

# Determinación de cistatina C como marcador de función renal en pacientes normo albuminúricos con Diabetes Mellitus tipo 2

*Determination of cystatin C as a marker of renal function in normoalbuminuric patients with Type 2 Diabetes Mellitus*

Alcívar Vásquez Juan<sup>1</sup>, Puig Gilbert Carlos<sup>1</sup>, Jeani Wong Lama<sup>1</sup>, Flor Miguel<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, Facultad de Ciencias Médicas, Guayaquil, Ecuador

<sup>2</sup> Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, Facultad de Ciencias Médicas; Hospital "Luis Vernaza", Guayaquil, Ecuador

## RESUMEN

**Antecedentes:** la identificación temprana del deterioro de la función renal es crucial en los pacientes diabéticos. Clínicamente la cistatina C sérica podría ser el indicador más sensible de tasa de filtrado glomerular. **Objetivo:** proponer el uso de cistatina C como prueba de rutina para evaluar la función renal en pacientes diabéticos tipo 2. **Metodología:** se realizó un estudio observacional de corte transversal en 115 pacientes diabéticos tipo 2 normo albuminúricos, estableciendo la tasa de filtrado glomerular con valores de cistatina C y fórmula de Cockcroft-Gault. A aquellos con un filtrado glomerular < 60 ml/min se realizó depuración de creatinina en orina de 24 horas; y se comparó los resultados con el programa estadístico SPSS 17, presentando los datos en tablas de contingencia con análisis de riesgo y test de significancia de X<sup>2</sup>. **Resultados:** la tasa de filtrado glomerular obtenida con cistatina C, tuvo un valor promedio de 99ml/min±19.07, mientras que la de Cockcroft-Gault un valor de 79.85ml/min±23.63 reflejando mejor correlación con aclaramiento de creatinina en orina de 24 horas que obtuvo un valor de 74.95ml/min±37.41. Al relacionar los valores con la depuración de creatinina en orina de 24 horas, no hubo una relación significativa entre ambos parámetros (p=0.14). **Conclusión:** la tasa de filtrado glomerular con cistatina C presenta una gran dispersión en la correlación con la depuración de creatinina en orina de 24 horas; este hecho, junto a diversos factores que influyen en su variabilidad, y el mayor coste de su determinación, hacen poco justificable su uso para valorar función renal.

**Palabras clave:** Cistatina C. Creatinina. Nefropatía Diabética. Diabetes Mellitus Tipo 2. Tasa de Filtrado Glomerular. Albuminuria.

## ABSTRACT

**Background:** early identification of renal function impairment is crucial in diabetic patients. Clinically, serum cystatin C may be the most sensitive indicator of the glomerular filtration rate. **Objective:** to propose the use of cystatin C as a routine test to evaluate kidney function in type 2 diabetic patients. **Methodology:** an observational cross sectional study was done with 115 normoalbuminuric type 2 diabetic patients, establishing the glomerular filtration rate using cystatin C values and the Cockcroft-Gault formula. For those with a glomerular filtration rate <60 ml/min, a 24-hour creatinine clearance in urine test was performed, and the results were compared using SPSS 17, presenting the data in contingency tables with risk analysis and significance tests of X<sup>2</sup>. **Results:** the glomerular filtration rate obtained with cystatin C had a mean value of 99ml/min±19.07, while that obtained with the Cockcroft-Gault formula was 79.85ml/min±23.63, which showed better correlation with the 24-hour creatinine clearance test with a value of 74.95ml/min±37.41. Neither parameter showed a significant relationship with the 24-hour creatinine clearance test values (p = 0.14). **Conclusion:** the glomerular filtration rate obtained using cystatin C has a large dispersion when correlated with the 24-hour creatinine clearance in urine test values. This fact, together with the different factors influencing its variability and the higher cost of its determination; result in little justification for its use in assessing renal function.

**Keywords:** Cystatin C. Creatinine. Diabetic nephropathy. Type 2 Diabetes Mellitus. Glomerular filtration rate. Albuminuria.

Correspondencia a:

Md. Juan Alcívar Vásquez

Correo electrónico: carlospuig@hotmail.com

Recibido: 30 de septiembre de 2011

Aceptado: 23 de noviembre de 2011

## Introducción

La valoración de la función renal en los pacientes con diabetes es clave para la identificación temprana y el manejo adecuado de la nefropatía diabética, pero durante las etapas iniciales su progresión es silenciosa y su detección con las pruebas de rutina es difícil.

Sabiendo que, aun cuando el daño renal no se puede revertir, su deterioro puede disminuirse con la intervención temprana en el control de la presión arterial, restricción protéica en la dieta y control más estricto de la glicemia evitando complicaciones.<sup>1,2,3</sup>

El mejor método para valorar la función renal es la tasa de filtración glomerular, que se reduce antes de la aparición de la sintomatología, si bien su estimación es exacta mediante la administración de sustancias exógenas, éstas son de difícil uso en la práctica clínica cotidiana.

Actualmente se pregona el uso de las fórmulas de Cockcroft-Gault y de MDRD para estimar la tasa de filtración glomerular, sin embargo estas fórmulas están sujetas a variables, entre ellas, peso, masa muscular, edad, sexo y raza; por otro lado, la cuantificación de sustancias endógenas como proteínas en orina, creatinina y depuración de esta última en orina de 24 horas es lo más utilizado para valorar la tasa de filtrado glomerular (TFG). Esta última, que a pesar de su gran utilidad, presenta limitaciones por la técnica en la recolección de la muestra.<sup>4,5,6</sup>

La mayoría de sociedades médicas recomiendan usar los niveles de microalbuminuria para el seguimiento de la función renal en los pacientes con diabetes, sin embargo, individuos normoalbuminúricos no están exentos de desarrollarla y otros con microalbuminuria, no necesariamente están destinados a presentar nefropatía.<sup>7</sup>

Recientemente se ha propuesto como marcador de función renal a la cistatina C sérica. Ésta es una proteína no glicosilada producida por todas las células nucleadas del organismo; filtrada libremente por los glomérulos y es reabsorbida y metabolizada en los túbulos renales.

Sus niveles séricos no se ven influenciados por el género, edad, raza ni índice de masa corporal, contrariamente a lo ocurrido con la creatinina sérica, haciendo de ésta última un parámetro insensible a leves cambios en la TFG por su amplio rango de referencia.<sup>8,9</sup>

El objetivo de este estudio es proponer el uso de cistatina C como prueba de rutina para evaluar la función renal en pacientes diabéticos tipo 2.

## Metodología

Se realizó un estudio observacional transversal en el período de febrero a abril de 2010, en pacientes voluntarios de la Asociación de Diabéticos, hospital "Rodríguez Zambrano" de Manta, hospital "Verdi Cevallos Balda" de Portoviejo y hospital regional IESS "Dr. Teodoro Maldonado Carbo" de la ciudad de Guayaquil; recogiendo datos de edad, peso, sexo, antecedentes patológicos, hábitos farmacológicos y tiempo de evolución de la enfermedad.

Se incluyeron pacientes con antecedentes de diabetes mellitus tipo 2, confirmada clínicamente y por indicadores de laboratorio de por lo menos dos años de evolución, de cualquier sexo, entre 18 y 95 años, sin antecedentes de nefropatía, eutiroides y pacientes con microalbuminuria menor o igual a 20.0ug/min.

Se excluyeron del estudio pacientes con insuficiencia renal de cualquier etiología, diabetes mellitus tipo 1, enfermedad tiroidea, enfermedad cardiovascular conocida (insuficiencia cardíaca, enfermedad valvular), edad fuera del rango de inclusión, aquellos con antecedentes de trasplante renal, neoplasias, aquellos tratados con glucocorticoides, estatinas, y obviamente fueron excluidos aquellos pacientes que se encontraban catalogados como disglucémicos.

Para el estudio se tomaron muestras de sangre y orina, se determinaron niveles de glicemia en ayunas con el método enzimático de glucosa oxidasa, creatinina sérica con el método colorimétrico de Jaffé, ambas pruebas en el analizador Hitachi 917.

Se cuantificó micro albuminuria en muestra de orina al azar mediante el método de inmunoquimioluminiscencia procesado en el analizador Inmulite I.

A aquellos pacientes que tuvieron niveles de microalbuminuria dentro de los rangos normales se les realizó la cuantificación de cistatina C por el método de inmunoturbidimetría potenciada con partículas en el analizador Hitachi 917; luego se calculó la tasa de filtrado glomerular según valores de cistatina C y con la fórmula de Cockcroft-Gault y a aquellos pacientes que tuvieron una tasa de filtrado glomerular <60 ml/min, se les realizó aclaramiento de creatinina en orina de 24 horas.

Se compararon y analizaron los resultados obtenidos en el programa estadístico SPSS 17 y se presentaron los datos en tablas de contingencia, test de significancia X<sup>2</sup>, curvas ROC, regresión lineal para correlacionar la tasa de filtrado glomerular obtenida mediante la fórmula de la cistatina C y Cockcroft-Gault con el resultado obtenido de la depuración de creatinina en orina de 24 horas y diagramas de caja.

### Resultados

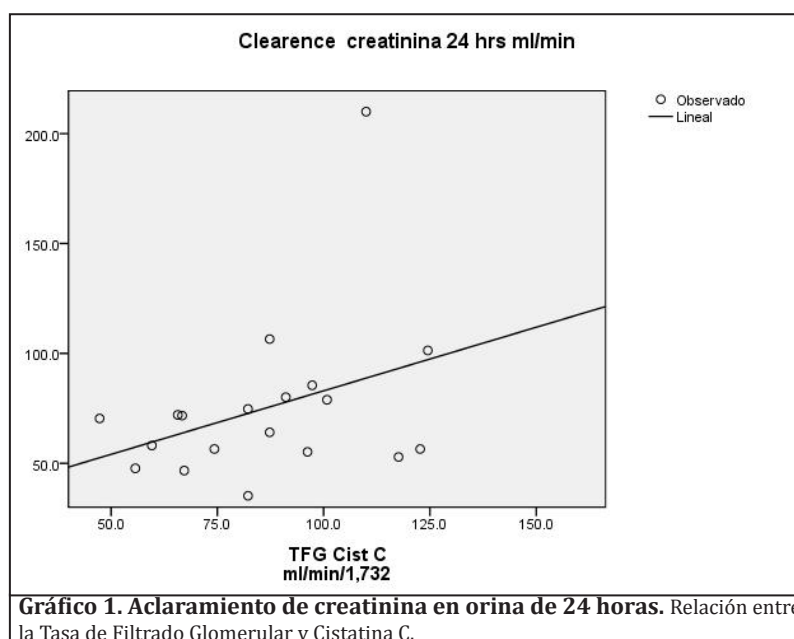
Después de analizar las muestras de 115 pacientes, los resultados obtenidos en el estudio muestran mayor cantidad de pacientes de sexo femenino (82.6%), en comparación a la población masculina

que representó un 17.4% de los pacientes, con una significancia de 0.035 (p<0.05), al igual que en esta población el 57.4% tienen menos de 60 años. La edad promedio de los pacientes fue de 60.83±10.13 (tabla 1).

El 57.4% de los pacientes presentaron niveles elevados de glucosa. El 34.8% de los pacientes presentaron valores por encima del punto de corte en creatinina mientras el 69.6% lo hicieron para cistatina C.

El valor promedio de creatinina fue de 0.79±0.15 mg/dL y el de cistatina C fue de 0.88±0.19 mg/dL, sin embargo, el punto de corte de creatinina fue superior al de cistatina C (0.84 vs 0.76 en mujeres y 0.86 vs 0.85 en hombres) (tabla 1).

Tabla 1. Características de la población		
Variables	Media	DS
Edad	60.83	10.13
Glucosa mg/dL	143.63	70.85
Creatinina mg/dL	0.79	0.15
Microalbuminuria	5.92	4.2
Cistatina C mg/L	0.88	0.19
Clearence de creatinina	74.95	37.41
TFG Cist C ml/min/1.732	99.63	19.07
Cockroft-Gault ml/min	79.85	23.63
Peso kg.	64.17	12.27
Talla m	1.53	0.083
IMC	27.23	4.43



La tasa de filtrado glomerular obtenida con cistatina C, tuvo un valor promedio de 99ml/min±19.07 (gráfico 1); y la de Cockcroft-Gault ml/min de 79.85±23.63, mostrando esta última mejor correlación con la depuración de creatinina en orina de 24 horas que obtuvo un valor de 74.95±37.41 (tabla 2) (gráfico 2).

Al realizar la comparación entre los valores medios de creatinina y cistatina C en cuanto a edad y sexo, se observaron niveles más elevados de ambas en pacientes entre los 70-79 años, la cistatina C superando a la creatinina en este grupo (1.06±0.20 vs 0.90±0.15; p<0.001).

Tabla 2. Valores de cistatina y creatinina según edad y sexo				
VARIABLES	N (115)	Cistatina C (mg/L) media±DS	Creatinina (mg/L) media±DS	p
<b>Edad</b>				
30-39	3	0.67±0.06	0.75±0.34	ns
40-49	9	0.74±0.12	0.72±0.10	ns
50-59	37	0.85±0.19	0.78±0.13	0.041
60-69	44	0.87±0.14	0.78±0.14	0.012
70-79	20	1.06±0.20	0.90±0.15	<0.01
>= 80	2	0.95±0.03	0.74±0.11	0.28
<b>Sexo</b>				
Masculino	20	0.86±0.12	0.95±0.10	0.38
Femenino	95	0.88±0.20	0.76±0.14	<0.01
<b>Total</b>	<b>115</b>	<b>0.88±0.19</b>	<b>0.79±0.15</b>	<b>&lt;0.01</b>
ns: sin diferencias significativas.				

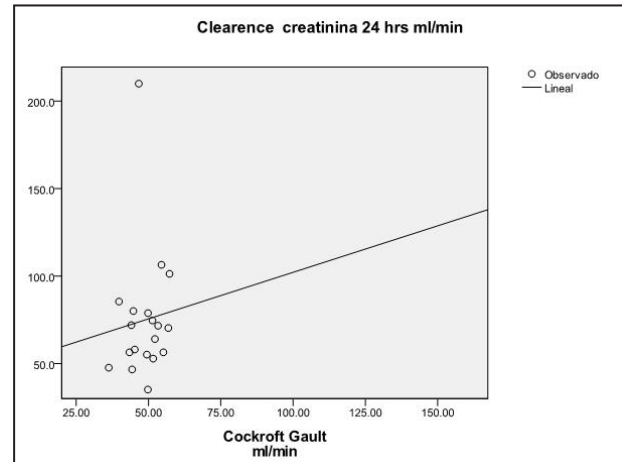


Gráfico 2. Aclaramiento de creatinina en orina de 24 horas. Relación entre la Tasa de Filtrado Glomerular Cockcroft-Gault.

Se observaron valores mayores de creatinina frente a la cistatina C en la población masculina, sin que exista una diferencia significativa entre ambas (0.86±0.12 vs 0.95±0.10), mientras que en las mujeres, los valores de cistatina C superaron a los valores de creatinina (0.86±0.12 vs. 0.95±0.10) (gráfico 3a y 3b).

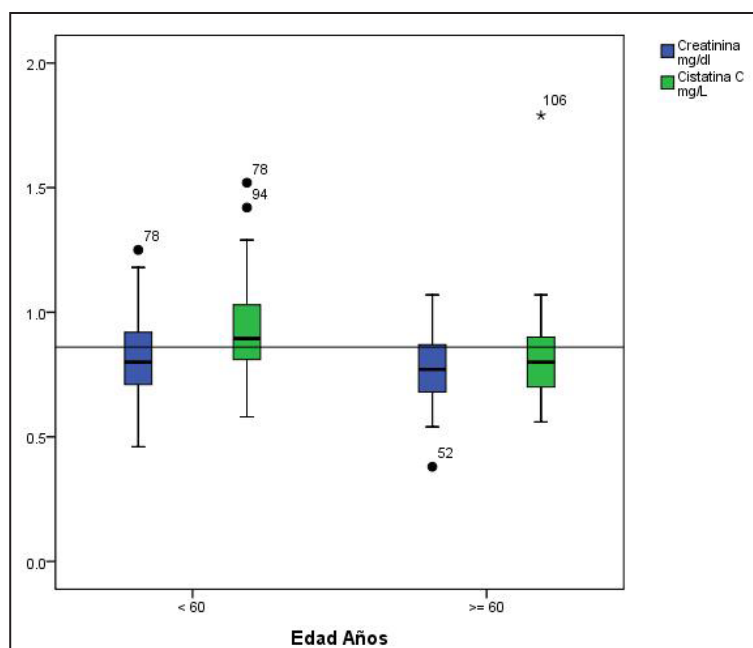


Gráfico 3a. Valores de cistatina C y creatinina según la edad.

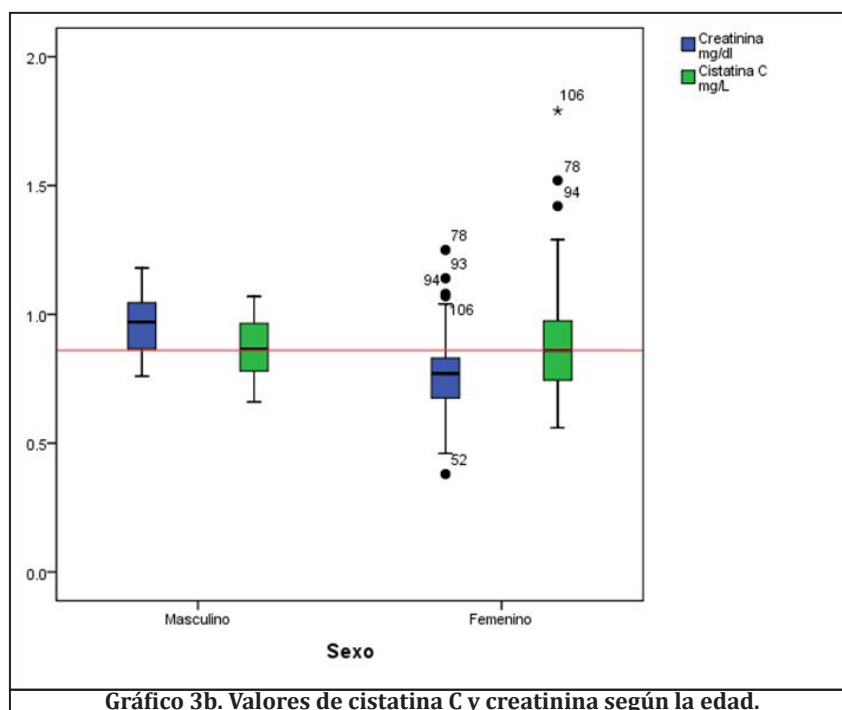


Gráfico 3b. Valores de cistatina C y creatinina según la edad.

Sin embargo, a pesar que los valores de cistatina C fueron mayores a los valores de creatinina en la mayoría de los casos, éstos se mantuvieron dentro de los valores considerados normales.

Se construyeron curvas ROC para determinar la capacidad diagnóstica de la tasa de filtrado glomerular estimada mediante las fórmulas de cistatina C y Cockcroft-Gault, donde se demostró que la fórmula de Cockcroft-Gault presentó mayor área bajo la curva que la primera; con mayor especificado sin presentar diferencias estadísticas. Al relacionar los valores de la tasa de filtrado glomerular obtenida con cistatina C y la depuración de creatinina en orina de 24 horas, no se encontró una relación significativa entre ambos parámetros ( $p=0.14$ ).

## Discusión

El deterioro renal en su etapa inicial cursa de manera asintomática, por lo que su detección representa un gran reto para los médicos. La tasa de filtrado glomerular es mundialmente utilizado como el parámetro de valoración de función renal en la población de riesgo, como en el caso de los pacientes con diabetes, sin embargo en la actualidad ésta se estima utilizando niveles de creatinina sérica, la cual se ve afectada por algunas variables y es insensible a pequeñas disminuciones del filtrado glomerular, alterándose recién cuando la filtración glomerular desciende al 50% su valor

normal.<sup>10,11,12</sup> Esta limitación hace de gran necesidad buscar marcadores más sensibles como la cistatina C, que según evidencia de estudios recientes supera a la creatinina sérica en este ámbito.

Este estudio mostró una variabilidad pequeña entre los géneros para la determinación de cistatina C que no resultó significativa, por lo que se puede concluir que el resultado en la prueba no es dependiente del género.

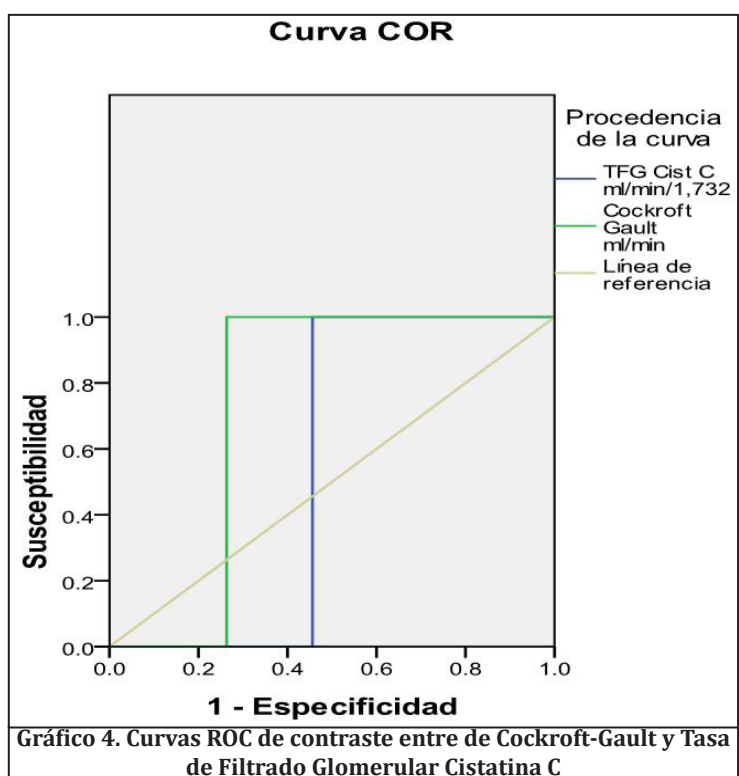
En cuanto a la edad, se observó niveles mayores de cistatina C a partir de los 40 años, correlacionándose a lo descrito en la literatura, mostrando los valores más elevados en sujetos mayores de 70 años por la disminución fisiológica de la función renal. A pesar de ello, la cistatina C no es una prueba cuyo valor sea dependiente de la edad.

En cuanto a los niveles de creatinina sérica, éstos mostraron similitud en todas las edades, aumentando levemente en pacientes entre 70 y 80 años y una ligera disminución en los pacientes mayores de 80 años con una media mayor en el sexo masculino. Esto corrobora lo descrito en otros estudios, que mencionan que la creatinina sérica varía de acuerdo a la edad, género y masa muscular, y no es una prueba sensible para detectar pequeñas disminuciones de la tasa de filtrado glomerular en pacientes asintomáticos.<sup>13,14,15</sup>

Estudios sugieren que la concentración sérica de cistatina C tiene buena correlación con la depuración de creatinina en orina de 24 horas, método que está sujeto a las imprecisiones de la técnica de recolección y diversas interferencias analíticas, lo que ha precipitado la realización de diversas investigaciones en los últimos años valorando este nuevo marcador renal, sin embargo, en este estudio dichos valores no presentaron una correlación significativa.<sup>16,17,18</sup>

Respecto a trabajos con pacientes con diabetes, la mayoría tipo 2, los estudios son controvertidos.

Entre otros Mussap y cols. comentan la mayor especificidad de la cistatina C en la evaluación de la función renal, resaltando la falta de precisión de los marcadores tradicionales en la detección de cambios tempranos del filtrado glomerular y en la monitorización del curso de la nefropatía diabética, en esta investigación se presentaron valores de especificidad para cistatina C de 61%, mientras que la creatinina presentó una especificidad de 85%, resultando más conveniente, lo que se puede apreciar claramente en la curva ROC; sin embargo ninguna de las dos presentaron buena sensibilidad (gráfico 4).<sup>22,23</sup>



Los resultados del presente estudio demuestran que, aunque libre de influencias por la edad, sexo, la tasa de filtrado glomerular con cistatina C presenta una gran dispersión en la correlación con la depuración de creatinina en orina de 24 horas. Este hecho, unido a la incertidumbre de los factores que influyen en su variabilidad, y el mayor coste de su determinación, hacen poco justificable su uso como estimador del filtrado glomerular, contrastando con lo expuesto por Murray que indica que la monitorización de los valores de cistatina C en pacientes de riesgo podría anticiparse en uno o dos días a la creatinina en el diagnóstico de fracaso renal agudo y frenar su progresión.<sup>19,20,21</sup>

Las limitaciones que presenta este estudio son el uso de IECAs de los pacientes, ya que existen trabajos que mencionan que estos fármacos producen alteración de los niveles de cistatina C.

Lamentablemente de la población en estudio algunos pacientes tomaban algún fármaco de este grupo, como las guías clínicas de la diabetes lo refieren, además muchos de ellos eran hipertensos y en nuestro medio el uso de enalapril, por su bajo costo, está entre los medicamentos de elección para esta patología, no tanto así en otros países donde se realizaron estudios con cistatina C en diabéticos que recibían otra clase de antihipertensivos; por lo tanto, concluimos que se debe realizar

estudios con una mayor muestra y tomar en consideración el uso de fármacos IECAs y la influencia de éstos en la valoración de la tasa de filtrado glomerular con la cistatina C, otra limitación importante de este estudio fue el tiempo en el que se realizó ya que lo ideal sería realizar un seguimiento de los pacientes, con determinaciones seriadas de cistatina C sérica, y así valorar adecuadamente su comportamiento cuando empieza a declinar la función renal.<sup>24,25</sup>

## Referencias bibliográficas

- Mussap M, DallaVestra M, Fioretto P, Saller A, Varagnola M, Nosadini R, Plebani M. Cystatin C is more sensitive marker than creatinine for the estimation of GFR in type 2 diabetic patients, *Kidney Int*, 2002; 61: 1453 - 1461.
- Roos J, Doust J, Tett S, Kirkpatrick C; Diagnostic accuracy of cystatin C compared to serum creatinine for the estimation of renal dysfunction in adults and children-A meta-analysis; *Clinical Biochemistry* 40; 383-391, 2007.
- Néstor Fontseré, Vicens Esteve, Ana Saurina, Mónica Pou, The Search for a New Marker of Renal Function in Older Patients with Chronic Kidney Disease Stages 3-4: Usefulness of Cystatin C-Based Equations *Nephron Clin Pract* 2009; 112:c164-c170.
- R. Font, M. Prats, C. Gutiérrez, A. Bardají, M. Lalana, J. Marsillach, J. Camps, A. Martínez Vea ¿Existe relación entre los niveles de cistatina C y el estado inflamatorio, el estrés oxidativo y otros factores de riesgo cardiovascular en pacientes no diabéticos con enfermedad renal crónica? *Nefrología* 2009; 29(3):228-235.
- Peter P. Reese and Harold I. Feldman More Evidence that Cystatin C Predicts Mortality Better than Creatinine. *J Am Soc Nephrol* 20: 2088-2090, 2009. doi: 10.1681/ASN.2009.080832.
- John W. Graves, MD Diagnosis and Management of Chronic Kidney Disease *Mayo Clin Proc*. 2008; 83 (9):1064 - 1069.
- Rodolfo L. Borgesa, Andréa H. Hirotaa, Beata M.R. Quintob, Arthur B. Ribeirob, Maria T. Zanellaa, Marcelo C. Batista; Is Cystatin C a Useful Marker in the Detection of Diabetic Kidney Disease? *bNephrology, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil Nephron ClinPract* 2010; 114:c127-c134 (DOI: 10.1159/000254385).
- Fricker M, Wiesli P, Brandle M, Schwegler B, Schmid C. Impact of thyroid function on serum cystatin C. *Kidney Int* 2003; 63: 1944-7.
- F. J. Cepeda, E. Fernández, A. Pobes y L. M. Baños. Utilidad de la cistatina C en el ámbito hospitalario. Comparación con los distintos métodos de valoración renal. Servicio de Nefrología. Hospital de Cabueñes (SESPA). Gijón. NEFROLOGÍA. Volumen 27. Número 2. 2007.
- National Kidney Foundation K/DOQI: Clinical Practise Guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 39: S1-200, 2002.
- Harmoinen A, Lehtimäki T, Korpela M, Turjanmaa, Saha H: Diagnostic accuracies of plasma creatinine, cystatin C, and glomerular filtration rate calculated by the Cockcroft - Gault and Levey. *ClinChem* 49;7: 1223-1226, 2003.
- Wasen E, Isohao R, Mattila K, Vahlberg T, Kivela S L, Irjala K: Serum cystatin C in the aged: relationships with health status. *Am J KidneyDis* 42:36-43, 2003. Herget-Rosenthal S, Bökenkamp A, Hofmann W; How to estimate GFR - serum creatinine, serum cystatin C or equations?; *Clinical Biochemistry*, 40, 2007, 153-161.
- Finney H, Newman DJ, Thakker H, Fell JM, Price CP. Reference ranges for plasma Cystatin C and Creatinine measurements in premature infants, neonates, and older children. *Arch Dis Child* 2000; 82:71-74.
- Martin S, Prevot A, Mosing D, Werner D, van Melle G, Guignard J-P. Glomerular filtration rate: Measure creatinine and height rather than Cystatin C. *ActaPaediatr* 2003; 92: 1052-1057.
- R. A. Chudleigh & R. L. Ollerton & G. Dunseath & R. Peter & J. N. Harvey & S. Luzio & D. R. Owens. Use of cystatin C-based estimations of glomerular filtration rate in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* (2009) 52:1274-1278 DOI 10.1007/s00125-009-1379-7.
- Hoek FJ, Kemperman FA, Krediet RT: A comparison between cystatin C, plasma reatinine and the Cockcroft and Gault formula for the estimation of glomerular filtration rate. *Nephrol Dial Transplant* 18 (10):2024-31, 2003.
- Jovanovic D, Krstivojevic P, Obradovic I, Durdevic V, Dukanovic L: Serum cystatin C and beta2-microglobulin as markers of glomerular filtration rate. *RenFail* 25(1):123-33, 2003.
- Departments of Nephrology, Thoracic and Cardiovascular Surgery, and Endocrinology, University Hospital; Essen, Germany; and Institute for Medical Informatics, Biometry and Epidemiology, Medical School, University Duisburg-Essen, Germany Early detection of acute renal failure by serum cystatin C. *Kidney Int*. 2004; 66:1115-22.
- Neil V. McNamara, Roger Chen, Margaret R. Janu, Phillip Bwititi, George Car; Markus Seibel. Early renal failure detection by cystatin C in Type 2 diabetes mellitus: varying patterns of renal analyte expression. *Pathology (April 2009)* 41(3), pp.269-275.
- Murray PT, Le Gall JR, Dos Reis Miranda D, Pinsky MR, Testa C. Physiological end-points (efficacy) for acute renal failure. *Curr Opin Crit Care*. 2002; 8:519-25.
- Bruce A. Perkins, Robert G. Nelson, Betsy E.P. Ostrander, Kristina L. Blouch, Andrzej S. Krolewski, Bryan D. Myers, and James H. Warram; Detection of Renal Function Decline in Patients with Diabetes and Normal or Elevated GFR by Serial Measurements of Serum Cystatin C Concentration: Results of a 4-Year Follow-Up Study; *J Am Soc Nephrol* 16:1404-1412, 2005.
- Brad C. Astor, Andrew S. Levey, Lesley A. Stevens, Frederick Van Lente, Elizabeth Selvin, and Josef Coresh Method of Glomerular Filtration Rate Estimation Affects Prediction of Mortality Risk. *J Am Soc Nephrol* 20:2214-2222, 2009. doi: 10.1681/ASN.2008090980.
- Buysschaert M, Joudi I, Wallemacq P, Michel P. Hermans: Performance of serum Cystatin C versus serum Creatinine in subjects with type 1 diabetes. *Diabetes Care* Vol 16;4: 1320 - 1321, 2003.
- Christensson AG, Grubb AO, Nilsson JA, Norrgren K, Sterner G, Sundkvist G: Serum cystatin C advantageous compared with serum creatinine in the detection of mild but not severe diabetic nephropathy. *J. Intern Med* 256 (6):510-8, 2004.