e Ellen* que me apoiaram quando existia sobrecarga de trabalho entre minhas atividades profissionais e acadêmicas.

As minhas amigas *Helena Panteliou Lima Valassi, Vanessa Sasaki Seki Kaio, Flávia Cristina Kinskowski, Sheila Cristina Ambruster Ivers e Tatiana Sofia Dojas* que com compreensão me ouviram nos momentos de cansaço e me entenderam quando eu não me dedicava de forma adequada à nossa amizade.

Ao *Setor de Imunologia* da Divisão de Laboratório Central, onde encontrei mais amigos que me apoiaram e incentivaram. Meus agradecimentos pela profunda alegria que foi o convívio com vocês.

Aos funcionários da Bioquímica Clínica da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da FMUSP, pela dedicação, competência e motivação a cada novo desafio.

Às amigas *Francisca* e *Phâmela* do Disk-Lab da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da FMUSP, sempre prontas a ajudar nas horas mais complicadas. Francisca é uma pessoa com coração enorme, surpreendente e de alegria contagiante.

Às funcionárias do setor de Pós-graduação da Nefrologia do Hospital das Clínicas da FMUSP por sua dedicação, atenção e gentileza. Deixo aqui minha admiração.

Aos funcionários da Biblioteca Central da Faculdade de Medicina da USP, pelo carinho e dedicação com que realizam suas funções, obrigado pelo apoio e gentileza.

À Rosely pela revisão de língua portuguesa desta tese e à Adrinana pela ajuda estatística.

Ao Serviço de Documentação Científica da FMUSP e ao Sr. *Josué Moreira de Souza* pela diagramação, edição e impressão dos exemplares desta tese e ajuda constante.

Aos pacientes que participaram deste estudo pelo desprendimento, confiança e senso humanitário para ajudar o próximo.

Aos amigos sempre presentes na minha vida, nas horas alegres e tristes: *Rosemeire, Samuel, Glória, Ana Stela, Lídia, Neide, Cyntia, Leila Borracha, Regina, Clarinha, Ângela, Márcio, Neide Abe, Virgínia, Lúcia, Mônica, Lia, Luiz Mário, Nilcéia, Cláudia*, e tantos outros que completam meu ciclo de amizades sinceras.

"Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível"

Francisco de Assis

À minha família por tanto amor.

Sumário

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Gráficos

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Cistatina C.....	5
1.1.2 Variáveis clínicas e laboratoriais.....	7
1.1.3 Determinação laboratorial da cistatina C	8
1.1.4 Cistatina C como marcador da função renal.....	10
1.1.5 Validação Analítica para dosagem de cistatina C.....	21
2. OBJETIVOS.....	23
Primário.....	24
Secundário.....	24
3. MÉTODOS	25
3.1 Técnicas das determinações laboratoriais	29
3.1.1 Dosagem de creatinina sérica	29
3.1.2 Dosagem de cistatina C.....	30
3.2 Fórmulas para estimativa da filtração glomerular.....	31
3.3 Validação da metodologia nefelométrica para dosagem da cistatina C	32
4. TESTES ESTATÍSTICOS.....	37
5. RESULTADOS	39
5.1 Creatinina sérica	40

5.2	Fase A: Validação da cistatina C	40
5.2.1	Precisão.....	40
5.2.2	Limite de Detecção e Sensibilidade Analítica	41
5.2.3	Estabilidade da amostra	42
5.2.4	Recuperação	43
5.2.5	Controle da Qualidade.....	44
5.3	Resultados – FASE B.....	46
6.	DISCUSSÃO.....	60
7.	CONCLUSÕES	67
8.	REFERÊNCIAS.....	69

Lista de Figuras

- Figura 1 - Níveis de sensibilidade e especificidade entre as determinações séricas da cistatina C e da creatinina11
- Figura 2 - Mecanismo de ação do conjunto diagnóstico nefelométrico para dosagem de cistatina C30

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Distribuição dos pacientes em grupos, segundo esquema de medicação imunossupressora.	28
Tabela 2 -	Resultados obtidos para avaliação da precisão intra-ensaio e interensaio (CV%) nos dois níveis de controle e soro de pacientes (n = 30)	41
Tabela 3 -	Limite de detecção e sensibilidade analítica (n=10).....	41
Tabela 4 -	Percentual de perda da concentração de cistatina C em relação ao tempo 0 (estabilidade da amostra a -20°C)	42
Tabela 5 -	Percentual de perda da concentração de cistatina C em relação ao tempo 0. Estabilidade da amostra sob refrigeração (2 a 8°C).....	43
Tabela 6 -	Percentual de perda da concentração de cistatina C em relação ao tempo 0. Estabilidade da amostra à temperatura ambiente (22°C)	43
Tabela 7 -	Teste de recuperação após adição de controle comercial de concentração conhecida níveis 1 e 2 a homogeneizado de amostras.....	44
Tabela 8 -	Distribuição dos pacientes conforme esquema imunossupressor	46
Tabela 9 -	Dados Demográficos.....	47
Tabela 10 -	Doses de Imunossupressão	48
Tabela 11 -	Medidas de Filtração Glomerular	49
Tabela 12 -	Correlação entre RFG estimado por equação de Cockcroft-Gault (CG) e os marcadores creatinina e cistatina C	50
Tabela 13 -	Correlação entre RFG estimado por equação de Nankivell (NK) e os marcadores creatinina e cistatina C	51
Tabela 14 -	Correlação entre RFG estimado por equação de MDRD e os marcadores creatinina e cistatina C. Análise de Regressão Linear.....	51

Lista de Gráficos

Gráfico 1 -	Controle da Qualidade Nível 1 dosado paralelamente a cada lote de amostras	45
Gráfico 2 -	Controle da Qualidade Nível 2 dosado paralelamente a cada lote de amostras.	45
Gráfico 3 -	Correlação entre Creatinina Sérica e Cistatina C de acordo com os grupos de estudo	52
Gráfico 4 -	Correlação entre Nankivell e Creatinina Sérica de acordo com os grupos de estudo	53
Gráfico 5 -	Correlação entre MDRD e creatinina sérica de acordo com os grupos de estudo	54
Gráfico 6 -	Correlação entre Cockroft Gault e creatinina sérica de acordo com os grupos de estudo	55
Gráfico 7 -	Correlação entre Nankivell e cistatina C de acordo com os grupos de estudo	56
Gráfico 8 -	Correlação entre cistatina C e MDRD de acordo com os grupos de estudo	57
Gráfico 9 -	Correlação entre cistatina C e Cockroft Gault 1,73 m ² de acordo com os grupos de estudo.....	58
Gráfico 10 a -	Correlação entre creatinina sérica e as equações para estimativa de RFG, NK, MDRD e CG nos grupos de imunossupressão.....	59
Gráfico 10 b -	Correlação entre cistatina C sérica e as equações para estimativa de RFG, NK, MDRD e CG nos grupos de imunossupressão.....	59

Resumo

Neri LAL. *Validação do método imunonefelométrico para dosagem de cistatina C, como marcador de função renal* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 76p.

A cistatina C sérica tem sido apontada como um marcador de filtração glomerular. Neste trabalho realizamos a validação de um método específico e automatizado, a imunonefelometria, mensurando os níveis séricos de cistatina C através do nefelômetro da empresa Behring (BN II). O ensaio perfaz o intervalo de referência de 0.23-7.25 mg/L, até sete vezes acima dos limites considerados normais. A imprecisão intra e interensaio foram de 8,73% and 5,38% , respectively. A recuperação analítica de cistatina C após adição de controle foi entre 86,7 % e 98% (média 92,3%). A estabilidade da cistatina C a temperatura ambiente, sob refrigeração e sob congelamento foi testada. A perda mais significativa foi encontrada nas amostras armazenadas sob temperatura ambiente, onde foi perdido até 10% da concentração inicial. Nós encontramos CV de 14,79 % para sensibilidade analítica. Durante todo o processo nós comparamos os resultados com o controle de qualidade e obtivemos bons resultados. Depois destes testes, nós comparamos as correlações em 3 grupos de pacientes transplantados renais sob diferentes esquemas de imunossupressão (n=197) [azatioprina (n=36), micofenolato mofetil (n=131) ou sirolimus (n=30)], entre as equações de estimativa de filtração glomerular(Cockcroft Gault, Nankivell e MDRD) e cistatina C sérica ou creatinina sérica. Nós concluímos que o ensaio nefelométrico cistatina C pode perfeitamente ser adequado à nossa rotina laboratorial e as correlações entre creatinina sérica e as diferentes equações de estimativa de filtração glomerular são melhores do que quando comparamos as mesmas à cistatina C nos 3 grupos independentemente da terapia imunossupressora utilizada.

Descritores: 1.Cistatinas 2.Taxa de filtração glomerular 3.Nefelometria e turbidimetria 4.Teste de função renal 5.Transplante de rim 6.Imunossupressores

Summary

Neri LAL. *Validation of cystatin C measurement by particle-enhanced immunonephelometry as renal function marker* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2007. 76p.

Serum cystatin C has been suggested as a marker of glomerular filtration rate (GFR). We describe a validation of an automated and rapid particle-enhanced nephelometric immunoassay (PENIA) for measuring serum cystatin C on the Behring nephelometer (BN II). The assay covers the range 0.23-7.25 mg/L, up to seven times the upper limit of normal. The intra- and interassay imprecision are 8,73% and 5,38% , respectively. The analytical recovery by cystatin C addition between 86,7% and 98% (mean 92,3%). The stability of cystatin C room temperature, refrigerator temperature and frozen temperature was tested. The higher loss was when we stored sample in a room temperature, when we can lose up to 10% of initial concentration. We found CV of 14,79 % for analytical sensitivity. During all the process we compare the results with a quality control and we obtained good results. After this validation, we have compared the correlation, in 3 different patient groups after renal transplant (n=197) were using different immunosuppressors [azathioprine (n=36), mycophenolic acid (n=131) or sirolimus (n=30)], between glomerular filtration equations (Cockcroft Gault, Nankivell and MDRD) and cystatin C or creatinine serum levels. We concluded cystatin C assay may be perfectly used in our laboratory and the correlation between serum creatinine and glomerular filtration equations are better than cystatin C at the same groups independent of immunosuppressor therapy.

Descriptors: 1.Cystatins 2.Glomerular filtration rate 3.Nephelometry and turbidimetry 4.Renal function tests 5.Kidney transplantation 6.Immunosuppressor

1. INTRODUÇÃO

A determinação do ritmo de filtração glomerular (RFG) é um importante parâmetro para a avaliação da função renal em pacientes com doença renal crônica e transplante renal. A função renal ao final do primeiro ano após o transplante em receptores de transplante renal demonstrou ser um preditor de sobrevida tardia do enxerto(1).

A determinação do ritmo de filtração glomerular é realizada através da depuração plasmática de alguns compostos endógenos ou exógenos pelos rins. A depuração plasmática de uma substância é definida como a quantidade de plasma depurada dessa substância por unidade de tempo (2).

A medida da depuração de inulina, um polímero da frutose com peso molecular de 5.200 dáltons e inerte ao túbulo, é considerada como método padrão-ouro para avaliação da RFG. Entretanto, seu uso clínico apresenta limitações, em função da necessidade de infusão venosa contínua do marcador e da indisponibilidade de um método laboratorial simples e prático para dosagem desta substância (2).

Os resultados de depuração utilizando isótopos radioativos, tais como ⁵¹Cr-EDTA ou DTPA, ou utilizando contrastes radiológicos, tais como Iotalamato ou Iohexol, apresentam boa correlação com a inulina, porém estão disponíveis em poucos centros hospitalares (2).

Estes métodos permitem a determinação direta do RFG e avaliam a função renal de forma mais fidedigna. Entretanto, estas metodologias são complexas e de baixa praticidade, de maior custo, mais demoradas e apresentam maior dificuldade técnica em sua realização do que os marcadores endógenos (3).

Os marcadores endógenos são mais rápidos e práticos, quando comparados às determinações diretas de RFG, e, por isso, amplamente empregados, entretanto apresentam limitações, estão sujeitos a erros e falta de precisão.

A dosagem de creatinina e a depuração urinária da creatinina são os métodos mais freqüentemente utilizados na prática clínica para se estimar a função renal.

A creatinina é o produto final do metabolismo da creatina e fosfocreatina musculares, tem concentração plasmática relativamente estável por ser uma proteína de baixo peso molecular. A creatinina é livremente filtrada pelo glomérulo, sendo que a medida de sua depuração apresenta boa correlação com o RFG (2).

Entretanto, quando se observa uma redução gradativa do RFG, a creatinina passa a ser secretada pelos túbulos proximais em proporções maiores que as habituais, alcançando valores de até 35% do total de creatinina excretada na urina. Nesses casos, a medida da depuração de creatinina pode superestimar o RFG em até 50% (4).

Nos pacientes com filtração inferior a 80mL/min/1,73m², a dosagem da creatinina sérica (SCr) tem baixa sensibilidade na detecção de variações

no RFG, conforme demonstrado por Levey e col., em 1990, ao comparar os resultados da depuração por inulina e creatinina sérica (4). Uma vez que pacientes transplantados renais usualmente apresentam filtração glomerular abaixo de 80mL/min/1,73m², a creatinina é pouco sensível para detectar pequenas mudanças no RFG nesta população.

A medida da depuração de creatinina é o método mais freqüentemente utilizado na prática clínica para determinação da TFG. A creatinina é o produto final do metabolismo da creatina, e tem concentração plasmática relativamente estável.

A creatinina é livremente filtrada pelo glomérulo, sendo que, a medida de sua depuração apresenta boa correlação com a TFG (2). Entretanto, quando se observa uma redução gradativa da TFG, a creatinina passa a ser secretada pelos túbulos proximais em proporções maiores que as habituais, alcançando valores de até 35 % do total de creatinina excretada na urina. Nesses casos, a medida da depuração de creatinina pode superestimar a TFG em até 50% (4).

Alguns fatores podem dificultar a interpretação dos resultados, bem como falsear o cálculo da depuração. Dentre estes podemos citar: o volume de massa muscular, a ingesta protéica, o fluxo plasmático renal, a secreção tubular da creatinina, o estado de hidratação do paciente, a prática de exercício físico e a interferência de cromógenos inespecíficos na reação de Jaffé (5). Outras variáveis pré-analíticas podem induzir a erros na medida da depuração de creatinina.

O sexo, a idade e o volume da massa muscular têm influência direta na concentração plasmática da creatinina, dificultando a avaliação do RFG através da simples medida da SCr (5).

Apesar de suas limitações, a creatinina sérica ainda é o marcador mais utilizado para estimar a função renal por ser acessível na maioria dos centros, com técnica simples, rápida e de baixo custo. A medida da depuração renal de creatinina também está sujeita a erros, devido à necessidade da coleta de amostra urinária, passível de perdas de volume ou esvaziamento incompleto da bexiga, além do efeito de secreção tubular da creatinina que pode superestimar a filtração glomerular (6-11).

1.1 Cistatina C

A introdução de um marcador mais sensível poderia favorecer o diagnóstico precoce da injúria renal, possibilitando condutas terapêuticas mais eficientes que possam aumentar a sobrevida do órgão com disfunção.

Desde 1985, vários estudos têm observado a relação entre a cistatina C e o RFG em diversas populações, inclusive receptores de transplante renal, e têm apontado a cistatina C como marcador de função renal superior ou, ao menos, igual à creatinina sérica, inclusive quando se avalia pacientes receptores de enxerto renal (12-14).

A cistatina C é uma proteína inibidora das proteases e pode ser mensurada no soro ou plasma humano. As proteinases ou proteases são

enzimas cuja atividade é regulada por seus inibidores, dentre eles a cistatina C, e estão envolvidas no processo de degradação protéica intra e extracelular e em uma variedade de reações metabólicas (15).

A cistatina C, também conhecida como traço gama e pós-gama-globulina, é uma proteína não-glicada, de baixo peso molecular (13,36 kDa), produzida de forma contínua e estável por todas as células nucleadas, com elevada concentração a nível extracelular e com importante atividade antiviral (16-18). A cistatina C é filtrada livremente pelo glomérulo renal, sendo a seguir reabsorvida, catabolizada e degradada a peptídeos menores e seus aminoácidos constituintes, pelas células do túbulo proximal (19).

Os principais atributos da cistatina C, como marcador bioquímico para avaliar a filtração glomerular, são o pequeno tamanho e o alto ponto isoelétrico de 9,3, características estas que facilitam a filtração através da membrana glomerular (20). Assim, a concentração sérica dependerá quase que exclusivamente da capacidade de filtração glomerular.

O gene responsável pela síntese de cistatina C está localizado no cromossomo 20 (18). A cistatina C representa 2 a 4% das proteínas existentes no líquido cefalo-raquidiano, sendo esta concentração cinco vezes maior que no soro. A sua presença também foi detectada na saliva, no esperma, no citoplasma dos neurônios, na medular da adrenal, na glândula tireóide, na pituitária anterior e nas células do pâncreas (19).

1.1.2 Variáveis clínicas e laboratoriais

Diferentemente da dosagem da uréia e creatinina, a concentração sérica da cistatina C não sofre influência do volume da massa muscular, do sexo ou da alimentação. Após um ano de idade a concentração de cistatina C torna-se estável. Estudos em populações pediátricas ainda são escassos, sendo algumas referências contraditórias em relação à viabilidade de utilização deste marcador para avaliação da função renal em crianças. No entanto, em crianças, a determinação de cistatina C parece ser pelo menos equivalente à creatinina sérica (21).

Sua produção parece não ser afetada por processos inflamatórios ou estados febris (2, 22, 23).

Entretanto, um estudo recente (n=8058), utilizando análise multivariada, demonstrou que os níveis séricos de cistatina C podem ser influenciados por múltiplos fatores independentes da função renal. Os participantes deste estudo eram incluídos de acordo com os dados coletados no grupo de prevenção de estágio final da doença renal e vascular (coorte estudada pelo mesmo autor). Nesta população foi verificado que o hábito de fumar e o aumento dos níveis séricos de proteína C reativa não estão associados com a elevação de concentração sérica de cistatina C, após ajuste através da depuração de creatinina, sem no entanto se correlacionar com prejuízo na função renal (24).

A produção de cistatina C eleva-se sobre influência de altas doses de glicocorticóides, bem como nos casos de disfunção tireoidiana. Os níveis de cistatina C são mais baixos no hipotireoidismo e mais altos no hipertireoidismo quando comparados a indivíduos eutireoidianos (20).

1.1.3 Determinação laboratorial da cistatina C

A amostra de soro pode ser armazenada a 4°C ou congelada durante 6 meses sem perda apreciável na concentração da cistatina C. No liquor esta proteína pode ser degradada rapidamente, possivelmente pela ação das serinas proteases produzidas por microrganismos contaminantes, ou liberação das enzimas dos granulócitos durante o processo inflamatório (25).

A dosagem no plasma heparinizado também é adequada. A turbidez da amostra pode prejudicar o ensaio, tanto na amostra de plasma quanto no soro, por tratar-se de fator interferente tanto para a nefelometria quanto para a turbidimetria.

A dosagem na urina não fornece informações úteis devido à baixa concentração urinária. Tal fato decorre do processo de reabsorção pelas células do túbulo proximal e de provável degradação por enzimas urinárias. A dosagem de cistatina C urinária não pode ser utilizada na avaliação da RFG, ao contrário da depuração renal de creatinina (26). Entretanto, em situações patológicas, a excreção urinária das proteínas com baixo peso molecular, como a cistatina C, tem sido descrita como um bom preditor da severidade da necrose tubular aguda (27).

Várias metodologias já foram empregadas para determinação da cistatina C, tais como: enzimaímunoensaio (EIA), radioímunoensaio (RIA), fluoroímunoensaio e imunodifusão radial simples (RID), porém ainda não estão adequadamente padronizadas (28).

O primeiro ensaio para quantificar a cistatina C foi o RIA, em 1979, e tinha como limite de detecção a concentração de 30 µg/L, nível este

suficiente para detectar a cistatina C no soro de indivíduos saudáveis. Posteriormente, novas técnicas foram desenvolvidas, alcançando limites de detecção entre 0,13 e 0,19 µg/L (29, 30).

Recentemente, métodos imunológicos baseados na turbidimetria e nefelometria, mais simples, precisos e rápidos, substituíram as técnicas antigas. Esses métodos, além de requerer pequena quantidade da amostra, permitiram rapidez, maior precisão e possibilidade de automação.

A imprecisão analítica da determinação sérica de cistatina C foi estimada em 1,2 e 5,5% (coeficiente de variação interensaio), para concentrações de 5,28 e 0,97 mg/L, respectivamente, por ensaio imunoturbidimétrico (31).

A variabilidade biológica intra-individual (CVi) e interindividual (CVg), definida como índice de individualidade ($II = CVi/CVg$), fornece informações relevantes para escolha de um ensaio laboratorial. Segundo Harris et al. (1974), a utilização de valores de referência, baseados em dados populacionais, são de valor limitado na detecção de resultados incomuns para um indivíduo particular, quando um índice de individualidade de um ensaio é menor que 0,6 (32).

Segundo Kilpatrick et al. as variações interindividuais da cistatina C (25%) são significativamente menores que as da creatinina sérica (93%), no entanto a variação intra-individual da cistatina C é de 75%, enquanto a variação intra-individual da creatinina sérica é de 7% (n=12). Os autores concluem que a cistatina C é um marcador de função renal potencialmente melhor que a creatinina sérica na detecção de pequenas perdas de função

renal, mas a creatinina sérica ainda é o melhor marcador de função quando se trata de mudanças de taxa filtração glomerular em indivíduos com função renal já estabilizada (33).

No entanto, quando o índice de individualidade é maior ou igual a 1,4, a variação de um indivíduo particular estará próxima à dos limites de valores referências populacionais, facilitando o uso diagnóstico desse marcador (33).

Keevil et al. num estudo sobre a variabilidade biológica, encontraram valores para o índice de individualidade de 1,64 e 0,27 para cistatina C e creatinina, respectivamente (33).

1.1.4 Cistatina C como marcador da função renal

Vários estudos clínicos têm avaliado a cistatina C como marcador da função renal. Coll et al. comparando a depuração da creatinina e cistatina C, com a medida direta do RFG por radioisótopos, encontraram sensibilidade de 95% (versus 87% da creatinina sérica) e especificidade de 100% na detecção de reduções do RFG. Relataram ainda que os níveis de cistatina C se elevaram acima do valor normal, mais precocemente que a creatinina sérica, nos pacientes com disfunção renal (34).

Risch et al. compararam a cistatina C, creatinina sérica, β 2-microglobulina e a depuração de creatinina em 30 pacientes transplantados renais estáveis e determinaram o RFG por ^{125}I -iothalamato. A melhor correlação foi encontrada entre ^{125}I -iothalamato e cistatina C ($r=0,83$). Para a depuração da creatinina, a correlação foi de 0,67; para a β 2-microglobulina, 0,58; e para a

creatinina sérica, 0,57. Os autores observaram maior variabilidade para a cistatina C quando comparada à creatinina sérica, o que poderia refletir uma maior sensibilidade da cistatina C em detectar pequenas mudanças no RFG, principalmente nos pacientes com insuficiência renal leve (35).

Randers et al. encontraram maior sensibilidade e especificidade da cistatina C em relação à creatinina sérica, na detecção de reduções moderadas do RFG em diversas doenças renais (figura 1) (13).

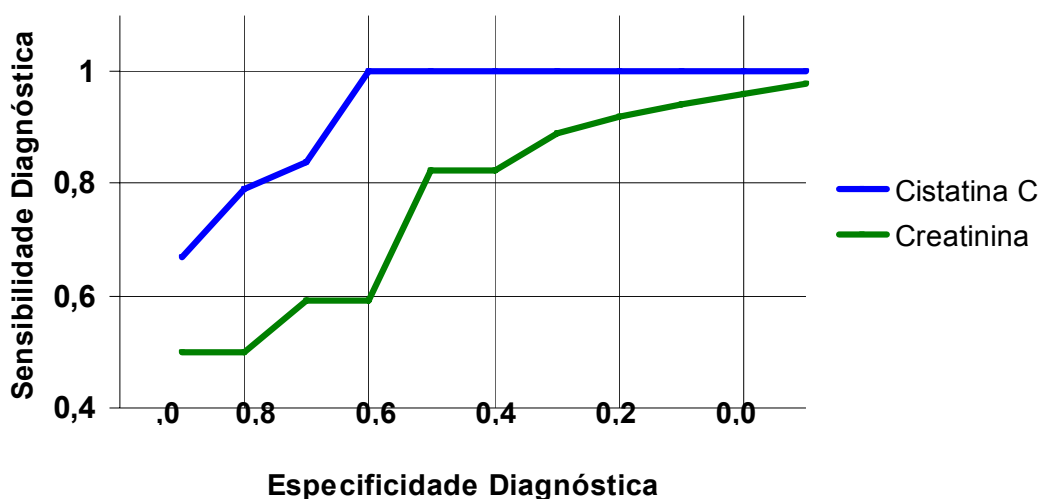


Figura 1 - Níveis de sensibilidade e especificidade entre as determinações séricas da cistatina C e da creatinina (adaptados de Burtis e Ashwood, 1999)

Rosenthal et al. verificaram que a cistatina C foi tão sensível quanto à depuração da creatinina, sem os inconvenientes gerados pela coleta de urina 24 horas (27). Os mesmos resultados foram obtidos por Finney et al. (23).

A deficiência de cistatina C em humanos foi descrita quando relacionada à aterosclerose e aneurisma de aorta. Na doença de Kawasaki tem sido descrita maior atividade de protease que poderia ser conseqüente a uma deficiência do inibidor de protease cistatina C. Os autores deste trabalho investigaram o nível sérico de cistatina C na doença de Kawasaki e verificaram que, ao comparar as dosagens séricas destes pacientes com controles normais, aqueles com doença de Kawasaki apresentavam níveis séricos de cistatina C significativamente inferiores (36).

Fricke et al. avaliaram o impacto no nível sérico da cistatina C em pacientes com disfunção tireoidiana. Diferentemente da creatinina sérica, cujos níveis estão aumentados no hipotireoidismo e reduzidos no hipertireoidismo, os autores encontraram valores mais elevados de cistatina C no hipertireoidismo (de $1,32 \pm 0,17$ mg/L para $0,95 \pm 0,19$ mg/L com a recuperação do estado eutireóideo) e mais baixos no hipotireoidismo (de $0,84 \pm 0,17$ mg/L para $1,1 \pm 0,28$ mg/L com a recuperação do estado eutireóideo). Acredita-se que a influência dos hormônios tireoidianos sobre a cistatina C altere sua produção, seja em termos de mudanças no ritmo de produção celular ou metabolismo das células para produzirem cistatina C (37).

Alguns grupos como crianças, idosos e pacientes com redução do volume de massa muscular se beneficiam ao utilizar a cistatina C como marcador para avaliar o RFG. A utilidade deste novo marcador de função renal na gravidez é duvidosa, uma vez que o mesmo marcador poderia ser ferramenta útil na detecção precoce de pré-eclampsia (20).

O'Riordan et al. estudaram a adequação da creatinina sérica e da depuração de creatinina em relação à dosagem sérica da cistatina C em população idosa (n=53). A depuração por ^{51}Cr - EDTA foi utilizada como método de referência de RFG. Os autores concluíram que a cistatina C nesta população seria o marcador de função renal de escolha (38).

Outra utilidade deste marcador, além de avaliação da função renal, seria como um forte preditor de risco de morte e eventos cardiovasculares na população idosa (39).

A cistatina C também tem sido estudada como marcador de função renal em pacientes cirróticos. Os erros na estimativa da filtração glomerular pela creatinina sérica ou pela depuração da creatinina que ocorrem, devem-se à reduzida massa muscular, superestimando a função renal ou por coleta inadequada de urina (13).

Leach et al. avaliaram o valor prognóstico da medida da cistatina C em 21 pacientes transplantados renais. Foram coletadas amostras de sangue para medida de cistatina C e creatinina imediatamente antes da cirurgia, diariamente até a alta da unidade de transplante, e durante o seguimento destes pacientes por 5 anos. Na avaliação da sobrevida do enxerto em um ano, para o valor de corte de cistatina C sérica inferior a 3,24 mg/dL, a sobrevida foi de 100%, comparado com 62% para valores acima. Na avaliação de três anos, a sobrevida foi de 100% para valores abaixo, contra 54% para valores acima do ponto de corte. Aos cinco anos, os mesmos resultados foram de 88% e 46%, respectivamente (30).

O estudo indicou ainda que, diferentemente da S_{Cr}, a cistatina C sérica não é alterada por hemodiálise e, por esta razão, poderia ser utilizada no monitoramento da recuperação da função do enxerto nos pacientes que necessitam de diálise no pós-operatório. No entanto, os autores ressaltam o pequeno número de pacientes envolvidos neste estudo e alertam para a necessidade de novos trabalhos para confirmar o valor preditivo da cistatina C na evolução pós-transplante (40).

Thervet et al. conduziram estudo prospectivo com 30 pacientes receptores de enxerto renal, para avaliar a cistatina C como marcador de função renal no pós-operatório, especialmente naqueles que evoluíram com função retardada do enxerto ou *delayed graft function* (DGF). A função renal foi avaliada diariamente com creatinina plasmática, cistatina C e depuração de creatinina estimada pela fórmula de Cockcroft-Gault. A DGF foi observada em 14 pacientes nos quais as mudanças diárias nas medidas de creatinina e cistatina C foram significativamente maiores em relação aos pacientes sem este evento ($p < 0,01$). O tempo médio após transplante para queda espontânea de cistatina C foi de $14,8 \pm 5,5$ dias, enquanto a creatinina foi de $18,8 \pm 7,1$ dias com $p < 0,002$ (30).

Mussap et al. avaliaram a cistatina C em 52 pacientes com diabetes mellitus tipo II e estimaram o RFG através da depuração de $^{51}\text{Cr-EDTA}$. A cistatina C apresentou maior sensibilidade (90%) quando comparada à creatinina sérica (77%) ou à fórmula de Cockcroft-Gault (85%), em discriminar pacientes com RFG normal ($>80\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$), daqueles com RFG reduzida ($<80\text{mL}/\text{min}/\text{m}^2$). A correlação entre cistatina C e RFG foi

significativamente melhor ($r=0,84$; $p<0,0001$, 95% de IC) que entre creatinina sérica e RFG ($r=0,65$; $p<0,0001$, 95% de IC) (3).

Oddoze et al. avaliaram a cistatina C em 49 pacientes com diagnóstico de diabetes mellitus, estáveis, dos quais 15 eram dependentes de insulina e 34 não dependentes (41). A RFG foi determinada por $^{51}\text{Cr-EDTA}$, utilizando como método de avaliação a sensibilidade, correlação com RFG e curva ROC. Os autores concluíram que a cistatina C não é mais sensível para detectar disfunção renal precoce quando comparada à creatinina ou à $\beta 2$ -microglobulina. Os três marcadores tiveram semelhante correlação com RFG ($p<0,001$) (41). Este foi um dos poucos trabalhos que não apontou a superioridade da cistatina C como marcador de função renal. No entanto, vale ressaltar que 27 dos 49 pacientes incluídos tinham RFG > 80mL/min.

Strevens et al. estudaram a aplicação da cistatina C como marcador de função renal em gestantes no final da gestação saudáveis ou com pré-eclâmpsia. Utilizando o método imunoturbidimétrico encontraram valores séricos de 0,56 -1,58 mg/dL em gestantes saudáveis e de 1,10 – 2,27 mg/dL em gestantes com pré-eclâmpsia. Na análise da curva ROC a precisão diagnóstica da cistatina C foi superior à creatinina sérica. Os mesmos autores, em outro estudo, não encontraram relação significativa entre peso fetal ou placentário e o nível sérico de cistatina C, acreditando que o incremento no nível sérico na gestante seja por alterações no processo de filtração glomerular e não por um ritmo de produção aumentado. Estudos sugerem que a cistatina C não atravessa a barreira placentária (42).

Finney et al. analisaram as concentrações de cistatina C por método nefelométrico, em 291 crianças de 1 a 17 anos (incluindo 30 prematuros com idade gestacional entre 24 e 36 semanas) e também a creatinina sérica por método colorimétrico. Nos prematuros e neonatos as concentrações tanto da creatinina quanto da cistatina C são mais altas, devido à imaturidade renal, e gradualmente declinam com o aumento de idade até 1 ano, em que as concentrações se tornam semelhantes às do indivíduo adulto (até aproximadamente 50 anos). Nenhum dos parâmetros foi influenciado pelo sexo. Os autores sugerem a dosagem da cistatina C como marcador de escolha para avaliação da função renal em crianças, porque as variações fisiológicas ocorridas durante o crescimento não interferem nos resultados das dosagens de cistatina C, estimando melhor a RFG na população pediátrica (23).

Harmoinen et al. estabeleceram intervalos de referência para níveis de cistatina C no plasma para indivíduos pré-termo (1,34 – 2,57 mg/L) e a termo (1,36 – 2,23 mg/L). Verificaram também que a concentração de cistatina C decresce rapidamente depois do nascimento e após 3 anos de vida se torna independente da idade. O intervalo de referência determinado para crianças de 1 a 3 anos foi 0,75 – 1,87 mg/L; de 1 a 3 anos foi 0,68 – 1,60 mg/L. Para crianças com idade entre 3 e 16 anos o intervalo é 0,51 – 1,31 mg/L, valores estes que se aproximam da faixa de referência da população adulta (0,53 – 0,95 mg/L). Os autores também verificaram que não houve interferência do sexo das crianças nos resultados das análises (43).

Fischbach et al. desenvolveram um estudo em crianças saudáveis (n=98) em que foi verificada a existência de correlação negativa entre idade e concentração sérica de cistatina C para crianças com idade inferior a 18 meses ($r^2= 0,631$, $p<0,01$). Quanto menor a idade, as crianças apresentavam níveis séricos mais altos de cistatina C. Os autores não indicam a utilização deste marcador em indivíduos com menos de 36 meses de idade (44).

Page et al. estudaram a concentração de cistatina C e depuração da creatinina em 138 pacientes, sendo 45 portadores de patologias oncológicas e 93 com outras patologias; 56 pacientes apresentavam uma depuração da creatinina abaixo de 70 mL/min e 82 tinham valores dentro da referência. Os resultados revelaram que a cistatina C é superior à creatinina na detecção de pacientes com redução de RFG. Usando um nível de corte da creatinina de 1,1 mg/dL (para mulheres) e 1,3 mg/dL (para homens) foram identificados 63% dos pacientes com redução de RFG de acordo com a depuração da creatinina, com especificidade de 95%. A cistatina C identificou 96% desses pacientes, com especificidade de 65%, quando utilizado ensaio específico do fabricante, com nível de corte de 0,96 mg/L. Os autores concluíram também que as causas não primariamente renais para elevação do nível sérico de cistatina C são: o mieloma, a infecção por HIV e o crescimento produzido por utilização de glicocorticóides (45).

Stabuc et al. verificaram que não há qualquer outra variável nos níveis séricos de cistatina C que não seja proveniente de alteração de RFG em pacientes com câncer (n=72). Os autores não encontraram diferença

significativa nos níveis séricos de cistatina C entre pacientes com e sem doenças metastáticas, nem entre pacientes em diferentes esquemas quimioterápicos. Concluíram que a cistatina C é um marcador superior que a creatinina sérica na detecção do decréscimo da função renal em crianças portadoras de neoplasias (46).

Finney et al. avaliaram 60 pacientes (30 homens e 30 mulheres) entre 39 e 81 anos com diagnóstico de mieloma múltiplo e com paraproteinemia. A cistatina C sérica variou entre 0,35 e 8,0 mg/L, sendo que em 55 pacientes os valores ficaram dentro da referência. Os valores da creatinina sérica estavam entre 0,77 e 4,08 mg/dL, com 49 pacientes expressando valores dentro da faixa de referência (menor que 14,12 mg/dL). Nesses pacientes, a análise de regressão linear entre a cistatina C e a creatinina sérica não evidenciou diferença estatisticamente significativa (19). Contudo a presença de cistatina C tem sido avaliada em pacientes portadores de determinados tumores e, em alguns casos, evidencia-se relação de declínio nas taxas de cistatina C sérica à medida que ocorre a progressão destes tumores (19).

Chantrel et al. afirmaram que as dosagens de cistatina C não conferem nenhuma vantagem real sob a determinação de creatinina sérica, ou sob a depuração de creatinina urinária, em casos de detecção de perda de função renal leve a moderada. Nos pacientes com aumento significativo da dosagem de creatinina sérica, os autores sugerem confirmação através da cistatina C (47).

Jernberg et al. estudaram 726 pacientes admitidos por suspeita de síndrome coronariana aguda sem elevação no segmento ST. Foram

acompanhados por 40 meses. Os autores sugerem que uma simples medição de cistatina C sérica ajuda a estratificar os pacientes de acordo com o risco de morte (48).

Finney et al. descreveram o imunoensaio nefelométrico para cistatina C no nefelômetro Behring (BNA e BNII) e concluíram que a cistatina C pode ser efetivamente utilizada como marcador da taxa de filtração glomerular estimada (49).

Kilpatrick et al. concluíram que a cistatina C é um marcador de função renal potencialmente melhor que a creatinina sérica, uma vez que apresenta menos limitações técnicas. A cistatina C é o teste de escolha no seguimento de pacientes sem comprometimento renal (33).

Bricon et al. propuseram seguimento e avaliação renal de 30 receptores e 56 indivíduos controles, usando dosagem da cistatina C sérica, e concluíram tratar-se de um marcador de função do enxerto em adultos transplantados, por ter maior sensibilidade quando comparada à creatinina sérica, o que permite um diagnóstico mais rápido da rejeição aguda ou tratamento nefrotóxico (30).

Grubb et al. propuseram que através de dosagens séricas de cistatina C poder-se-ia melhor mensurar o RFG quando comparada com a creatinina, porque a cistatina independe de idade, sexo e massa muscular (17).

Algumas fórmulas são comumente utilizadas na prática clínica para estimar o RFG, através de dados antropométricos e dosagens da SCr e da cistatina C.

São exemplos as fórmulas de Cockcroft-Gault (CG), Schwartz, para crianças, *Modification of Diet in Renal Disease* (MDRD), sendo esta última preferida em casos de desnutrição ou na vigência de processos inflamatórios (2, 4, 5, 50-53).

Filler et al. compararam as fórmulas de CG, de Schwartz e uma recente utilizando a cistatina C, e concluíram em um trabalho desenvolvido “em coorte” de 262 crianças que a fórmula CG apresentou o pior desempenho para este grupo de pacientes ($r = 0,61$, $p < 0,0001$). Já a fórmula baseada na cistatina C, desenvolvida pelos mesmos autores, apresentou o melhor coeficiente de correlação ($r = 0,85$, $p < 0,0001$). A fórmula de Schwartz apresentou resultados intermediários ($r = 0,77$, $p < 0,0001$) (51).

Peralta et al. estudaram a influência da descendência africana, nível sócio-econômico, idosos americanos na função renal, uma vez que são mais afetados que as demais populações locais. Neste trabalho, o RFG foi estimado através da fórmula MDRD e a população foi diferenciada das demais através de marcadores (peptídeos e nucleotídeos bialelos) e análise genotípica. Aspectos sócio-econômicos, idade, sexo, raça, índice de massa corporal, tabagismo, presença de diabetes mellitus e hipertensão arterial, níveis de colesterol, proteína C reativa e cistatina C também foram analisados ($n=736$). Os autores concluíram que não há associação entre descendência africana e aumento de nível sérico de cistatina C; fatores genéticos relacionados a ancestrais africanos podem não estar relacionados à diminuição de função renal. As diferenças de meio ambiente e fatores sociais parecem ser os agentes causais da prevalência da doença nesta população (54).

1.1.5 Validação Analítica para dosagem de cistatina C

O procedimento para verificar se um método laboratorial fornecerá resultados analíticos confiáveis, exatos e precisos denomina-se validação, o qual permite conhecer a sua aplicabilidade e seus limites nas condições de cada laboratório. Constitui-se o primeiro requisito para a implantação de um método analítico e deve seguir normatizações internacionais como às referidas anteriormente (55, 56).

Dados da validação analítica são úteis na introdução de um novo esquema terapêutico, de nova metodologia analítica na área técnica, no apoio aos estudos de formulações distintas, na monitorização e determinação dos níveis terapêuticos de drogas. A validação tem impacto direto na qualidade dos tratamentos instituídos. Ela também possibilita documentação consistente para eventuais auditorias médicas ou de protocolos de pesquisa (55, 56).

Apesar de o fabricante fornecer informações acerca do desempenho do conjunto diagnóstico, isto não é suficiente para a sua implantação na rotina laboratorial, sem antes passar por um processo de verificação e validação.

Esta exigência se deve ao fato de que as condições na indústria podem ser diferentes daquelas presentes no laboratório que irá realizar os testes, e os resultados poderão ser diferentes das informações previamente recebidas.

A avaliação de um método requer conhecimentos e habilidades para um bom desempenho técnico, a utilização de equipamentos e materiais

disponíveis no laboratório e o uso de ferramentas estatísticas que permitam analisar os resultados obtidos, importantes para o ajuste das doses (57).

As normas internacionais, nacionais e de sistema da qualidade destacam a importância da validação de métodos analíticos nas condições de cada laboratório, garantindo a uniformidade dos resultados. A validação de um método consiste na realização de uma série de testes, com a finalidade de se documentar o desempenho do método em relação à exatidão, precisão e intervalo analítico (58, 59).

Portanto, se faz necessária não só a padronização de um marcador de função renal de alta sensibilidade, baixo custo e acessível aos laboratórios de bioquímica, assim como a análise de diferentes populações em que este marcador possa ser utilizado com eficácia e confiabilidade. É também importante à implantação na rotina de uma técnica precisa, com boa correlação com a medida do RFG, sendo mais prática e menos dispendiosa. A cistatina C poderia ser este marcador. Embora diversos estudos demonstrem esta possibilidade, sentimos a necessidade do método ser testado em nosso meio, nas condições de rotina, para a confirmação de que pode ser utilizado como medida rotineira em centros médicos de assistência e pesquisa.

Este trabalho tem como objetivos a validação do método nefelométrico para dosagem de cistatina C sérica, na Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (DLC-HCFMUSP), e a avaliação da eficácia da dosagem de cistatina C em relação às medidas de filtração glomerular.

2. OBJETIVOS

PRIMÁRIO

- Validação de um conjunto diagnóstico para cistatina C por método imunonefelométrico e implantação da metodologia na rotina laboratorial.

SECUNDÁRIO

- Verificar o grau de correlação entre a cistatina C sérica e as diferentes equações para estimação do ritmo de filtração glomerular (Cockcroft-Gault, Nankivell, MDRD e creatinina sérica) em pacientes transplantados renais sob diferentes tipos de imunossupressão.

3. MÉTODOS

O estudo intitulado “Validação do método imunonefelométrico para dosagem de cistatina C, como marcador de função renal”, foi realizado mediante a aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projeto de Pesquisa (CAPEPESQ) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob número 966/05.

Todos os participantes do estudo foram informados sobre os procedimentos do estudo e deram sua anuência através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

O estudo foi delineado em duas fases, denominadas fase A e fase B. Na primeira fase, procedemos a validação do método imunonefelométrico para dosagem sérica de cistatina C na DLC-HCFMUSP. Na fase B, avaliamos a cistatina C e a creatinina como marcadores de função renal em pacientes transplantados renais, que estavam sob diferentes esquemas de imunossupressão.

Na fase A, as amostras foram analisadas pelo conjunto diagnóstico para cistatina C da marca Dade Behring (*GmbH*, Marburg, Alemanha). Foram utilizados os controles nível 1 (valor normal) e nível 2 (valor patológico) procedentes do mesmo conjunto diagnóstico deste fabricante durante os testes de validação.

Empregou-se um homogeneizado de amostras de soro de pacientes transplantados renais estáveis sob acompanhamento na Unidade de Transplante Renal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (UTR-HCFMUSP).

Nas análises laboratoriais, foram aplicados os critérios de validação baseados nas normas nacionais e internacionais: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), *Clinical Laboratory Improvement Act* (CLIA) e *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (55, 60-65).

Na fase B, foram selecionados pacientes transplantados renais aleatórios da UTR-HCFMUSP que obedecessem aos critérios de inclusão e não apresentassem nenhum critério de exclusão.

Critérios de inclusão:

- Pacientes transplantados renais, sem distinção do tempo pós-transplante.
- Anuência ao TCLE.
- Idade acima de 18 anos.

Critérios de exclusão:

- Transplante múltiplo.
- Portadores de hepatopatias.
- Terapia tireoidiana.
- Portadores de neoplasia.
- Pulsoterapia com metilprednisolona há menos de 1 mês.

Estes pacientes selecionados foram agrupados de acordo com o esquema imunossupressor em uso, na data da coleta do exame de cistatina C e creatinina sérica. A tabela 1 descreve a distribuição dos pacientes por grupos.

Tabela 1 - Distribuição dos pacientes em grupos, segundo esquema de medicação imunossupressora.

Grupo	Imunossupressão
G1- AZA	Azatioprina (AZA) Azatioprina / Ciclosporina (AZA/CYA) Azatioprina / Tacrolimus (AZA/TAC)
G2 - MMF	Micofenolato Mofetil / Ciclosporina (MMF /CYA) Micofenolato Mofetil / Tacrolimus (MMF/ TAC)
G3 - SRL	Sirolimus / Azatioprina (SRL/ AZA) Sirolimus (SRL) Sirolimus / Ciclosporina (SRL / CYA) Sirolimus / Tacrolimus (SRL /TAC) Sirolimus / Micofenolato Mofetil (SRL/ MMF)

Estes pacientes foram submetidos a uma única coleta de 5 mL de sangue total em tubo sem anticoagulante, da qual foi separado o soro após retração de coágulo. Este material foi submetido às dosagens de cistatina C e creatinina séricas. Com base nestes resultados foram calculados a depuração de creatinina, utilizando-se da equação de CG, e o ritmo de filtração glomerular, através das equações de Nankivell e MDRD.

As amostras foram coletadas nas dependências da DLC-HCFMUSP e na Divisão de Urologia do HCFMUSP.

As análises de cistatina C sérica e creatinina sérica foram realizadas no Serviço de Bioquímica Clínica da DLC - HCFMUSP.

Os testes para avaliação do ensaio de creatinina sérica foram desenvolvidos no laboratório central previamente, quando foi padronizada esta análise.

3.1 Técnicas das determinações laboratoriais

3.1.1 Dosagem de creatinina sérica

O princípio do método (Reação Jaffé modificado) para dosagem de creatinina sérica consiste na reação, em solução alcalina, desta com o ácido pícrico formando um complexo amarelo avermelhado, em que a intensidade de cor é diretamente proporcional à concentração de creatinina. A leitura espectrofotométrica foi realizada no comprimento de onda de 512 nm.

Os insumos empregados foram da marca Roche (*Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Alemanha*) (artigo 11875418).

O método foi adaptado para o analisador bioquímico automatizado Modular P (*Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Alemanha*).

A amostra de sangue foi obtida através de venopunção periférica, com jejum mínimo de 4 horas.

3.1.2 Dosagem de cistatina C

A dosagem nefelométrica, aplicada neste trabalho, utiliza partículas de poliestireno carregadas com anticorpos específicos monoclonais contra a cistatina C humana, que ao se ligar à cistatina C, presentes na amostra, são aglutinadas. O princípio da reação está ilustrado esquematicamente na Figura 2.

A dispersão da luz é proporcional ao grau de aglutinação e, portanto, à concentração de cistatina C na amostra. A concentração final na amostra pode ser determinada através de comparação com a leitura de uma amostra padrão de concentração conhecida, em diferentes diluições (13).

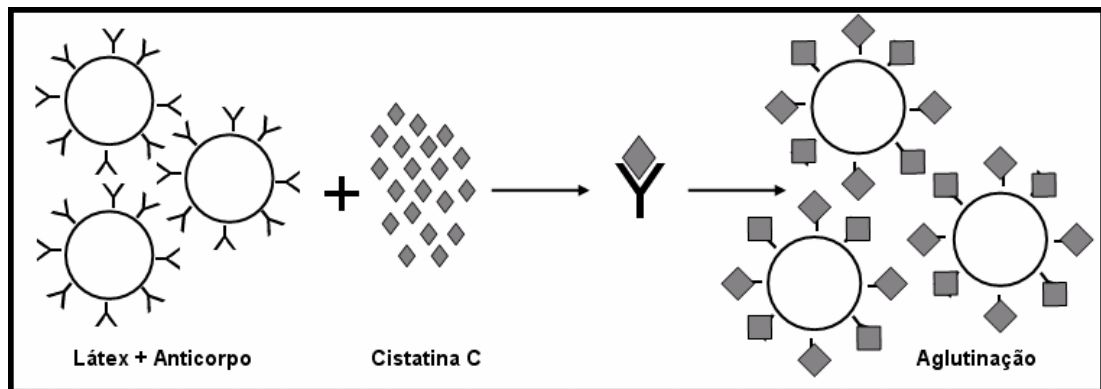


Figura 2 - Mecanismo de ação do conjunto diagnóstico nefelométrico para dosagem de cistatina C

As amostras foram dosadas no equipamento de nefelometria BN II (*Dade Behring, GmbH, Marburg, Alemanha*), empregando-se insumos do mesmo fabricante.

3.2 Fórmulas para estimativa da filtração glomerular

Cockcroft-Gault

Equação de Cockcroft-Gault (50)(ml/min) = [(140-Idade)xpeso]/ (72xSCr)

- Idade= Anos

- Peso=Kg

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

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

Nankivell

Equação de Nankivell (NK) (9)(ml/min) = 6700 / [SCrx88, 4]+ [peso/4] – [uréia/2]
– [100/(altura)²] + 35 (se homem) ou 25 (se mulher)

- SCr (mg/dL)

- Peso (Kg)

- Uréia (mmol/L)

- Altura (metros)

MDRD

Equação MDRD _{abreviada} (66)(ml/min)= (186) x (SCr)^{-1.154} x (Idade)^{-0.203} x

(0.742 se sexo feminino) x (1.21 se raça negra)

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

3.3 Validação da metodologia nefelométrica para dosagem da cistatina C

Calibração

A calibração do sistema analítico foi realizada com o soro calibrador do conjunto diagnóstico. O frasco contendo o calibrador foi colocado na estante específica do equipamento e reconhecido através de seu código de barras. Na seqüência, o equipamento verificava o valor da leitura do calibrador que deveria estar dentro de um intervalo estabelecido pelo fabricante.

As curvas de calibração foram obtidas através de múltiplos pontos. Para o estabelecimento desta curva de referência, foram efetuadas automaticamente várias diluições de um soro calibrador obtido de coelhos (*N Protein Standard UY*) com um diluente a base de tampões também fornecido pelo fabricante.

As diluições foram realizadas a partir do padrão concentrado de cistatina C de 1,40 mg/dL nas seguintes proporções: 1/20, 1/40, 1/180, 1/160, 1/320, 1/640. Quando a curva de calibração não era adequada, o equipamento sinalizava através de cor vermelha na área de trabalho da tela do monitor.

A calibração é definida como o processo que testa um método analítico, com a finalidade de estabelecer uma relação entre a concentração conhecida de um analito (calibrador) e o valor medido na amostra. A calibração está relacionada com a exatidão do método.

A calibração foi realizada todas as vezes em que ocorreu mudança de lote do conjunto reagente, ou com a finalidade de correção de eventuais erros sistemáticos (caso ocorressem), segundo os critérios de Westgard (67).

As amostras controles de cistatina C, com duas faixas de concentração, foram dosadas a cada lote de amostras, e os resultados avaliados em termos da média \pm 2DP. Foram adotadas as regras múltiplas de Westgard nas análises dos resultados das amostras controle.

Foram pipetadas 80 μ L da amostra nas cubetas do equipamento. Os resultados finais foram obtidos por comparação da leitura da dispersão nefelométrica da amostra, com a leitura das diluições seriadas do calibrador, na curva de calibração.

Precisão

A precisão de um método é definida como a concordância entre resultados de replicatas das dosagens.

A precisão foi estudada utilizando-se os controles de qualidade presentes no conjunto reagente com concentrações de: 0,90 mg/L (nível 1) e 1,80 mg/L (nível 2). Estes controles são liofilizados de poligelinas com proteínas de urina de proveniência humana. A concentração de cistatina C foi calibrada tomando-se como referência a cistatina C purificada. A concentração de cistatina C, após reconstituição, estava indicada no rótulo.

A utilização de um homogeneizado de amostras de soro de pacientes transplantados renais estáveis tinha como objetivo evitar o efeito de matriz, para o estudo da precisão intra-ensaio e interensaio.

Em todos os testes de validação, foram calculadas: as médias, os desvios-padrão (DP) e os coeficientes de variação dos valores obtidos. Os cálculos foram efetuados no programa *Excel* versão 5.0 (Microsoft®, Windows XP, EUA).

Avaliou-se a precisão intra-ensaio através da análise, no mesmo dia, de 30 replicatas dos dois níveis de controle e 10 replicatas de conjunto homogêneo de amostras (n=30) contendo concentração conhecida de cistatina C, dentro da faixa de referência.

Foram dois ensaios em dois lotes de amostras no mesmo dia, para minimizar erros devido à presença de interferentes, tais como variação da corrente elétrica e da temperatura.

A precisão interensaio foi determinada em 30 dias, sendo realizada a análise dos dois níveis de controle em replicata a cada dia. Foi dosada amostra contendo concentração conhecida de cistatina C durante 30 dias consecutivos em duas corridas ao dia.

Os coeficientes de variação para os testes intra e interensaio foram considerados adequados quando resultou valor menor do que 15% e quando o DP de um par de resultados em duplicata, na mesma corrida analítica, não foi maior que 5,5%.

Limite de detecção e Sensibilidade Analítica

O limite de detecção foi determinado após a dosagem do branco do reativo em 20 replicatas. O coeficiente de variação considerado adequado é de 20% entre as leituras em replicata.

A sensibilidade analítica foi avaliada através de diluições seriadas de uma mesma amostra (calibrador de concentração 1,49 mg/L de cistatina C) até a verificação do menor valor detectável pelo método, com coeficiente de variação entre as dosagens inferior a 15%.

Linearidade e Estabilidade

A linearidade do método, definida pelo fabricante, é de 8 mg/L.

A estabilidade da amostra foi verificada em material armazenado previamente (n=10 para cada homogeneizado de amostras) e com valor conhecido de concentração, estocado em câmara-fria a -20°C. Foram realizadas as dosagens em 7, 30, 60 e 90 dias, e os resultados analisados em termos percentuais de perda em relação à concentração obtida no tempo zero.

A estabilidade da amostra à temperatura ambiente foi avaliada após 1, 3, 5 e 7 dias e também estocada sob refrigeração (entre 2 e 8 ° C) por 1, 3, 5, 7, 14, 21 e 28 dias, dosando-se a cistatina C após estes períodos. Este teste foi considerado aceitável quando a perda foi inferior a 10% do valor inicial.

Recuperação

Estudou-se a recuperação do método, adicionando soro controle de valor conhecido, em dois níveis, a um conjunto de 10 amostras de soro, previamente homogeneizadas, cuja concentração de cistatina C também era conhecida. Foi então estabelecido o percentual de recuperação após a adição citada em relação ao valor esperado.

Foram considerados valores aceitáveis níveis de 80 a 120% de recuperação, em relação ao valor esperado. Neste teste empregaram-se controles com concentrações de: 0,90 mg/L e 1,80 mg/L (respectivamente níveis 1 e 2) de cistatina C.

Controle da Qualidade

O controle da qualidade foi realizado em cada lote de dosagens das amostras, com os controles de qualidade do conjunto reagente. Estes controles contemplam faixas analíticas: baixa e alta. Os resultados obtidos, necessariamente, deveriam estar no intervalo da média ± 2 DP estabelecidos pelo fabricante. O controle da qualidade garantiu a precisão do processo durante todo o estudo.

Ao final do experimento, foi calculado o coeficiente de variação entre todas as dosagens de controles.

4. TESTES ESTATÍSTICOS

A análise estatística foi realizada no programa informatizado *SPSS 10.0 for Windows* College Station, Texas, 77845, EUA, e *Microsoft Excel 2002*, EUA, com nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).

As análises descritivas das variáveis paramétricas foram realizadas calculando-se a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação. Os resultados foram expressos através desses parâmetros.

Os dados não paramétricos foram analisados utilizando teste Qui-quadrado.

A análise de regressão linear foi utilizada para avaliar o nível de concordância entre as medidas.

5. RESULTADOS

5.1 Creatinina sérica

Os resultados de sensibilidade e linearidade para creatinina sérica foram de 0,2 e 25 mg/dL, respectivamente. Os coeficientes de variação intra e interensaio foram de 1,67% e 1,09%, respectivamente. O teste de recuperação, por adição de padrão, atingiu percentual de 90%. O intervalo de referência adotado para homens foi de 0,7 a 1,2 mg/dL (62-106 $\mu\text{mol/L}$) e para mulheres de 0,5-0,9 mg/dL (44-80 $\mu\text{mol/L}$). Estes resultados são procedentes da implantação laboratorial da creatinina na DLC.

5.2 Fase A: Validação da cistatina C

5.2.1 Precisão

Na tabela 2 estão descritos os valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação observados na avaliação da precisão intra e interensaio do método imunonefelométrico para dosagem de cistatina C. O coeficiente de variação intra-ensaio variou de 3,32 a 8,93% e o interensaio de 5,38 a 8,20%.

Tabela 2 - Resultados obtidos para avaliação da precisão intra-ensaio e interensaio (CV%) nos dois níveis de controle e soro de pacientes (n = 30)

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Intra-ensaio			Interensaio			
	Média ($\mu\text{g/mL}$)	DP	CV (%)	Média ($\mu\text{g/mL}$)	DP	CV (%)	
Controle 1	0,98	0,99	0,09	8,73	1,01	0,05	5,38
Controle 2	1,99	1,97	0,07	3,32	1,99	0,14	7,22
Soro	1,00	1,01	0,09	8,93	1,02	0,01	8,20

DP - desvio padrão; CV - coeficiente de variação

5.2.2 Limite de Detecção e Sensibilidade Analítica

Na tabela 3 estão descritos os resultados obtidos nos testes de sensibilidade analítica e de limite de detecção. Como pode ser verificado, foi obtido CV de 14,79% e 8,25%, respectivamente.

Tabela 3 - Limite de detecção e sensibilidade analítica (n=10)

	Média (mg/L)	DP (mg/L)	CV (%)
Limite de Detecção	0,04	0,03	8,25
Sensibilidade Analítica	0,05	0,09	14,79

DP – Desvio padrão; CV - coeficiente de variação

5.2.3 Estabilidade da amostra

Os resultados da avaliação da estabilidade da amostra foram descritos nas tabelas 4, 5 e 6. As concentrações médias das amostras utilizadas foram: 1,01 mg/L; 1,48 mg/L e 3,34 mg/L.

Na tabela 4 verificou-se que as amostras conservadas sob congelamento, à temperatura de -20°C , tiveram perda de apenas 0,2% de sua concentração inicial após 90 dias de armazenamento. Enquanto sob refrigeração, como pode ser verificado na tabela 5, em 28 dias foram obtidas perdas de até 11,42%.

A maior perda foi obtida quando as amostras foram armazenadas à temperatura ambiente (tabela 6), onde em apenas 7 dias houve perda de até 10% de concentração de cistatina C com relação à amostra inicial.

Tabela 4 - Percentual de perda da concentração de cistatina C em relação ao tempo 0 (estabilidade da amostra a -20°C)

0 dia (%)	7 dias (%)	30 dias (%)	60 dias (%)	90 dias (%)
0	0,03	0,06	0,11	0,19
0	0	0,01	0,05	0,09
0	0	0,01	0,05	0,06

Tabela 5 - Percentual de perda da concentração de cistatina C em relação ao tempo 0. Estabilidade da amostra sob refrigeração (2 a 8°C)

1 dia (%)	3 dias (%)	5 dias (%)	7 dias (%)	14 dias (%)	21 dias (%)	28 dias (%)
0,02	0,06	0,09	0,13	2,54	5,48	10,81
0,02	0,04	0,05	0,07	3,12	5,27	11,42
0,01	0,01	0,02	0,04	4,19	6,18	10,20

Tabela 6 - Percentual de perda da concentração de cistatina C em relação ao tempo 0. Estabilidade da amostra à temperatura ambiente (22°C)

1 dia (%)	3 dias (%)	5 dias (%)	7 dias (%)
0,67	0,74	3,81	8,94
0,74	0,82	4,91	7,96
0,78	0,93	2,96	9,98

5.2.4 Recuperação

Os resultados do teste de recuperação, que podem ser verificados na tabela 7, oscilaram entre 86,7% e 98% de obtenção do analito cistatina C com relação à concentração inicial (antes da adição do controle comercial).

Os dados obtidos neste teste, como era esperado, se encontra dentro da faixa de 80 a 120 % de recuperação.

Tabela 7 - Teste de recuperação após adição de controle comercial de concentração conhecida níveis 1 e 2 a homogeneizado de amostras

Analito	Concentração esperada (mg/L)	Concentração Obtida (mg/L)	Recuperação (%)
C1 + C2	1,50	1,30	86,7
H + C1	2,33	2,26	97,0
H + C2	2,82	2,76	98,0

C1 = controle nível 1; C 2 = controle nível 2; H = homogeneizado (n=10)

5.2.5 Controle da Qualidade

Os gráficos 1 e 2 mostram o grau de dispersão dos valores em torno da média de concentração de cistatina C. Os resultados não ultrapassaram os limites estipulados e foram considerados adequados.

O controle de qualidade assegurou a precisão dos testes durante todo o ensaio.

Gráfico 1 - Controle da Qualidade Nível 1 dosado paralelamente a cada lote de amostras

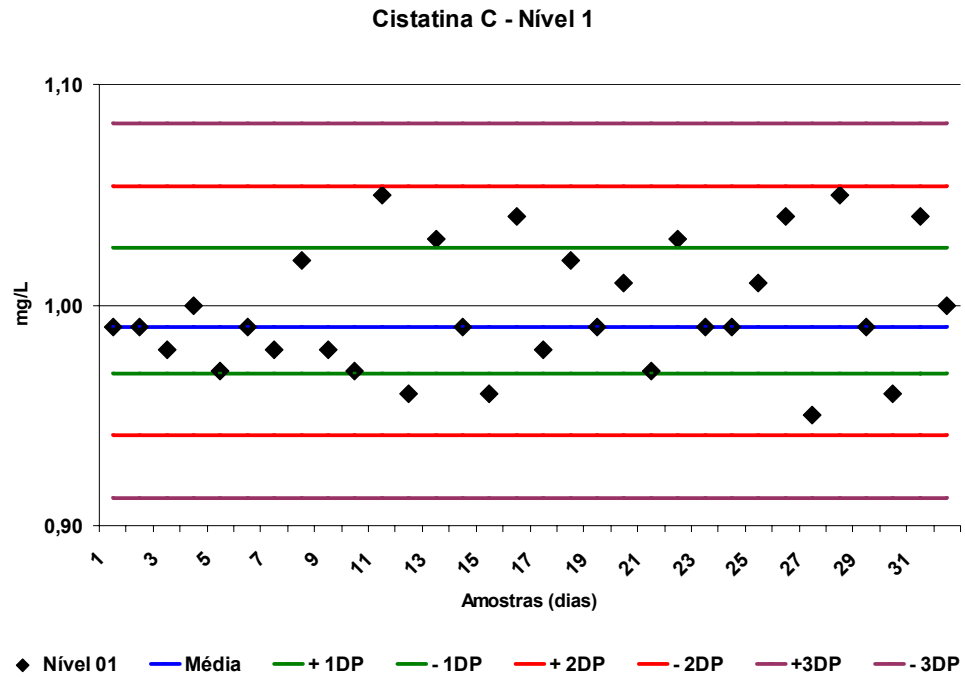
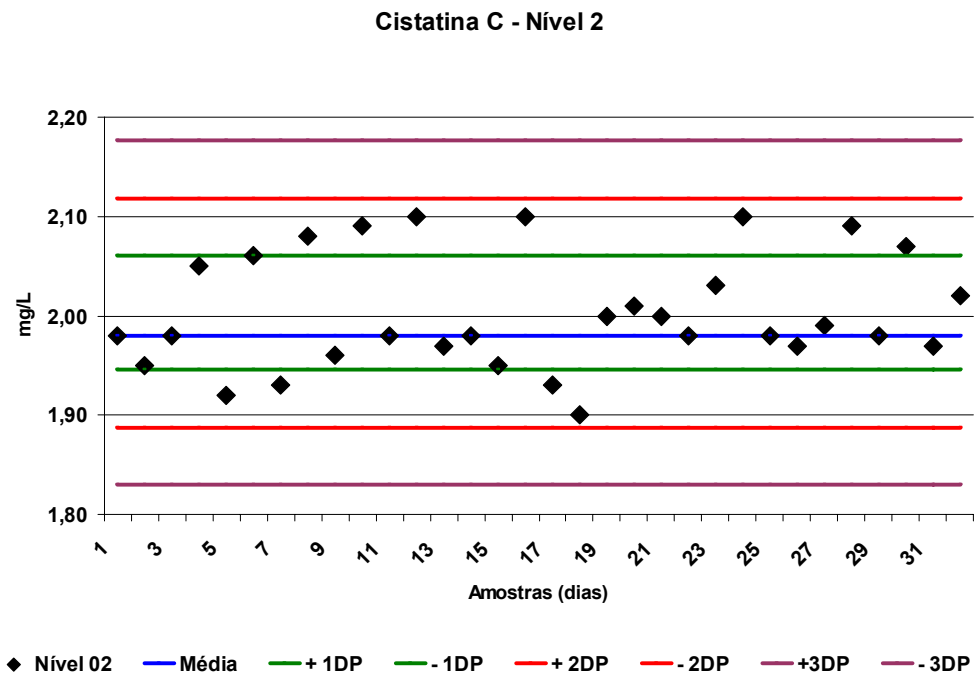


Gráfico 2 - Controle da Qualidade Nível 2 dosado paralelamente a cada lote de amostras.



5.3 Resultados – FASE B

Na fase B deste estudo, 197 pacientes transplantados renais preencheram os critérios de inclusão e não apresentaram critérios de exclusão e foram, portanto, inseridos.

Destes, 36 pacientes foram incluídos no grupo 1 (azatioprina), 131 pacientes no grupo 2 (micofenolato mofetil) e 30 pacientes no grupo 3 (sirolimus) . A distribuição é apresentada na tabela 8.

Tabela 8 - Distribuição dos pacientes conforme esquema imunossupressor

Grupo	Imunossupressão	n
G1 (AZA)	Azatioprina	09
	Azatioprina / Ciclosporina	22
	Azatioprina / Tacrolimus	05
G2 (MMF)	Micofenolato Mofetil / Ciclosporina	43
	Micofenolato Mofetil / Tacrolimus	88
G3 (SRL)	Sirolimus / Azatioprina	03
	Sirolimus	09
	Sirolimus / Ciclosporina	05
	Sirolimus / Tacrolimus	03
	Sirolimus / Micofenolato Mofetil	10

Não houve diferença estatística entre os grupos com relação à maioria das variáveis demográficas. Entretanto houve diferença com relação a sexo e IMC entre os grupos 2 e 3, e quanto ao tempo após o transplante entre o grupo 1 e os demais. Os dados demográficos da casuística foram apresentados na tabela 9 de acordo com os grupos de imunossupressão.

Tabela 9 - Dados Demográficos

Variável	G1 AZA	G2 MPA	G3 SRL	p (p=0,05)
n	36	131	30	
Raça (b / nb)	29 / 7	88 / 43	29 / 1	0,002
Sexo (f / m)	25 / 11	43 / 88	11 / 19	< 0,001
Idade no Tx (anos)	47 ± 13	41 ± 13	47 ± 14	0,062
Peso (Kg)	67,3 ± 18	64,1 ± 11,6	70,1 ± 12,7	0,058
Altura (m)	1,61 ± 10	1,62 ± 9	1,62 ± 16	0,490
Superfície Corpórea (m²)	1,61 ± 0,46	1,69 ± 0,17	1,74 ± 0,22	0,105
IMC	25,94 ± 5,69	23,91 ± 4,00	27,41 ± 8,24	*
Tempo Tx (meses)	140 ± 111	33 ± 39	55 ± 82	**
Número Tx (1º / Re)	35 / 1	117 / 14	29 / 1	0,177
Doador (vivo / falecido)	19 / 15	69 / 62	14 / 16	0,754

*Valor de p: 0,126 (G1/G2); 0,003 (G2/G3); 0,781 (G1/G3)

**Valor de p: 0,000 (G1/G2); 0,284 (G2/G3); 0,000 (G1/G3)

b= branco, nb= não branco; f = feminino, m = masculino; IMC = índice de massa corpórea; Tx = transplante renal

As doses de imunossupressores foram semelhantes entre os grupos. A única diferença encontrada foi na dose de micofenolato mofetil entre os grupos 2 e 3 ($p=0,009$).

Tabela 10 - Doses de Imunossupressão

Imunossupressor *	G1	G2	G3	p^{**}
Prednisona	7,5 ± 2 (n = 36)	11,7 ± 12,9 (n = 131)	8,4 ± 3,7 (n = 30)	0,062
Ciclosporina	159 ± 40 (n = 22)	163 ± 117 (n = 42)	150 ± 150 (n = 5)	0,954
Tacrolimus	4,8 ± 3,8 (n = 6)	6,9 ± 4,6 (n = 88)	6,0 ± 4,3 (n = 4)	0,530
Azatioprina	128 ± 39 (n = 36)	-	116 ± 23 (n = 2)	0,670
Micofenolato Mofetil	-	1614 ± 375 (n = 94)	1250 ± 299 (n = 8)	0,009
Myfortic	-	1201 ± 268 (n = 37)	900 ± 312 (n = 3)	0,071
Sirolimus	-	-	2,96 ± 2,87 (n = 30)	-

*Doses dos imunossupressores expressas em mg/dia.

As tabelas 12, 13 e 14 mostram a correlação entre cistatina C, creatinina sérica e as diversas equações para RFG.

O RFG foi estimado pelas equações de Cockcroft-Gault (CG), MDRD e Nankivell. Foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Esta diferença foi documentada quando se avaliou a medida sérica de cistatina C e o inverso da creatinina como marcadores de função renal. Quando a função renal foi determinada pela equação de Nankivell e MDRD, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa. Os dados são apresentados na tabela 11.

Tabela 11 - Medidas de Filtração Glomerular

Marcador de Filtração	G1 AZA (n = 36)	G2 MPA (n = 131)	G3 SRL (n = 30)	p=*
Creatinina (mg/dL)	1,45 ± 0,53	1,76 ± 1,67	1,94 ± 0,87	0,360
1/Creatinina	0,78 ± 0,29	0,73 ± 0,30	0,60 ± 0,23	0,040
Cockcroft-Gault (mL/min/1,73m ²)	62 ± 21	61 ± 25	50 ± 17	0,038
Nankivell (mL/min/1,73m ²)	61 ± 24	58 ± 26	49 ± 23	0,180
MDRD (mL/min/1,73m ²)	53 ± 23	46 ± 21	55 ± 25	0,077
Cistatina C (mg/L)	1,28 ± 0,52	1,64 ± 1,19	2,41 ± 1,15	<0,001
1/Cistatina C	0,78 ± 0,45	0,76 ± 0,30	0,53 ± 0,31	<0,001

Valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

As medidas de cistatina C e creatinina séricas apresentaram correlação negativa com o RFG estimado pela equação de CG nos três grupos, e correlação positiva quando se utilizou o inverso destas medidas.

Nas duas situações, a correlação foi mais evidente para creatinina em relação à cistatina C.

Nas tabelas 12, 13 e 14 verifica-se as correlações entre os 3 grupos e as equações que estimam o RFG por CG, NK e MDRD respectivamente.

Tabela 12 - Correlação entre RFG estimado por equação de Cockcroft-Gault (CG) e os marcadores creatinina e cistatina C

Cockcroft-Gault (mL/min/1,73m ²)	G1 AZA (r/R ²)	G2 MPA (r/R ²)	G3 SRL (r/R ²)
Creatinina	-0,805 / 0,647 (p = 0,000)	-0,578 / 0,334 (p = 0,000)	-0,873 / 0,762 (p = 0,000)
1/Creatinina	0,875 / 0,764 (p = 0,000)	0,921 / 0,849 (p = 0,000)	0,910 / 0,828 (p = 0,000)
Cistatina C	-0,524 / 0,274 (p = 0,001)	-0,561 / 0,315 (p = 0,000)	-0,725 / 0,525 (p = 0,000)
1/Cistatina C	0,488 / 0,238 (p = 0,000)	0,599 / 0,359 (p = 0,000)	0,630 / 0,397 (p = 0,000)

Quando o RFG foi estimado pela equação de Nankivell (tabela 13), o inverso da creatinina mantém uma associação positiva com o RFG em todos os grupos, e para o inverso da cistatina C nos grupos 2 e 3. No grupo de pacientes sob imunossupressão com azatioprina, não foi encontrada uma associação com o RFG estimado pela equação de Nankivell. Entretanto, esta ausência de associação não foi observada quando o RFG foi determinado pela equação de CG ou MDRD, como visto acima na tabela 12 e na tabela 14 respectivamente.

Tabela 13 - Correlação entre RFG estimado por equação de Nankivell (NK) e os marcadores creatinina e cistatina C

Nankivell (mL/min/1,73m ²)	G1 AZA r/R ²	G2 MPA r/R ²	G3 SRL r/R ²
Creatinina	-0,685 / 0,470 (p = 0,000)	-0,517 / 0,267 (p = 0,000)	-0,726 / 0,527 (p = 0,000)
1/Creatinina	0,796 / 0,633 (p = 0,000)	0,787 / 0,620 (p = 0,000)	0,746 / 0,557 (p = 0,000)
Cistatina C	-0,297 / 0,088 (p = 0,089)	-0,480 / 0,231 (p = 0,000)	-0,603 / 0,363 (p = 0,001)
1/Cistatina C	0,226 / 0,051 (p = 0,199)	0,457 / 0,290 (p = 0,000)	0,587 / 0,344 (p = 0,001)

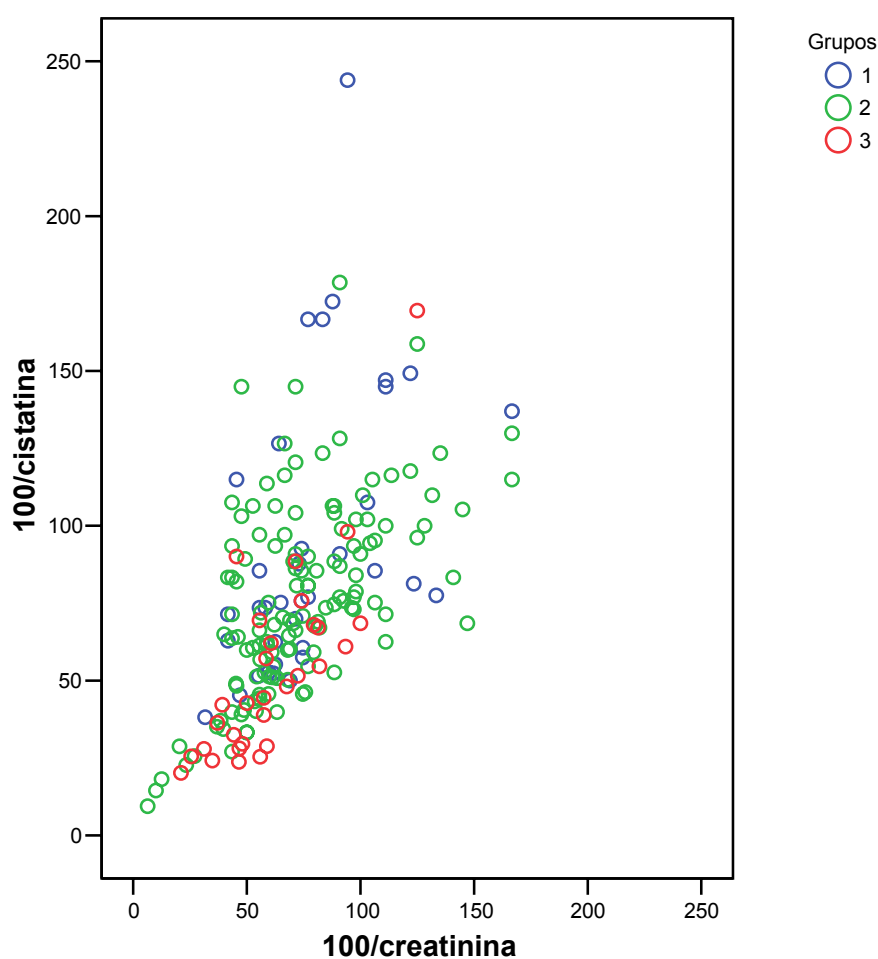
Em virtude da diferença encontrada entre os grupos com relação às variáveis sexo, raça e RFG, as correlações entre Cistatina C e Creatinina foram testadas ajustando-se para estas variáveis. Não se verificou diferença na correlação CG e cistatina e CG e creatinina quando ajustados para as variáveis sexo, raça e RFG.

Tabela 14 - Correlação entre RFG estimado por equação de MDRD e os marcadores creatinina e cistatina C. Análise de Regressão Linear

MDRD (mL/min/1,73m ²)	G1 AZA r/R ²	G2 MPA r/R ²	G3 SRL r/R ²
Creatinina	-0,837 / 0,700 (p=0,000)	- 0,735 / 0,540 (p=0,000)	- 0,619 / 0,427 (p=0,000)
1/Creatinina	0,928 / 0,861 (p=0,000)	0,898 / 0,806 (p= 0,000)	0,923 / 0,852 (p=0,000)
Cistatina C	-0,523 / 0,273 (p=0,000)	-0,583 / 0,340 (p=0,000)	-0,639 / 0,408 (p=0,000)
1/Cistatina C	0,443 / 0,196 (p=0,000)	0,530 / 0,280 (p=0,000)	0,700 / 0,490 (p=0,000)

O gráfico 3 mostra correlação entre creatinina e cistatina C de acordo com os grupos de imunossupressores. A menor correlação foi observada no grupo 1 ($r = 0,48$) e a maior ocorreu no grupo 3 ($r = 0,78$).

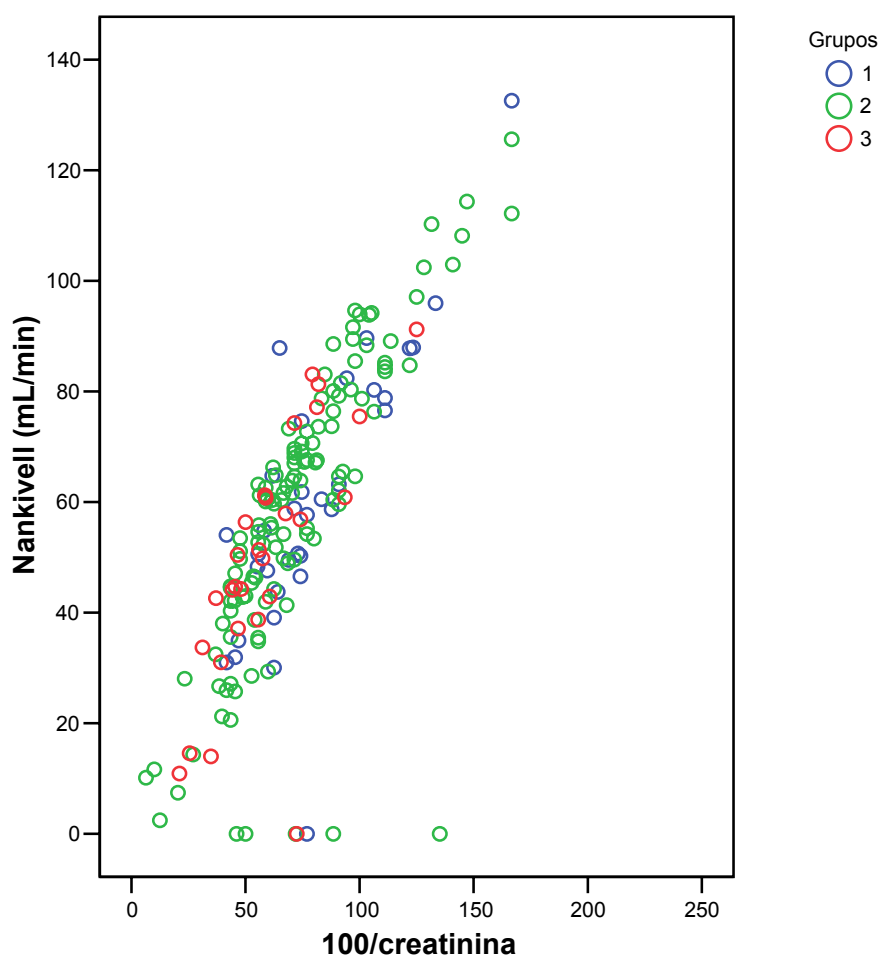
Gráfico 3 - Correlação entre Creatinina Sérica e Cistatina C de acordo com os grupos de estudo



Grupos	Correlação	IC a 95%	p-valor
1 (n=36)	48,2%	[18,2% ; 70,0%]	0,003
2 (n=131)	57,7%	[45,0% ; 68,1%]	<0,001
3 (n=30)	78,3%	[58,9% ; 89,2%]	<0,001

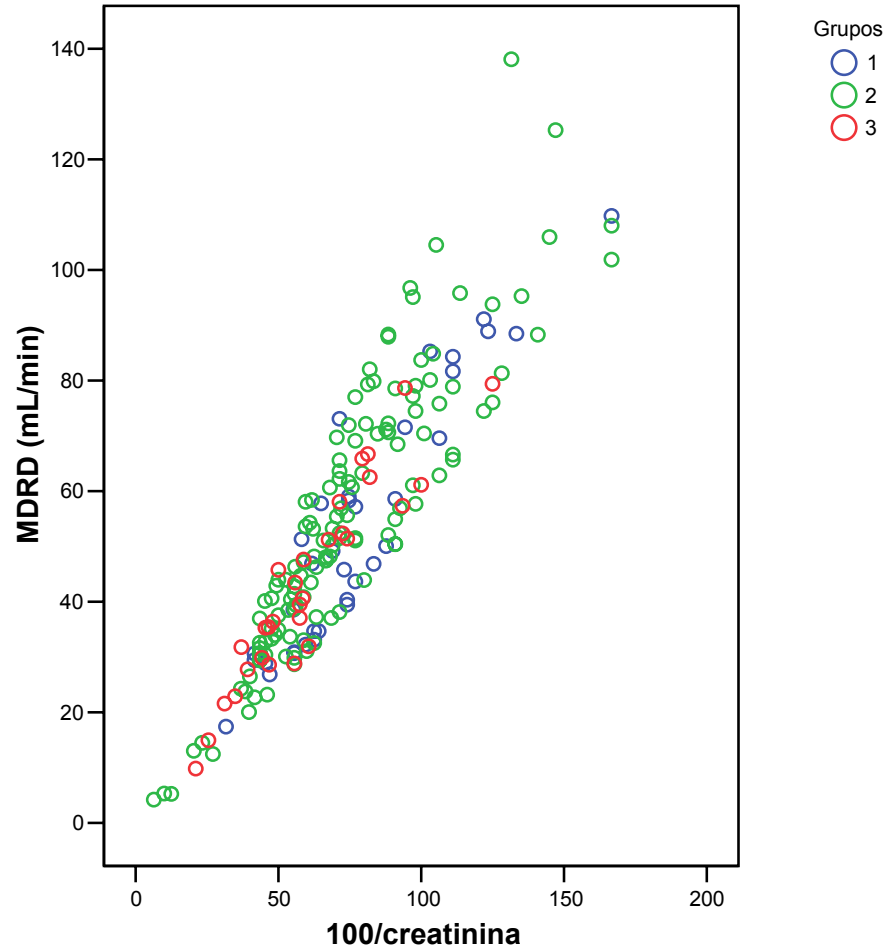
As equações que estimam a filtração glomerular, descritas por Nankivell, MDRD e Cockcroft-Gault, apresentaram elevada correlação com a recíproca da creatinina, e não houve diferenças significativas entre os grupos de imunossupressores em uso. Os gráficos 4,5 e 6 demonstram estes dados para Nankivell, MDRD e CG, respectivamente.

Gráfico 4 - Correlação entre Nankivell e Creatinina Sérica de acordo com os grupos de estudo



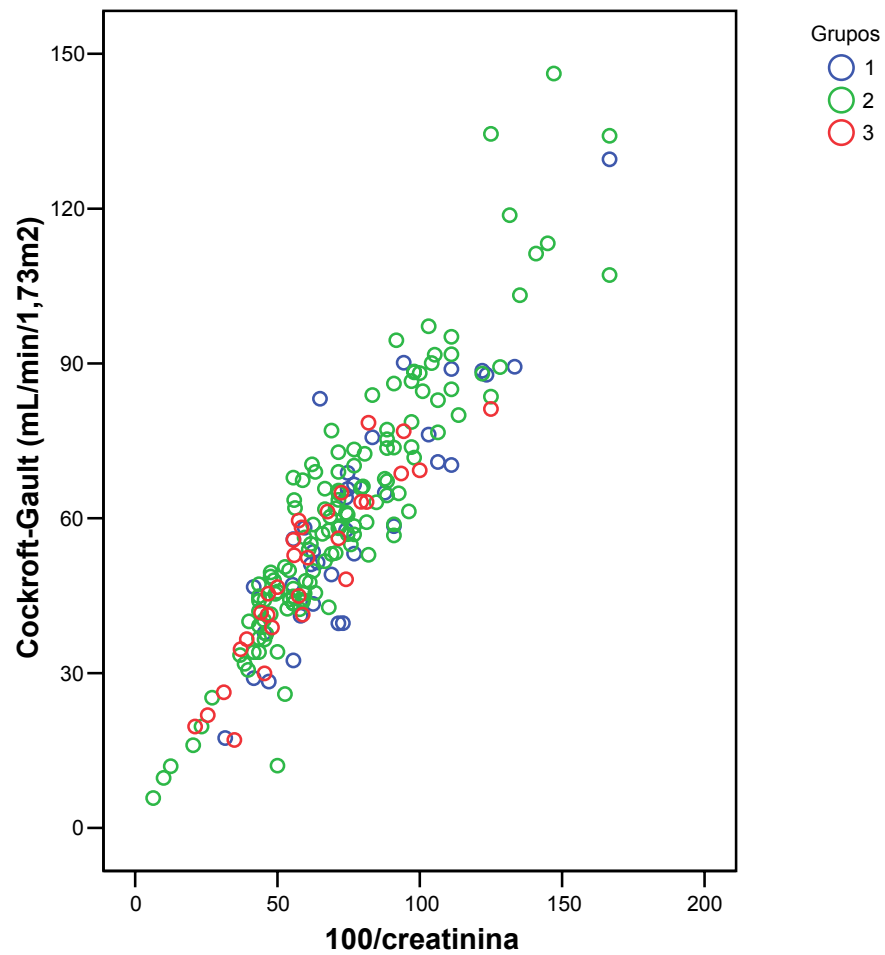
Grupos	Correlação	IC a 95%	p-valor
1 (n=34)	79,6%	[62,6% ; 89,4%]	<0,001
2 (n=125)	78,7%	[70,9% ; 84,6%]	<0,001
3 (n=28)	74,6%	[51,7% ; 87,5%]	<0,001

Gráfico 5 - Correlação entre MDRD e creatinina sérica de acordo com os grupos de estudo



Grupos	Correlação	IC a 95%	p-valor
1 (n=36)	92,8%	[86,2% ; 96,3%]	0,003
2 (n=131)	89,8%	[85,9% ; 92,7%]	<0,001
3 (n=30)	93,3%	[86,3% ; 96,8%]	<0,001

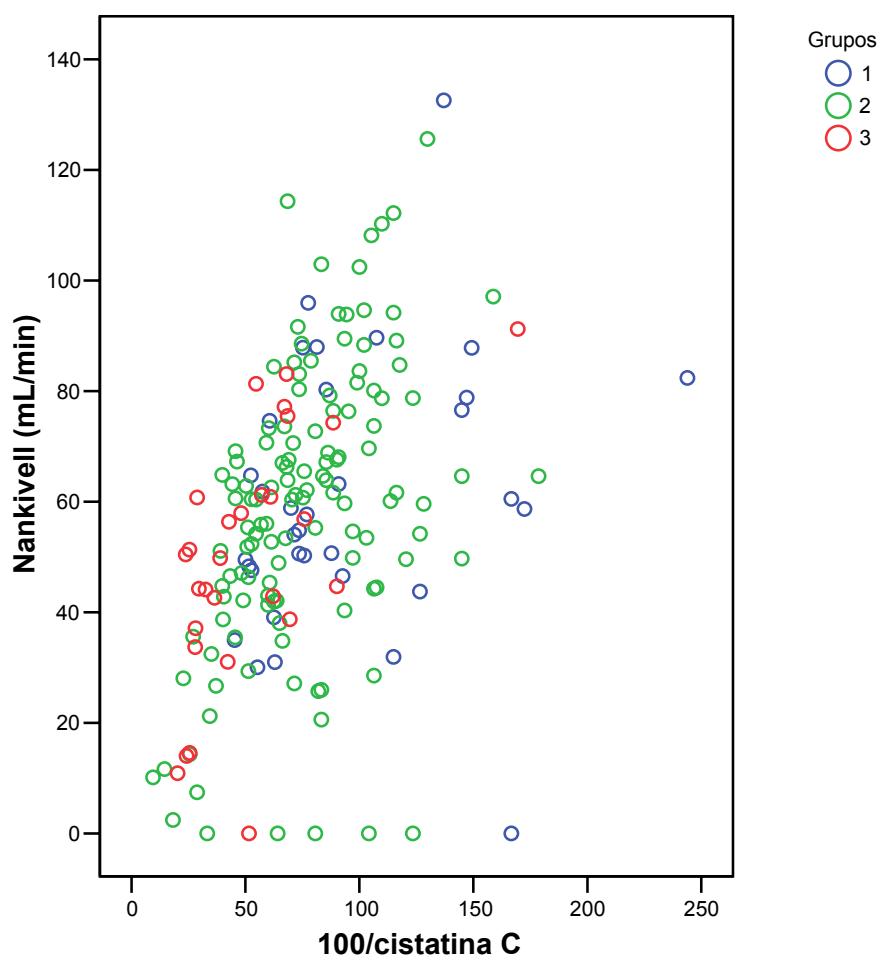
Gráfico 6 - Correlação entre Cockcroft Gault e creatinina sérica de acordo com os grupos de estudo



Grupos	Correlação	IC a 95%	p-valor
1 (n=36)	88,5%	[78,5% ; 94,0%]	<0,001
2 (n=131)	92,1%	[89,0% ; 94,3%]	<0,001
3 (n=30)	91,0%	[81,8% ; 95,7%]	<0,001

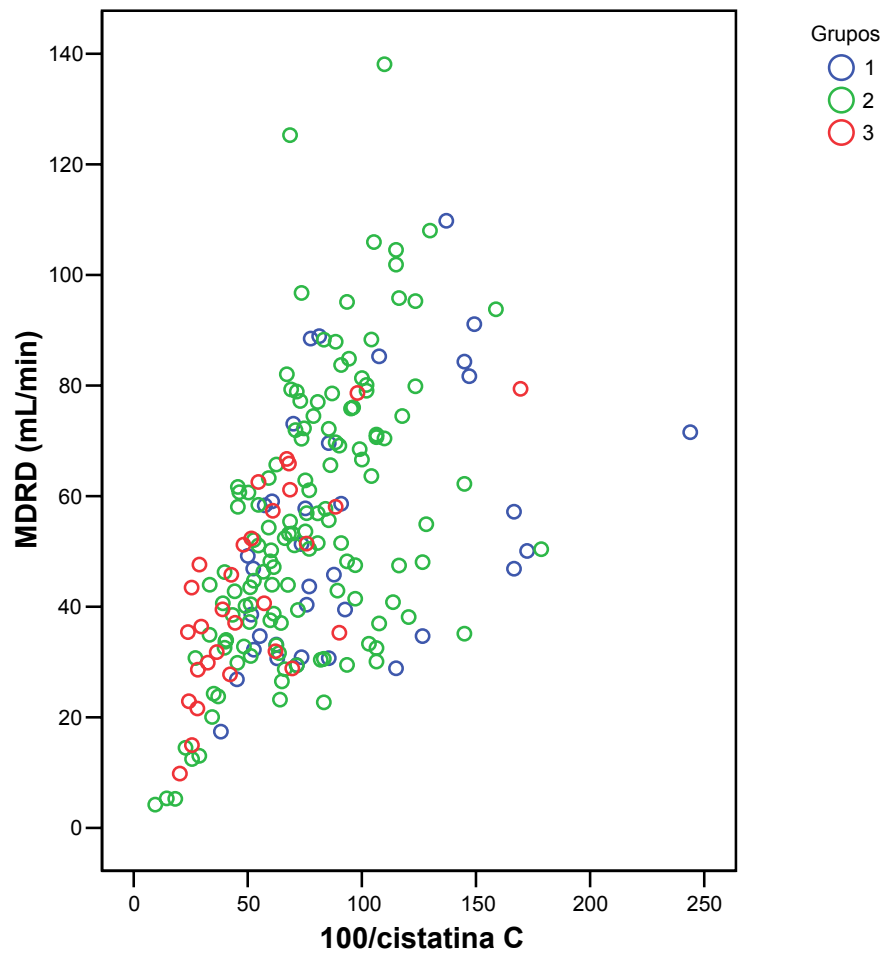
Observou-se menores correlações entre a recíproca da cistatina C e a filtração glomerular estimada pelas equações Nankivell, MDRD e CG, quando comparadas àquelas obtidas em relação à creatinina. As menores correlações foram observadas no grupo 1. Estas correlações são demonstradas nos gráficos 7,8 e 9.

Gráfico 7 - Correlação entre Nankivell e cistatina C de acordo com os grupos de estudo



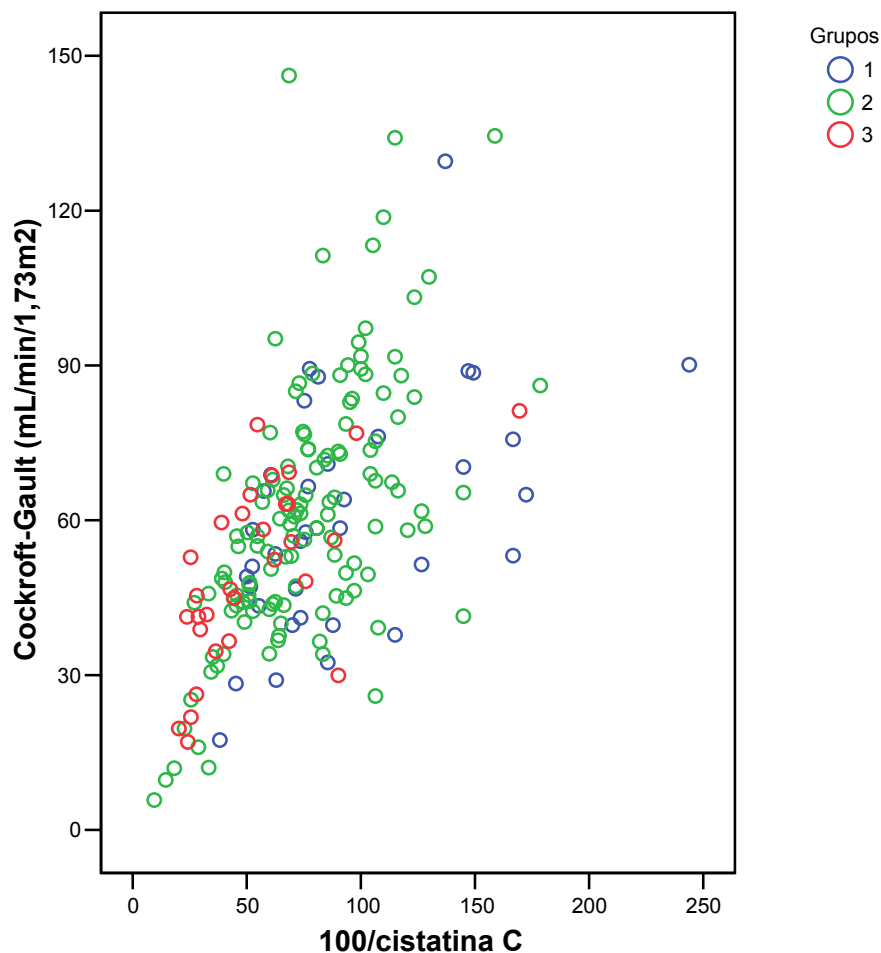
Grupos	Correlação	IC a 95%	p-valor
1 (n=34)	22,6%	[-12,1% ; 52,4%]	0,199
2 (n=125)	45,7%	[30,6% ; 58,6%]	<0,001
3 (n=28)	58,7%	[27,4% ; 78,8%]	0,001

Gráfico 8 - Correlação entre cistatina C e MDRD de acordo com os grupos de estudo



Grupos	Correlação	IC a 95%	p-valor
1 (n=36)	44,2%	[13,3% ; 67,3%]	0,007
2 (n=131)	53,0%	[39,4% ; 64,3%]	<0,001
3 (n=30)	70,9%	[46,8% ; 85,2%]	<0,001

Gráfico 9 - Correlação entre cistatina C e Cockcroft Gault 1,73 m² de acordo com os grupos de estudo



Grupos	Correlação	IC a 95%	p-valor
1 (n=36)	51,5%	[22,4% ; 72,1%]	0,001
2 (n=131)	59,9%	[47,6% ; 69,9%]	<0,001
3 (n=30)	63,0%	[34,9% ; 80,7%]	<0,001

A visualização destas diferenças quando tomadas em conjunto pode ser melhor obtida no gráfico 10 a e 10 b.

A creatinina sérica apresentou uma correlação homogênea com as equações de estimativa de RFG independentemente do esquema de imunossupressão usado.

Por outro lado, a Cistatina C apresentou correlações que variaram com a equação de estimativa de RFG assim como com o imunossupressor. A correlação entre Cistatina C e NK no grupo AZA foi bem menor que nas demais equações e nos diferentes grupos.

Gráfico 10 a - Correlação entre creatinina sérica e as equações para estimativa de RFG, NK, MDRD e CG nos grupos de imunossupressão

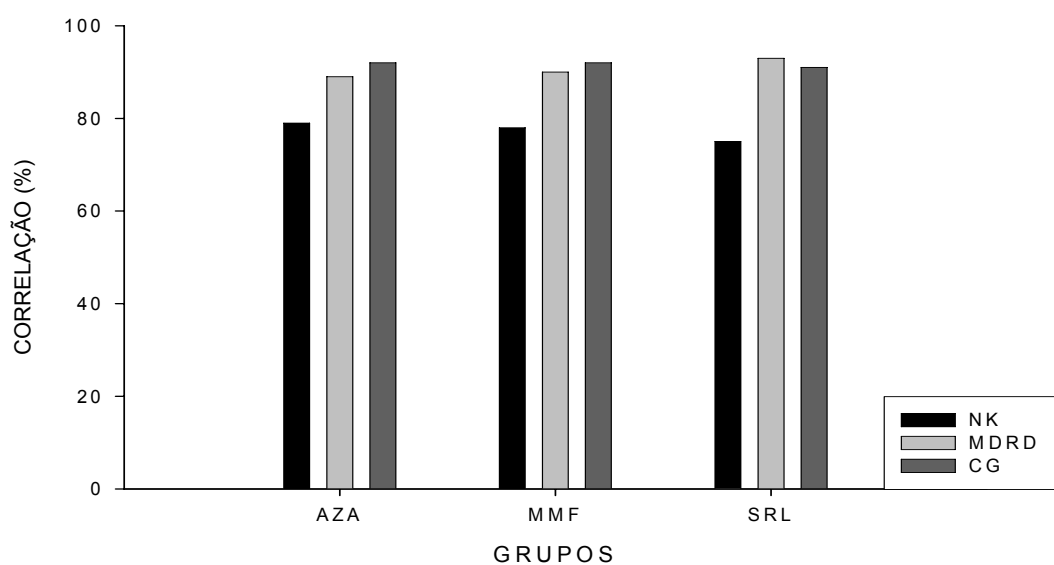
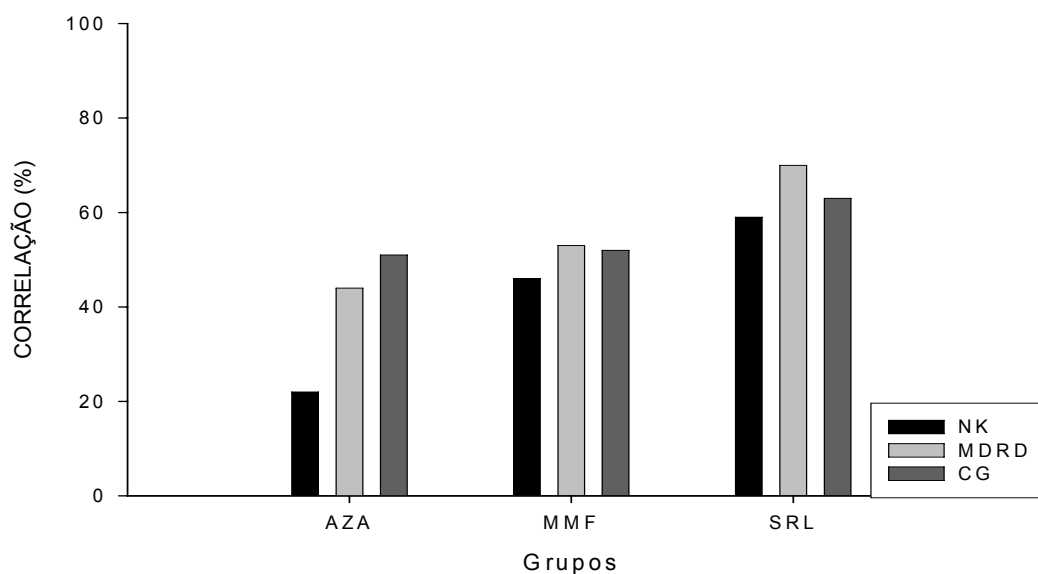


Gráfico 10 b - Correlação entre cistatina C sérica e as equações para estimativa de RFG, NK, MDRD e CG nos grupos de imunossupressão.



6. DISCUSSÃO

Neste estudo foi validada a técnica de dosagem de cistatina C em nosso centro e estudado o impacto dos diferentes imunossuppressores anti-metabólicos sobre a correlação da concentração sérica de Cistatina C e as equações que estimam a filtração glomerular.

Diversos estudos têm sugerido que a cistatina C seja um marcador de RFG superior à creatinina sérica (16, 17). Entretanto, nestes estudos foram utilizados diferentes métodos de dosagem, tais como; imunodifusão radial e enzima-imunoensaio, que, em geral, são técnicas que demandam maior tempo de execução, sendo menos precisos e, portanto, apresentam maior dificuldade para implantação na rotina laboratorial (49).

Neste trabalho, optamos pela padronização da metodologia imunonefelométrica por ser uma técnica rápida, específica, precisa e totalmente automatizada. Isto é uma vantagem importante na rotina laboratorial, permitindo maior agilidade na liberação dos resultados e contribuindo para a tomada de decisão na prática clínica.

Os testes desenvolvidos neste trabalho apresentaram níveis de precisão intra e interensaio compatíveis com os dados encontrados na literatura e naqueles descritos pelo fabricante do conjunto diagnóstico.

Os testes de validação para o ensaio nefelométrico realizados em nosso experimento mostraram coeficiente de variação intra-ensaio de 3,32 a

8,93% e interensaio de 5,38 a 8,20%. Em relação à amostra de soro, obteve-se CV intra e interensaio 8,93% e 8,20%, respectivamente. Finney et al. obtiveram nos mesmos testes CV de 3 a 5%, enquanto Kyhse-Andersen et al. descreveram de 2 a 3,2 % (49, 68). De acordo com as normas da ANVISA, variação de até 15% é considerada aceitável (63), (69) (70).

Este estudo observou que a cistatina C foi estável por até 3 dias armazenada à temperatura ambiente. Uma perda de até 10% pode ocorrer, se a amostra for armazenada por 7 dias, sem refrigeração. Quando as amostras foram conservadas à temperatura de 2 a 8°C, mantiveram-se estáveis por até 7 dias e com perdas inferiores a 0,13%. Quando as amostras foram mantidas a -20°C, a estabilidade foi de até 3 meses. Estes dados corroboram aqueles já demonstrados anteriormente por Finney et al. (49). Para avaliação do limite de detecção, o coeficiente de variação máximo aceitável é de 20% entre as leituras em replicata (69). Este critério foi reproduzido neste trabalho. Encontramos 8,25% de CV para o teste de limite de detecção.

A sensibilidade analítica deve apresentar coeficiente de variação menor de 15% para as duplicatas. Neste trabalho obteve-se CV de 14,79% para sensibilidade analítica (69).

O teste de recuperação mostrou que a perda foi mais pronunciada nos controles comerciais, os quais apresentavam concentração mais baixa que nas amostras de soro. Nossas análises recuperaram 86,7% da concentração inicial. Estes achados se encontram dentro dos limites aceitáveis de 80 a 120% (63).

Quando as amostras controle foram adicionadas, obteve-se índice de recuperação de 97 e 98% nos controles 1 e 2, respectivamente.

Para análise do controle da qualidade durante a execução dos ensaios, aplicaram-se os critérios de Westgard (67). Os resultados demonstraram que o método foi reproduzível em todos os ensaios realizados.

A execução do experimento na DLC-HCFMUSP, certificado pelas normas NBR ISO 9001:2000 e acreditado pelo Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos (PALC) da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial (SBPC/ML) (57), garantiu a qualidade dos ensaios durante o processo de validação analítica e dos resultados obtidos na segunda fase deste trabalho.

Após a validação da dosagem de cistatina C foi possível a execução da segunda fase do estudo que consistiu em avaliar se os imunossupressores que interferem na proliferação celular poderiam afetar a correlação entre a concentração sérica de cistatina C e o RFG.

Desse modo os imunossupressores azatioprina, micofenolato mofetil / micofenolato sódico e sirolimo foram escolhidos por serem anti-proliferativos freqüentemente usados em nosso centro.

No entanto, os grupos não se mostraram homogêneos. As principais diferenças encontradas com relação aos dados demográficos foram sexo, raça e tempo pós-transplante e em relação ao RFG foi uma menor taxa no grupo SRL.

Quanto ao tempo pós-transplante, as modificações nos esquemas imunossupressores, ocorridas nos últimos anos com a crescente substituição

do uso de azatioprina por micofenolato mofetil na terapêutica após o transplante recente, explicam o maior tempo pós-transplante neste grupo. Do mesmo modo, a prática de tratar nefropatia crônica do enxerto com SRL explica o menor RFG deste grupo.

As diferenças encontradas com relação às doses de imunossupressores utilizadas entre os grupos que usaram micofenolato mofetil são explicadas pelo menor perfil de tolerância à droga quando em associação com sirolimo, conforme já relatado previamente. Provavelmente a dose de MMF foi mais baixa por toxicidade medular e gastrointestinal (71-73).

Não há uma explicação clara para raça e sexo, porém os testes foram ajustados para estas diferenças.

Foi encontrada boa correlação entre a creatinina sérica e a medida do RFG estimada por todas as equações, este achado era esperado pelo fato destas medidas serem baseadas em variáveis demográficas, tais como idade, peso, altura, bem como na creatinina sérica.

Na análise de regressão linear a melhor correlação entre marcador de função renal e filtração glomerular estimada pelas diferentes equações foi obtida com a recíproca da creatinina. Por outro lado, a correlação entre as equações com a cistatina C foi baixa em todos os grupos de tratamento, mais expressivamente no grupo 1.

Quando avaliamos os resultados das medidas de filtração glomerular, conforme os grupos de imunossupressores ficou evidente o comportamento diferenciado da cistatina C quando comparada à creatinina nas correlações

com as equações que estimam o RFG. Isto já era esperado, uma vez que a creatinina mas não a Cistatina participa daquelas equações.

A intenção no entanto era avaliar o impacto do imunossupressor sobre a correlação da Cistatina com aquelas equações uma vez que estas são sempre as mesmas e não se alteram quando se altera a imunossupressão.

Outros fatores que modificam a concentração sérica da Cistatina C foram descritos literatura, tais como hormônios tireoidianos, uso de corticosteróides em altas doses ou presença de doença neoplásica (37, 74, 76).

Risch *et al.* compararam o uso de cistatina C em pacientes antes e depois da pulsoterapia com corticóides e verificaram que existe elevação significativa dos valores de concentração sérica de cistatina C após 3 dias do início do tratamento e esse acréscimo não estava relacionado a prejuízo de função renal. Bökenkamp *et al.* verificaram que a interferência com a dosagem de cistatina C pode estar relacionada diretamente com a droga imunossupressora utilizada ou com algum metabólito produzido pela imunossupressão (74, 75).

Na nossa casuística as doses de corticosteróides foram em média baixas e semelhantes, o que indica que este fator provavelmente não interferiu.

No nosso estudo não encontramos diferenças nas correlações de Cistatina C e RFG de acordo com o anti-proliferativo usado.

Houve uma menor correlação de Cistatina C e NK no grupo AZA o que não reproduzido nas demais equações.

É possível que este comportamento diferenciado da cistatina C, segundo a imunossupressão, possa decorrer de interferência da azatioprina ou de seus metabólitos na produção ou metabolização da cistatina C. A Azatioprina interfere no metabolismo nuclear de todas as células enquanto que os modernos imunossupressores (SRL e MMF) tem maior ação sobre a proliferação linfocitária.

Outros estudos serão necessários para elucidação dos mecanismos envolvidos, e dessa forma a aplicação clínica da cistatina C em pacientes sob esta imunossupressão pode ser limitada.

Uma limitação do estudo foi não termos utilizado uma medida direta de filtração glomerular cuja mensuração fosse independente da creatinina sérica. Por isso, não podemos afirmar de forma definitiva a inferioridade da Cistatina C em relação à creatinina sérica enquanto marcadores de filtração glomerular.

Este trabalho sugere que as drogas imunossupressoras anti-proliferativas parecem não interferir na determinação do nível sérico de cistatina C independente do RFG.

A utilização de uma metodologia com mensuração direta da filtração glomerular independente de creatinina é imprescindível para a avaliação do desempenho da cistatina C em diferentes esquemas imunossupressores.

7. CONCLUSÕES

- 1- A cistatina C atendeu todos os critérios preconizados pelas agências regulatórias para validação do método. Sua implantação na rotina laboratorial na DLC é factível.
- 2 - A recíproca da creatinina apresentou a melhor correlação com as equações que estimam a função renal independente do grupo de imunossupressor.
- 3 - A cistatina C apresentou menores correlações com estas equações em todos os grupos de imunossupressores.

8. REFERÊNCIAS

1. 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 Jul;62(1):311-8.
2. Schwartz GJ, Furth SL. Glomerular filtration rate measurement and estimation in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 2007 Jan 10.
3. 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 Apr; 61(4):1453-61.
4. Levey AS, Berg RL, Gassman JJ, Hall PM, Walker WG. Creatinine filtration, secretion and excretion during progressive renal disease. Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) Study Group. *Kidney Int Suppl.* 1989 Nov;27:S73-80.
5. Filler G, Lepage N. Should the Schwartz formula for estimation of GFR be replaced by cystatin C formula? *Pediatr Nephrol.* 2003 Oct; 18(10):981-5.
6. Gaspari F, Perico N, Remuzzi G. Measurement of glomerular filtration rate. *Kidney Int Suppl.* 1997 Dec;63:S151-4.
7. Willems HL, Hilbrands LB, van de Calsejde JF, Monnens LA, Swinkels DW. Is serum cystatin C the marker of choice to predict glomerular filtration rate in paediatric patients? *Ann Clin Biochem.* 2003 Jan;40 (Pt 1):60-4.
8. 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 Oct; 18(10):2024-31.
9. Nankivell BJ, Gruenewald SM, Allen RD, Chapman JR. Predicting glomerular filtration rate after kidney transplantation. *Transplantation.* 1995 Jun 27;59(12):1683.

10. Rodrigo E, de Francisco AL, Escallada R, Ruiz JC, Fresnedo GF, Pinera C, et al. Measurement of renal function in pre-ESRD patients. *Kidney Int Suppl.* 2002 May(80):11-7.
11. Swedko PJ, Clark HD, Paramsothy K, Akbari A. Serum creatinine is an inadequate screening test for renal failure in elderly patients. *Arch Intern Med.* 2003 Feb 10;163(3):356-60.
12. Shimizu-Tokiwa A, Kobata M, Ito H, Kobayashi N, Shou I, Funabiki K, et al. Serum cystatin C is a more sensitive marker of glomerular function than serum creatinine. *Nephron.* 2002 Sep;92(1):224-6.
13. 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 Sep;54(3):203-9.
14. 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 Aug;40(2):221-6.
15. Shlipak MG, Praught ML, Sarnak MJ. Update on cystatin C: new insights into the importance of mild kidney dysfunction. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2006 May;15(3):270-5.
16. Grubb A. Diagnostic value of analysis of cystatin C and protein HC in biological fluids. *Clin Nephrol.* 1992;38 Suppl 1:S20-7.
17. 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 Apr;45(2):97-101.
18. Mares J, Stejskal D, Vavrouskova J, Urbanek K, Herzig R, Hlustik P. Use of cystatin C determination in clinical diagnostics. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2003 Dec;147(2):177-80.
19. Finney H, Williams AH, Price CP. Serum cystatin C in patients with myeloma. *Clin Chim Acta.* 2001 Jul 5;309(1):1-6.
20. 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 Jan;38(1):1-8.

21. Bouvet Y, Bouissou F, Coulais Y, Seronie-Vivien S, Tafani M, Decramer S, et al. GFR is better estimated by considering both serum cystatin C and creatinine levels. *Pediatr Nephrol.* 2006 Sep;21(9):1299-306.
22. Bokenkamp A, Domanetzki M, Zinck R, Schumann G, Brodehl J. Reference values for cystatin C serum concentrations in children. *Pediatr Nephrol.* 1998 Feb;12(2):125-9.
23. Finney H, Newman DJ, Price CP. Adult reference ranges for serum cystatin C, creatinine and predicted creatinine clearance. *Ann Clin Biochem.* 2000 Jan;37 (Pt 1):49-59.
24. 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 Apr;65(4):1416-21.
25. Abrahamson M, Grubb A. Increased body temperature accelerates aggregation of the Leu-68-->Gln mutant cystatin C, the amyloid-forming protein in hereditary cystatin C amyloid angiopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Feb 15;91(4):1416-20.
26. Dworkin LD. Serum cystatin C as a marker of glomerular filtration rate. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2001 Sep;10(5):551-3.
27. Bokenkamp A, Herget-Rosenthal S, Bokenkamp R. Cystatin C, kidney function and cardiovascular disease. *Pediatr Nephrol.* 2006 Sep;21(9):1223-30.
28. Mussap M, Ruzzante N, Varagnolo M, Plebani M. Quantitative automated particle-enhanced immunonephelometric assay for the routinary measurement of human cystatin C. *Clin Chem Lab Med.* 1998 Nov;36(11):859-65.
29. Laterza OF, Price CP, Scott MG. Cystatin C: an improved estimator of glomerular filtration rate? *Clin Chem.* 2002 May;48(5):699-707.
30. 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 Dec;45(12):2243-9.
31. Bokenkamp A, Grabensee A, Stoffel-Wagner B, Hasan C, Henne T, Offner G, et al. The beta2-microglobulin/cystatin C ratio--a potential marker of post-transplant lymphoproliferative disease. *Clin Nephrol.* 2002 Dec;58(6):417-22.

32. Shlipak MG, Wassel Fyr CL, Chertow GM, Harris TB, Kritchevsky SB, Tylavsky FA, et al. Cystatin C and mortality risk in the elderly: the health, aging, and body composition study. *J Am Soc Nephrol.* 2006 Jan; 17(1):254-61.
33. Kilpatrick ES, Keevil BG, Addison GM. Does adjustment of GFR to extracellular fluid volume improve the clinical utility of cystatin C? *Arch Dis Child.* 2000 Jun;82(6):499-502.
34. 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 Jul;36(1):29-34.
35. Risch L, Huber AR. Assessing glomerular filtration rate in renal transplant recipients by estimates derived from serum measurements of creatinine and cystatin C. *Clin Chim Acta.* 2005 Jun;356(1-2):204-11.
36. Gupta-Malhotra M, Levine DM, Cooper RS, Zabriskie JB. Decreased levels of cystatin C, an inhibitor of the elastolytic enzyme cysteine protease, in acute and subacute phases of kawasaki disease. *Cardiology.* 2003;99(3):121-5.
37. Fricker M, Wiesli P, Brandle M, Schwegler B, Schmid C. Impact of thyroid dysfunction on serum cystatin C. *Kidney Int.* 2003 May;63(5):1944-7.
38. O'Riordan S, Ouldred E, Brice S, Jackson SH, Swift CG. Serum cystatin C is not a better marker of creatinine or digoxin clearance than serum creatinine. *Br J Clin Pharmacol.* 2002 Apr;53(4):398-402.
39. Seliger SL, Longstreth WT, Jr., Katz R, Manolio T, Fried LF, Shlipak M, et al. Cystatin C and subclinical brain infarction. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Dec;16(12):3721-7.
40. 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 Jun;34(4):1152-8.
41. 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 Aug;38(2):310-6.
42. Strevens H, Wide-Svensson D, Grubb A, Hansen A, Horn T, Ingemarsson I, et al. Serum cystatin C reflects glomerular endotheliosis in normal, hypertensive and pre-eclamptic pregnancies. *Bjog.* 2003 Sep;110(9):825-30.

43. Kouri T, Harmoinen A, Laurila K, Ala-Houhala I, Koivula T, Pasternack A. Reference intervals for the markers of proteinuria with a standardised bed-rest collection of urine. *Clin Chem Lab Med*. 2001 May;39(5):418-25.
44. Fischbach M, Graff V, Terzic J, Bergere V, Oudet M, Hamel G. Impact of age on reference values for serum concentration of cystatin C in children. *Pediatr Nephrol*. 2002 Feb;17(2):104-6.
45. Page MK, Bukki J, Luppa P, Neumeier D. Clinical value of cystatin C determination. *Clin Chim Acta*. 2000 Jul;297(1-2):67-72.
46. 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 Oct;3(10):1815-22.
47. Chantrel F, Agin A, Offner M, Koehl C, Moulin B, Hannedouche T. Comparison of cystatin C versus creatinine for detection of mild renal failure. *Clin Nephrol*. 2000 Nov;54(5):374-81.
48. Jernberg T, Lindahl B, James S, Larsson A, Hansson LO, Wallentin L. Cystatin C: a novel predictor of outcome in suspected or confirmed non-ST-elevation acute coronary syndrome. *Circulation*. 2004 Oct 19;110(16):2342-8.
49. 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 Jun;43(6 Pt 1):1016-22.
50. Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron*. 1976;16(1):31-41.
51. Filler G, Foster J, Acker A, Lepage N, Akbari A, Ehrich JH. The Cockcroft-Gault formula should not be used in children. *Kidney Int*. 2005 Jun;67(6):2321-4.
52. Poge U, Gerhardt T, Stoffel-Wagner B, Palmedo H, Klehr HU, Sauerbruch T, et al. Cystatin C-based calculation of glomerular filtration rate in kidney transplant recipients. *Kidney Int*. 2006 Jul;70(1):204-10.
53. Pierrat A, Gravier E, Saunders C, Caira MV, Ait-Djafer Z, Legras B, et al. Predicting GFR in children and adults: a comparison of the Cockcroft-Gault, Schwartz, and modification of diet in renal disease formulas. *Kidney Int*. 2003 Oct;64(4):1425-36.

54. Peralta CA, Ziv E, Katz R, Reiner A, Burchard EG, Fried L, et al. African ancestry, socioeconomic status, and kidney function in elderly African Americans: a genetic admixture analysis. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Dec;17(12):3491-6.
55. Newman DJ, Thakkar H, Edwards RG, Wilkie M, White T, Grubb AO, et al. Serum cystatin C: a replacement for creatinine as a biochemical marker of GFR. *Kidney Int Suppl*. 1994 Nov;47:S20-1.
56. Medicare, Medicaid, and Clinical Laboratories Improvement Act (CLIA) patient confidentiality rules; proposed rule. *Fed Regist*. 1988 Mar 31;53(62):10404-6.
57. Técnicas ABdN. NBR-ISO 9001: Sistema de gestão da qualidade, requisitos. Rio de Janeiro 2000.
58. NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Proposed Guideline, Precision Performance of Clinical Chemistry Devices - EP5 - T2. PA: villanova; 1999.
59. CLIA CLIAo. Final Rule Laboratory Requirements Federal Register. 1992. p. 7002 -288.
60. Keitges PW. NCCLS: developing voluntary consensus standards for the clinical laboratory. *Pathologist*. 1979 Feb;33(2):86-8.
61. Hutchens TT. NCCLS: objectives, organization, and activities. *Pathologist*. 1981 Nov;35(11):605-8.
62. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline - EP-5 A2. 2ª ed. Wayne; 2006. p. 48.
63. "Resolução n.899, 29 de maio de 2003" determina a publicação do Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasil; 2003.
64. National Committee on Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices; approved guideline - EP5 - T2. . Wayne; 1999. p. 43p.
65. Clinical Laboratory Improvement Act program free collection - HCFA. Final rule with comment. *Fed Regist*. 1992;57(40):7188-218.
66. 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 Mar 16;130(6):461-70.

67. Westgard JO BP HM. A multiple-rule shewhart chart for quality control. Clin Chem. 1981;27:493-501.
68. 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 Oct;40(10):1921-6.
69. Brasil. Ministério da Saúde . Agência Nacional de Vigilância Sanitária . Medicamentos ICdBL. Resolução n.899, 29 de maio de 2003, determina a publicação do "Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos". [disponível em : www.anvisa.gov.br] 2003 [cited 2003 23 de junho de 2003]; Available from:
70. Painter P. Clinical Chemistry. Laboratory managment & Clinical correlations: Lippincott Willians & Wilkings. 2002. p. 122 - 51.
71. Diekmann F, Waiser J, Fritsche L, Dragun D, Neumayer HH, Budde K. Conversion to rapamycin in renal allograft recipients with biopsy-proven calcineurin inhibitor-induced nephrotoxicity. Transplant Proc. 2001 Nov-Dec;33(7-8):3234-5.
72. Egidi MF, Cowan PA, Naseer A, Gaber AO. Conversion to sirolimus in solid organ transplantation: a single-center experience. Transplant Proc. 2003 May;35(3 Suppl):131S-7S.
73. Flechner SM, Feng J, Mastroianni B, Savas K, Arnovitz J, Moneim H, et al. The effect of 2-gram versus 1-gram concentration controlled mycophenolate mofetil on renal transplant outcomes using sirolimus-based calcineurin inhibitor drug-free immunosuppression. Transplantation. 2005 Apr 27;79(8):926-34.
74. Risch L, Herklotz R, Blumberg A, Huber AR. Effects of glucocorticoid immunosuppression on serum cystatin C concentrations in renal transplant patients. Clin Chem. 2001 Nov;47(11):2055-9.
75. 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 Oct;45(10):1866-8.
76. 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 Dec;44(12):2556-7.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)