

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA



**Monitorização farmacoterapêutica de bussulfano em doentes
submetidos a regimes de condicionamento pré-transplante de
células progenitoras hematopoiéticas no IPO de Lisboa**

Vera Lúcia Nobre Gonçalves Domingos

Orientadores

Orientador: **Prof. Doutor Paulo Paixão**
Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

Coorientador: **Dr. Nuno Miranda**
Instituto Português de Oncologia de Lisboa de Francisco Gentil, EPE

Dissertação de Mestrado em Farmacoterapia e Farmacoepidemiologia

2016

**UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA**



**Monitorização farmacoterapêutica de bussulfano em doentes
submetidos a regimes de condicionamento pré-transplante de
células progenitoras hematopoiéticas no IPO de Lisboa**

Vera Lúcia Nobre Gonçalves Domingos

Orientadores

Orientador: **Prof. Doutor Paulo Paixão**
Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

Coorientador: **Dr. Nuno Miranda**
Instituto Português de Oncologia de Lisboa de Francisco Gentil, EPE

Dissertação de Mestrado em Farmacoterapia e Farmacoepidemiologia

2016

RESUMO

O Bussulfano é um alquilante bifuncional amplamente utilizado em regimes de condicionamento para transplante de células progenitoras hematopoiéticas (TCPH). Embora tenha uma farmacocinética linear, apresenta elevada variabilidade inter-individual que, associado à sua estreita margem terapêutica, tem fundamentado a monitorização farmacoterapêutica do fármaco.

A utilização de doses de bussulfano ajustadas individualmente permite a optimização da eficácia e a diminuição da incidência de toxicidades, com reflexo nos resultados clínicos pós-transplante. A exposição a valores elevados (expressa pela área da curva de concentração *versus* tempo, AUC) tem sido associada a risco aumentado de toxicidades, como mucosite, doença aguda do enxerto *versus* hospedeiro (aGVHD) e doença veno-oclusiva (DVO). Em contraste, exposição a baixos níveis de bussulfano tem sido associada a aumento da incidência de rejeição e de recaída.

Este trabalho descreve as etapas da implementação de um procedimento de monitorização farmacoterapêutica de bussulfano e consequente integração na prática clínica no Instituto Português de Oncologia de Lisboa de Francisco Gentil (IPOLFG). Pretendeu-se também analisar a variabilidade dos parâmetros farmacocinéticos, a eficácia da monitorização farmacoterapêutica na obtenção da AUC alvo e aferir a possibilidade de implementar um regime posológico de toma única diária.

O doseamento de bussulfano no plasma foi realizado por LC-MS/MS e foi utilizada uma análise farmacocinética individual e um modelo monocompartimental para a estimativa dos parâmetros farmacocinéticos.

No estudo realizado, a clearance (CL) média padronizada ao peso foi de $0,19 \text{ L/h*kg} \pm 0,05 \text{ L/h*kg}$ e o volume de distribuição (Vd) de $0,65 \text{ L*kg} \pm 0,22 \text{ L*kg}$. Da análise das covariáveis, o peso contribuiu aproximadamente em 30% para a variabilidade observada na CL e 40% no Vd. O coeficiente de variação (CV) inter-individual na CL diminuiu significativamente de 60% (modelo sem covariáveis) para 30 % (modelo com o peso como covariável).

A CL foi significativamente ($p = 0,024$) diferente entre o grupo com idade <10 anos comparativamente com o grupo com idade > 10 anos, entre os diferentes doentes (agrupados por tratamento) ($p= 0,0000$) e entre os diferentes dias de tratamento ($p=0,0191$). O tipo de regime de condicionamento, não mostrou ter relação com a CL do bussulfano ($p=0,0514$). Nenhum destes parâmetros influenciou significativamente o Vd.

A variabilidade residual foi cerca de 12% na CL e 20% no Vd e verificou-se uma diminuição de 2%, 10% e 14% na CL entre o 1º e 2º dia, o 1º e 3º dia e o 1º e 4º dia, respectivamente.

Verificou-se uma melhoria clara na precisão da obtenção da AUC alvo ao longo do tempo, com uma variação de 75,7 mg*h/L no 1º dia para 11,6 mg*h/L no 4º dia. No final do tratamento, 83% dos doentes tiveram uma exposição óptima ao bussulfano (valor alvo da AUC \pm 10%).

Considerando os resultados obtidos, a exequibilidade do procedimento implementado e a disponibilidade de metodologia analítica adequada concluiu-se que estão reunidas as condições para a implementação do regime posológico de toma única diária.

Palavras-chave: bussulfano, farmacocinética, transplante de células hematopoiéticas, monitorização farmacoterapêutica, terapêutica individualizada

ABSTRACT

Busulfan is a bifunctional alkylating agent commonly used in conditioning therapy for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Although it's linear pharmacokinetic profile, wide interpatient variability is observed in its pharmacokinetic parameters. This variability, along with a narrow therapeutic window have supported the therapeutic drug monitoring (TDM).

Personalized doses enhances efficacy and reduces the toxicities and other side-effects related to the post-HSCT condition. A high exposure, expressed as the area under the curve (AUC), has been associated with an increased risk of toxicities, such as mucositis, acute graft-versus-host disease (aGVHD) and veno-occlusive disease (VOD). In contrast, a low exposure to busulfan has been associated with increased incidence of graft rejection and relapse.

This study describes the steps followed for the implementation of a TDM procedure for busulfan in the Instituto Português de Oncologia de Lisboa de Francisco Gentil (IPOLFG). In addition, we studied the variability in the PK parameters and measured the TDM efficacy to achieve the target AUC. Finally, we checked the feasibility of implementation a once-daily dosing schedule for busulfan.

The plasma busulfan quantification was done using LC-MS/MS technology. The PK analysis was done using a 1-compartment model and individual analysis procedures.

The mean clearance (\pm SD) body weight corrected was $0,19 \text{ L/h*kg} \pm 0,05 \text{ L/h*kg}$ and the V_d was $0,65 \text{ L*kg} \pm 0,22 \text{ L*kg}$. Body weight (BW) was the most predictive covariance for clearance (CL) and volume of distribution (V_d) and explained 30% and 40% of the observed variability, respectively. The interpatient coefficient of variation (CV) in busulfan clearance significantly decreased from 60% (covariate-free model) to 30% (BW covariate model).

CL was significantly ($p = 0,024$) different between the group < 10 years old and > 10 years old, between the patients nested for the treatment ($p= 0,0000$) and between the days of treatment ($p=0,0191$). The type of conditioning regimen didn't show to be related with the busulfan clearance ($p=0,0514$). None of these PK parameters influenced the V_d .

The residual variability was 12% for the CL and 20% for the V_d . A decrease of 2%, 10% and 14% in CL was observed between the 1st and the 2nd day, the 1st and the 3th day, and the 1st and the 4th day, respectively.

There was a clear improvement in the accuracy to achieve the target AUC over time, with a change from 75,7 mg * h / L on the 1st day (prior to TDM) to 11,6 mg * h / L on day 4. 83% of patients had an optimal exposure to busulfan (AUC target value \pm 10%) at the end of the treatment.

Considering the results obtained, the feasibility of the implemented procedure and the availability of adequate analytical methodology we concluded that the conditions for the implementation of the once-daily regimen were achieved.

Key Words: busulfan, pharmacokinetics, hematopoietic cell transplant, therapeutic drug monitoring, personalized medicine

AGRADECIMENTOS

A realização do presente trabalho não teria sido possível sem o apoio das pessoas que em seguida refiro e às quais gostaria de agradecer:

Ao Prof. Doutor Paulo Paixão pela disponibilidade e apoio, encorajamento e recomendações essenciais para a elaboração deste trabalho.

Ao Dr. Nuno Miranda pelo desafio lançado, confiança no projecto, apoio e conhecimento transmitido.

Ao Dr. António Melo Gouveia, Dr.^a Vera Pires e restante equipa do Serviço Farmacêutico do IPOLFG pelo apoio e colaboração na concretização diária deste trabalho.

Ao Dr. Erik van Maarseveen, do Serviço Farmacêutico do University Medical Center Utrecht, pelo conhecimento transmitido, incentivo e apoio permanente.

Ao Prof. Doutor Manuel Abecasis, Dr.^a Filipa Moita e restante equipa médica da Unidade de Transplantação de Progenitores Hematopoiéticos do IPOLFG pelo apoio na implementação deste trabalho.

À Enf.^a Elsa Oliveira, Enf.^a Rosália Pires e restante equipa de enfermagem da Unidade de Transplantação de Progenitores Hematopoiéticos do IPOLFG pela colaboração na concretização diária deste trabalho.

À Eng.^a Susana Simões e à equipa do Serviço de Toxicologia Forense do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses por acreditarem no projeto desde início, pela dedicação e trabalho realizado.

À Dr.^a Dialina Brilhante, Dr.^a Ana Macedo e Dr.^a Marta Miranda do Serviço de Imunohemoterapia do IPOLFG pela disponibilidade e apoio na realização deste trabalho.

À minha família, pelo incentivo e motivação durante este percurso.

A todos os que de forma directa ou indirecta contribuíram para a realização deste trabalho, o meu mais sincero agradecimento.

ÍNDICE GERAL

Resumo	i
Abstract	iii
Agradecimentos	v
Índice geral	vi
Índice de Figuras	viii
Índice de Tabelas	ix
Abreviaturas	x
1. Introdução e objectivos	1
2. Revisão bibliográfica	3
2.1. Transplante de células progenitoras hematopoiéticas e regimes de condicionamento	3
2.2. Bussulfano	7
2.2.1. Mecanismo de acção e indicações terapêuticas	7
2.2.2. Farmacocinética	10
2.2.3. Variabilidade intra-individual e inter-individual nos parâmetros farmacocinéticos	12
2.2.4. Farmacodinâmica	15
2.3. Monitorização farmacoterapêutica de bussulfano	18
3. Transplante de células progenitoras hematopoiéticas no IPOLFG	20
4. Metodologia	21
4.1. Fase 1. Pré-implementação	22
4.1.1. Pesquisa bibliográfica e de parcerias	22
4.1.2. Desenvolvimento e validação do método de quantificação de bussulfano em amostras de plasma	23
4.2. Fase 2. Piloto	26
4.2.1. Colheita e processamento de amostras biológicas em tempo real / doseamento e análise PK <i>a posteriori</i>	26
4.2.2. Colheita, processamento de amostras biológicas, doseamento e análise PK em tempo real	27
4.3. Fase 3. Monitorização farmacoterapêutica de bussulfano na prática clínica	28
4.3.1. Circuito	28
4.3.2. Administração de bussulfano, colheita e processamento de amostras biológicas	29
4.3.3. Análise Farmacocinética (PK)	31

4.3.4. Recolha de dados e análise estatística	33
5. Resultados	34
5.1. Informação recolhida	34
5. 2. Resultados analíticos da validação cruzada	35
5. 3. Caracterização da amostra	36
5.4. Caracterização dos parâmetros farmacocinéticos.....	36
5.5 Variabilidade dos parâmetros farmacocinéticos	40
5.6 Avaliação da Monitorização farmacoterapêutica	46
6. Discussão dos resultados	47
7. Conclusões e perspectivas futuras	51
8. Referências Bibliográficas	53
Anexo I	58
Anexo II	59
Anexo III	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.1: Activação do bussulfano (adaptado de Ten Brink <i>et al.</i> , 2014)	7
Fig.2: Fórmulas para cálculo do Peso Ideal e Peso Ideal Ajustado (adaptado de EMA, 2008)	8
Fig.3(a): Perfil PK expectável após administração de bussulfano IV em regime de toma única diária (adaptado de Russell <i>et al.</i> , 2008)	10
Fig. 3(b): Perfil PK expectável após administração de bussulfano IV em regime de tomas múltiplas (6/6h) (adaptado de Russell <i>et al.</i> , 2008)	10
Fig.4: Metabolização do bussulfano e potencial envolvimento de enzimas e transportadores (adaptado de Ten Brink <i>et al.</i> , 2014)	11
Fig. 5: Curvas Kaplan-Meier da probabilidade de sobrevivência livre de eventos nos diferentes grupos de exposição ao bussulfano (adaptado de Bartelink <i>et al.</i> , 2016) ..	16
Fig. 6: Circuito TDM bussulfano no IPOLFG	28
Fig. 7: Correlação entre CL e peso ajustado	40
Fig. 8: Correlação entre Vd e peso ajustado	40
Fig. 9: Correlação entre LnCL e a Idade	41
Fig. 10: Valores de LnCL de acordo com a idade	41
Fig. 11: Correlação entre LnVd e a Idade	42
Fig. 12: Valores de LnCL e o dia do tratamento	42
Fig. 13: Valores de LnVd e o dia do tratamento	43
Fig. 14: Valores de LnCL de acordo com o tipo de tratamento	43
Fig. 15: Valores de LnVd de acordo com o tipo de tratamento	44
Fig. 16: Valores da Diferença da AUC alvo e a AUC estimada ao longo dos dias	46

ÍNDICE DE TABELAS

Tab. 1: Indicações do TCPH (adaptado de Perumbeti, 2016)	3
Tab. 2: Regimes de condicionamento (adaptado de Gratwohl <i>et al.</i> , 2012)	5
Tab.3: Posologia recomendada de Bussulfano na população pediátrica (adaptado de EMA, 2008)	9
Tab. 4: Resumo dos modelos populacionais recentemente desenvolvidos em doentes pediátricos(adaptado de Ten Brink <i>et al.</i> , 2014)	9
Tab.5: Interações fármaco-fármaco com o bussulfano (adaptado de Glotzbecker <i>et al.</i> , 2012)	15
Tab. 6: Resumo dos métodos analíticos para doseamento de bussulfano publicados na literatura(adaptado de Ten Brink <i>et al.</i> , 2014)	19
Tab. 7: AUC cumulativa alvo (mg*h/L)	32
Tab. 8: Resumo da informação recolhida centros consultados	34
Tab. 9: Caracterização demográfica da amostra.....	37
Tab. 10: Caracterização detalhada da amostra	38
Tab. 11: Caracterização dos parâmetros farmacocinéticos	39
Tab.12: Análise de variância da CL	44
Tab. 13: Soma dos quadrados Tipo III	44
Tab. 14: Análise de variância do Vd.....	45
Tab. 15: Soma dos quadrados Tipo III	45
Tab. 16: Estatística- Resumo.....	46

ABREVIATURAS

ASBMT - Sociedade Americana de Transplante de Medula

ASST - Autoridade para os Serviços de Sangue e Transplantação

BuCy – Regime de condicionamento com Bussulfano e Ciclofosfamida

BuFlu - Regime de condicionamento com Bussulfano e Fludarabina

BuMel – Regime de condicionamento com Bussulfano e Melfalano

CIBMTR - *Center for International Blood & Marrow Transplant Research*

CL - Clearance

C_{ss} – Concentração em estado estacionário

DVO - Doença Venó-Oclusiva

EABMT - Sociedade Europeia para o Transplante de Medula

EBMT - *European Group for Blood and Marrow Transplantation*

EMA - Agência Europeia do Medicamento

FFUL - Faculdade de Farmácia de Lisboa

GC - Cromatografia Gasosa

GLM - General Linear Models

GSH - Glutathione

GST - Glutathione-S-Transferase

GvHD – Doença do Enxerto versus Hospedeiro (*Graft versus Host Disease*)

INMLCF – Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses

IPOLFG – Instituto Português de Oncologia de Lisboa de Francisco Gentil

IV - Intravenoso

LC - Cromatografia Líquida

LLA - Leucemia Linfoblástica Aguda

LMA - Leucemia Mielóide Aguda

LMC - Leucemia Mielóide Crónica

MAC - Regime de Condicionamento Mieloablativo

ML – Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood*)

MS - Espectrometria de Massa

MS/MS - MS em tandem

Parâmetros PK – Parâmetros Farmacocinéticos

PD - Farmacodinâmica

PK – Farmacocinética

RIC – Regime de Condicionamento de Intensidade Reduzida

SF – Serviço Farmacêutico

SI – Serviço de Imunohemoterapia

SMD - Síndromes Mielodisplásicas

$t_{1/2}$ - tempo de semi-vida

TCPH - Transplante de Células Progenitoras Hematopoiéticas

TDM - Monitorização Farmacoterapêutica

THT - Tetrahidrotiofeno

TRM - Mortalidade Relacionada com o Transplante

UMC Utrecht – *University Medical Center Utrecht*

UPLC - Cromatografia Líquida de Ultra Performance

UTM – Unidade de Transplantação de Progenitores Hematopoiéticos

UV- Ultravioleta

Vd - Volume de Distribuição Aparente

1. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

O Bussulfano é um citotóxico amplamente utilizado nos regimes de condicionamento pré-transplante de células progenitoras hematopoiéticas. A variabilidade farmacocinética intra e inter-individual, associada à sua estreita margem terapêutica, justificam a monitorização sérica deste fármaco. Em algumas populações, nomeadamente em doentes pediátricos ou com índice de massa corporal elevado, é reconhecida a grande variabilidade das concentrações plasmáticas de bussulfano, após exposição a doses calculadas com base no peso.

De acordo com diversos estudos, a administração de doses individualizadas baseadas na monitorização farmacoterapêutica têm impacto não só na redução das toxicidades precoces relacionadas com o regime de condicionamento, mas também na sobrevivência livre de eventos e na sobrevivência global. Também é conhecido que exposições a concentrações de bussulfano inferiores à janela terapêutica têm sido correlacionadas com maiores taxas de rejeição e de recaída, enquanto que elevadas exposições sistémicas têm sido associadas a aumento de toxicidade, sobretudo hepática e neurológica (Russell et al., 2008).

Evidenciou-se assim a necessidade de implementar no Instituto Português de Oncologia de Lisboa (IPOLFG) um protocolo de monitorização farmacoterapêutica de bussulfano, com o objectivo de otimizar a exposição ao fármaco e melhorar os resultados clínicos dos doentes. A prazo, este projecto permitirá criar uma base de dados dos principais parâmetros farmacocinéticos da população tratada, e avaliar-se o benefício clínico dele decorrente.

Este trabalho foi desenvolvido no IPOLFG e envolveu os seguintes serviços: Serviço Farmacêutico (SF), Unidade de Transplantação de Progenitores Hematopoiéticos (UTM) e Serviço de Imunohemoterapia (SI). O doseamento plasmático de bussulfano foi realizado no Serviço de Toxicologia Forense do Instituto de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF).

Definiram-se como objectivos deste trabalho:

- Implementar um procedimento de monitorização farmacoterapêutica de bussulfano na prática clínica no IPOLFG;
- Analisar os parâmetros farmacocinéticos na amostra estudada e as covariáveis que contribuem para a variabilidade dos mesmos;
- Avaliar a eficácia da monitorização farmacoterapêutica na obtenção da AUC alvo;
- Aferir a possibilidade de implementar um regime posológico de toma única diária.

O capítulo 2 consiste numa revisão bibliográfica sobre o transplante de células progenitoras hematopoiéticas e regimes de condicionamento, sobre mecanismo de acção, farmacocinética e farmacodinâmica do bussulfano e respectiva monitorização farmacoterapêutica. É também apresentado um breve enquadramento do transplante de progenitores hematopoiéticos no IPOLFG.

De seguida apresenta-se a metodologia aplicada, os resultados obtidos e a discussão destes resultados, caracterizando-se as principais covariáveis que afectam a farmacocinética do bussulfano e ainda o impacto da monitorização das concentrações plasmáticas de bussulfano na exposição ao fármaco.

Por fim, expõem-se as principais conclusões, assim como as perspectivas e os desafios futuros.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. TRANSPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS E REGIMES DE CONDICIONAMENTO

O transplante de células progenitoras hematopoiéticas (TCPH) é um procedimento médico potencialmente curativo no tratamento de doenças oncológicas como a Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), Leucemia Mielóide Aguda (LMA), Síndromes Mielodisplásicas (SMD), Leucemia Mielóide Crônica (LMC) e em alguns tumores sólidos. (Ciurea *et al.*, 2009).

As taxas de cura são variáveis, podendo atingir os 80% em doentes com LMC ou 15-20% em doentes com LMA refractária à quimioterapia convencional. Adicionalmente, doenças não malignas como síndromes de insuficiência medular, imunodeficiências severas, deficiências congênitas metabólicas e hemoglobinopatias, como a talassémia, podem também beneficiar de TCPH alogénico (EMA, 2005; Perumbeti, 2016). Na Tab. 1 estão listadas as principais indicações do TPCH autólogo e alogénico.

Tab. 1: Indicações do TCPH (adaptado de Perumbeti, 2016)

Transplante autólogo		Transplante alogénico	
Doenças oncológicas	Doenças não oncológicas	Doenças oncológicas	Doenças não oncológicas
Neuroblastoma	Doenças autoimunes	Leucemia Mielóide Aguda	Anemia Aplástica
Linfoma Não Hodgkin	Amiloidose	Linfoma Não Hodgkin	Anemia de Fanconi
Linfoma Hodgkin		Linfoma Hodgkin	Imunodeficiência severa
Leucemia Mielóide Aguda		Leucemia Linfoblástica Aguda	Talassémia Major
Meduloblastoma		Leucemia Mielóide Crónica	Anemia Blackfan-Diamond
Tumor das células germinativas		Síndromes Mielodisplásicas	Anemia falciforme
Mieloma Múltiplo		Mieloma Múltiplo	Síndrome de Wiskott-Aldrich
		Leucemia Linfocítica Crónica	Osteopetrose
			Erros inatos do metabolismo
			Doenças autoimunes

O TPCH envolve a infusão de células estaminais autólogas ou alogénicas colhidas a partir da medula óssea, sangue periférico ou do cordão umbilical para restabelecer a função hematopoiética (Perumbeti, 2016).

No TCPH autólogo é feita a re-infusão de células estaminais do próprio doente, previamente colhidas e crio-preservadas em nitrogénio líquido. As células são recolhidas da medula óssea ou do sangue periférico, quando a doença se encontra em remissão (a medula não apresenta doença ou apenas uma infiltração mínima). Embora, não existam barreiras imunológicas, a contaminação do enxerto pode aumentar a taxa de recaída (EMA, 2005).

No TCPH alogénico existe a transferência de células estaminais de um dador para o doente. Neste caso existe o potencial para rejeição imunológica pelo receptor às células infundidas (efeito hospedeiro *versus* enxerto) e o ataque imunológico das células do dador contra alguns tecidos do receptor (doença enxerto *versus* hospedeiro). Por outro lado, as células imunocompetentes infundidas exercem um potente efeito enxerto *versus* tumor independente dos efeitos da quimioterapia de alta dose (EMA, 2005).

A preparação para o TCPH envolve a administração prévia de regimes de condicionamento para permitir a citorredução das células malignas e, idealmente, a erradicação da doença. Nos transplantes alogénicos, o regime deve ser suficientemente imunossupressor para evitar a rejeição do enxerto (EMA, 2005).

Actualmente, os regimes de condicionamento podem ser baseados na irradiação corporal total e em quimioterapia. São administrados dias antes do transplante, sendo a sua composição, duração e sequência de administração variáveis (Tab. 2) (EMA, 2005; Gratwohl *et al.*, 2012).

Para além dos regimes clássicos de condicionamento (mieloablativos), foram desenvolvidos regimes de intensidade reduzida (RIC), em que o objectivo não é a erradicação da doença ou a destruição da hematopoiese do hospedeiro pela quimioterapia mas por efeitos imunologicamente mediados. Estes regimes incluem esquemas de intensidade reduzida com clara redução na toxicidade e regimes que não erradicam a mielopoiese do receptor, usualmente denominados de não mieloablativos(Gratwohl *et al.*, 2012).

Tab. 2: Regimes de condicionamento (adaptado de Gratwohl *et al.*, 2012)
(as doses de bussulfano referem-se à formulação oral)

Classical regimens	Total dose (days)	Intensified regimens (allo)	Total dose (days)
Cy/TBI (allo/auto) Cyclophosphamide (mg/kg) Total body irradiation (Gy)	120 (-6,-5) 12-14 (-3 to -1)	Cy/VP/TBI Cyclophosphamide (mg/kg) Etoposide (mg/kg) Total body irradiation (Gy)	120 (-6, -5) 30-60 (-4) 12-13.8 (-3 to -1)
Bu/Cy# (allo/auto) Busulfan (mg/kg) Cyclophosphamide (mg/kg)	16 (-7 to -4) 120 (-3, -2)	TBI/TT/Cy Total body irradiation (Gy) Thiotepa (mg/kg) Cyclophosphamide (mg/kg)	13.8 (-9 to -6) 10 (-5, -4) 120 (-3, -2)
BACT (allo) BCNU (mg/m ²) ARA-C (mg/m ²) Cyclophosphamide (mg/kg) 6-Thioguanine (mg/m ²)	200 (-6) 800 (-5 to -2) 50 (-5 to -2) 800 (-5 to -2)	Bu/Cy/MEL Busulfan (mg/kg) Cyclophosphamide (mg/kg) Melphalan (mg/m ²)	16 (-7 to -4) 120 (-3, -2) 140 (-1)
BEAM (auto/allo) BCNU (mg/m ²) Etoposide (mg/m ²) ARA-C (mg/m ²) Melphalan (mg/m ²)	300 (-6) 800 (-5 to -2) 800 (-5 to -2) 140 (-1)	Reduced toxicity regimens*	Total dose (days)
MEL (auto) Melphalan (mg/m ²)	200 (-3, -2)	Flu/MEL Fludarabine (mg/m ²) Melphalan (mg/m ²)	150 (-7 to -3) 140 (-2,-1)
Other "standard" regimens	Total dose (days)	Flu/Bu Fludarabine (mg/m ²) Busulfan (mg/kg)	150 (-9 to -5) 8-10 (-6 to -4)
TBI/VP (allo) Total body irradiation (Gy) Etoposide (mg/kg)	12-13.2 (-7 to -4) 60 (-3)	Flu/Cy Fludarabine (mg/m ²) Cyclophosphamide (mg/kg)	150 (-7 to -3) 140 (-2,-1)
AC/TBI (allo) ARA-C (g/m ²) Total body irradiation (Gy)	36 (-9 to -4) 12 (-3 to -1)	Flu/Bu/TT Fludarabine (mg/m ²) Busulfan (mg/kg) Thiotepa (mg/m ²)	150 (-7 to -5) 8 (-6 to -4) 5 (-3)
MEL/TBI (allo/auto) Melphalan (mg/m ²) Total body irradiation (Gy)	110-140 10-14	Non-myeloablative regimens	Total dose (days)
Bu/MEL (auto) Busulfan (mg/kg) Melphalan (mg/m ²)	16 (-5 to -2) 140 (-1)	Flu/TBI Fludarabine (mg/m ²) Total body irradiation (Gy)	90 (-4 to -2) 2 (0)
CBV (auto) BCNU (mg/m ²) Etoposide (mg/m ²) Cyclophosphamide (g/m ²)	300 (-6) 800 (-5 to -2) 4.8-7.2 (-5 to -2)	TLI/ATG Total Lymphoid Irradiation (Gy) ATG*	8 (-11 to -1) 7 (-11 to -7)
		TBI Total body irradiation (Gy)	1-2 (0)

Nowadays moving to Cy/iv Bu on days -7, -6 and -5 to -2, respectively; * In many cases these regimens include ATG

As complicações associadas ao TCPH podem surgir precocemente como: mucosite, cistite hemorrágica, infecções, pancitopenia, doença do enxerto *versus* hospedeiro (GvHD), rejeição, complicações pulmonares, doença veno-oclusiva (DVO) e microangiopatia trombótica. Por seu lado, as complicações tardias incluem complicações decorrentes do GvHD crónico ou da toxicidade a longo prazo dos tratamentos, nomeadamente efeitos oculares, endócrinos, pulmonares, musculoesqueléticos, neurológicos, imunes, infecções, insuficiência cardíaca congestiva e segundas neoplasias (EMA, 2005).

Após o regime de condicionamento verifica-se uma fase de mielossupressão severa, caracterizada pela diminuição da contagem de células sanguíneas periféricas e que pode requer a transfusão de plaquetas e eritrócitos. Nesta altura é importante instituir medidas profiláticas para evitar infecções bacterianas, fúngicas e virais. Duas a cinco semanas após o transplante, ocorre o *engraftment* (definido analiticamente por >500

neutrófilos/ μL e >20.000 plaquetas/ μL). No entanto, decorrem mais de 6 meses até que se verifique a recuperação da função imunitária (EMA, 2005).

A rejeição do enxerto (destruição imunitária do enxerto por células residuais do hospedeiro) ou falência do transplante é considerada pouco comum, mas constitui uma complicação grave (EMA, 2005).

A GvHD ocorre quando as células imunitárias do dador, especialmente as células T, atacam as células do receptor. Esta doença manifesta-se inicialmente por sinais e sintomas ao nível da pele, sistema gastrointestinal e hepático, podendo, nas suas formas severas, ser letal. Esta reacção imunológica tem também o potencial de reconhecer e atacar as células malignas do receptor e tem sido associada a menor probabilidade de recaída em doenças oncológicas. A GvHD considera-se aguda quando ocorre nos primeiros 100 dias após o transplante ou crónica quando ocorre após os 100 dias. No contexto de TCPH alogénicos é feita terapêutica profilática com imunossuppressores como tacrolimus, micofenolato de mofetil, ciclosporina, metotrexato ou corticoides (EMA, 2005).

A toxicidade hepática pode variar entre aumento das enzimas hepáticas e doença veno-oclusiva (DVO). Esta síndrome é caracterizada por hepatomegália, elevação dos níveis séricos de bilirrubina, retenção de líquidos e aumento de peso, ocorrendo entre 5-40% dos doentes pediátricos, com evolução potencialmente fatal. A taxa de mortalidade da DVO severa é de aproximadamente 80%, sendo que a maioria destes doentes apresenta uma falência orgânica múltipla, que é a causa de morte mais frequente (Coppell *et al.*, 2010).

A variabilidade da incidência de DVO pode ser influenciada pelo regime de condicionamento, características demográficas do doente, idade, doença de base e lesão hepática prévia (Coppell *et al.*, 2010).

Actualmente, a única opção farmacológica para a DVO severa é o defibrótido, um fármaco envolvido na protecção das células endoteliais e na restauração do equilíbrio trombo-fibrinolítico. Os resultados de vários estudos revelaram que melhora a resposta completa e a sobrevivência destes doentes, tendo como principais limitações os efeitos secundários (hemorragias, coagulopatia e hipotensão) e o elevado custo (Richardson *et al.*, 2012).

2.2. BUSSULFANO

2.2.1. MECANISMO DE ACÇÃO E INDICAÇÕES TERAPÊUTICAS

O Bussulfano (1,4-butanodiol dimetanosulfonato) é um citotóxico amplamente utilizado em regimes de condicionamento.

Farmacologicamente, trata-se de um agente alquilante bifuncional do tipo alquilsulfonato e contém 2 grupos instáveis de metanosulfonato (Fig. 1). Em meio aquoso, a libertação dos grupos metanosulfonato produz carbocátions que podem alquilar o ADN, decorrendo daí o seu efeito citotóxico (Ten Brink *et al.*, 2014).

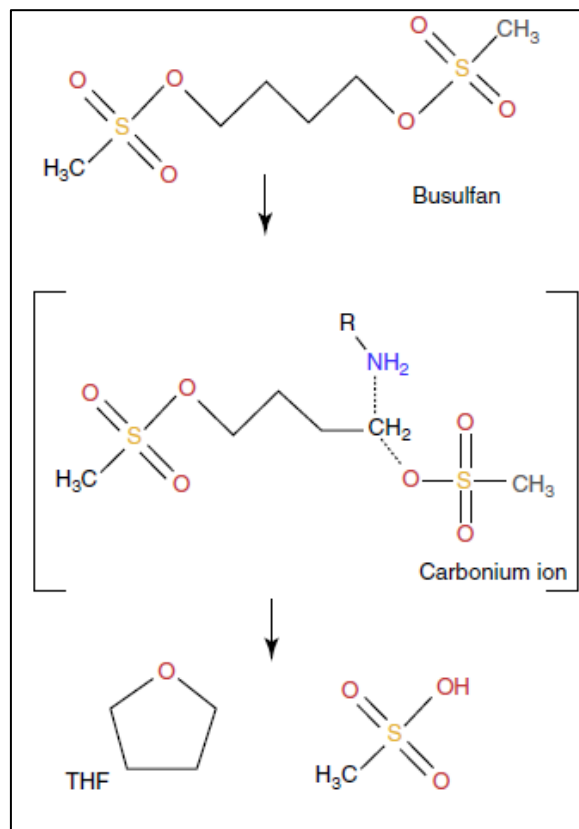


Fig.1: Activação do bussulfano (adaptado de Ten Brink *et al.*, 2014)

Tem características lipofílicas, a sua actividade citotóxica ocorre sobretudo nos tecidos em proliferação e provoca a depleção das células estaminais primitivas não divisíveis. Embora seja um potente mielossupressor, tem fraca potência como imunossupressor, sendo que numa dose que provoca 50% de redução na mielopoiese observa-se apenas uma ligeira diminuição do número de linfócitos (EMA, 2005).

O bussulfano, inicialmente disponível apenas na formulação oral, foi utilizado no tratamento de neoplasias mieloproliferativas como a LMC, a policitemia vera e a

trombocitose essencial (Ten Brink *et al.*, 2014). A absorção intestinal errática e o efeito de primeira passagem contribuíam para uma exposição imprevisível ao fármaco.

Com a comercialização da formulação injectável (2003) foram desenvolvidos protocolos de administração de bussulfano intravenoso (IV). Actualmente, é frequente a utilização de regimes com bussulfano IV em alta dose, sobretudo no contexto de TCPH alogénicos. Nestes regimes, a mielotoxicidade induzida pelo bussulfano é complementada pela associação de agentes linfotóxicos como a ciclofosfamida ou a fludarabina e por agentes com actividade antitumoral adicional como o tiotepa, melfalano e clofarabina (Almog *et al.*, 2011; Ciurea *et al.*, 2009; Palmer *et al.*, 2016).

Para otimizar os regimes de condicionamento e diminuir as toxicidades, a ciclofosfamida tem vindo a ser substituída por fludarabina, um análogo dos nucleótidos. O bussulfano e a ciclofosfamida usam a Glutathione (GSH) no seu metabolismo e, como tal, a associação destes 2 agentes resulta numa depleção da GSH, podendo levar a um aumento da toxicidade. Tal não se verifica com a fludarabina, que não causa depleção da GSH e actua sinergicamente com o bussulfano na apoptose celular (Bartelink *et al.*, 2014; DeLeve *et al.*, 2000; Rezvani *et al.*, 2013).

A escolha da dose inicial é muito importante, sendo que é recomendado que esta seja baseada no peso ideal ajustado (Fig. 2) e de acordo com o nomograma da Agência Europeia do Medicamento (EMA). O peso ideal ajustado permite minimizar as discrepâncias na clearance (CL) entre as diversas categorias do índice de massa corporal (pouco peso, normal, obesidade e obesidade severa) (Palmer *et al.*, 2016; Yeh *et al.*, 2012).

$\text{Peso Ideal ajustado (Kg)} = \text{peso corporal ideal} + 0.25 (\text{peso corporal actual} - \text{peso corporal ideal})$ $\text{Peso Ideal no homem (Kg)} = 50 + 0,91 * (\text{altura em cm} - 152)$ $\text{Peso Ideal na mulher (Kg)} = 45 + 0,91 * (\text{altura em cm} - 152)$

Fig.2: Fórmulas para cálculo do Peso Ideal e Peso Ideal Ajustado (adaptado de EMA, 2008)

Nos adultos, a dose inicial recomendada é de 0,8 mg/kg de peso corporal ajustado, numa perfusão de 2 horas, de 6 em 6 horas num total de 16 doses ou a 3,2mg/Kg de peso corporal ajustado, numa perfusão de 3 horas, de 24 em 24 horas, num total de 4 doses (EMA, 2008).

Na população pediátrica (0 aos 17 anos), a dose recomendada é a referida na Tab. 3 (EMA, 2008).

Tab.3: Posologia recomendada de Bussulfano na população pediátrica (adaptado de EMA, 2008)

Peso corporal (kg)	Dose de Bussulfano (mg/kg)
< 9	1,0
9 a < 16	1,2
16 a 23	1,1
> 23 a 34	0,95
> 34	0,8

Segundo McCune *et al.* (2013), utilizando estas recomendações para estabelecer a dose inicial, apenas em 24,3% dos doentes pediátricos é atingida a exposição óptima ao bussulfano. Consequentemente, vários nomogramas e modelos populacionais têm sido desenvolvidos por diversos grupos de trabalho, e que entram em linha de conta com as covariáveis idade, peso e composição corporal em adultos e crianças (Tab. 4) (Bartelink *et al.*, 2012; Mccune *et al.*, 2013; Ten Brink *et al.*, 2014).

Tab. 4: Resumo dos modelos populacionais recentemente desenvolvidos em doentes pediátricos (adaptado de Ten Brink *et al.*, 2014)

Author	Model	Age range (y)	Clearance (Cl)	Volume of distribution (V)	Dosing accuracy and IIV/IOV
Trame	One-compartment model with 1st order absorption Two models 1. Cl: corrected for BSA 2. Cl allometric scaled for BW Scaling exponent: 0.75 V in both models as function of BW	0.4–18.8	4.16 L/h/m ² 4.11 L/h/kg ^{0.75}	15.2 L/kg	Dose = 19.6 × BSA Dose = 19.4 × (BW/27.2) ^{0.75} 75–80% of patients within target AUC (900–1500 μM * min)
Bartelink	Two-compartment model Cl and V allometric scaled BW Variable scaling exponent Cl, based on BW: L1 * BW ^M = 1.2–0.55 Cl = Cl _{15.3kg} * ($\frac{BW}{15.3}$) ^{L1+BW^M} Scaling exponent V = 0.89(fixed)	0.1–26	3.47 L/h L1 = 1.56 M = –0.226	11.1 L	Model-based nomogram: Clearance: IOV 15% IIV 27%
Paci	One-compartment model Cl and V allometric scaled for BW Scaling exponent for Cl: <9 kg = 1.25 ≥9 kg = 0.76 Scaling exponent for V: 0.86	0.03–15	2.18 L/h	nd	IIV Cl 23% V 22% IOV Cl 11%
Savic	One-compartment model Cl and V allometric scaled for BW Scaling exponent: Vd = 1.0 Cl = 0.75 Cl also corrected for maturation effect: Cl _i = Cl _{pop} * (m + (1 – m) * [1 – e ^{–age*K_{mat}}]) * $\frac{BW_i^{0.75}}{8}$, m = maturation magnitude effect for age K _{mat} = maturation rate constant	0.08–3.3	2.3 L/h m = 0.46 K _{mat} = 1.4	6.4 L/kg	IIV Cl 25% V 25%

^a BSA, body surface area (m²); IIV, interindividual variability; IOV, interoccasion variability. Allometric scaling based on BW occurs according to BW_i^x/BW_{pop}, where BW_i is the BW of the individual, BW_{pop} is the BW of a typical individual set as such in the model, and x is the scaling exponent.

2.2.2. FARMACOCINÉTICA

O modelo que melhor descreve a farmacocinética (PK) do bussulfano é o modelo de um compartimento, no qual a eliminação é linear. O perfil farmacocinético, após uma única administração intravenosa, é linear com a dose administrada (Fig.3) (Russell *et al.*, 2008; Ten Brink *et al.*, 2014)(EMA, 2005).

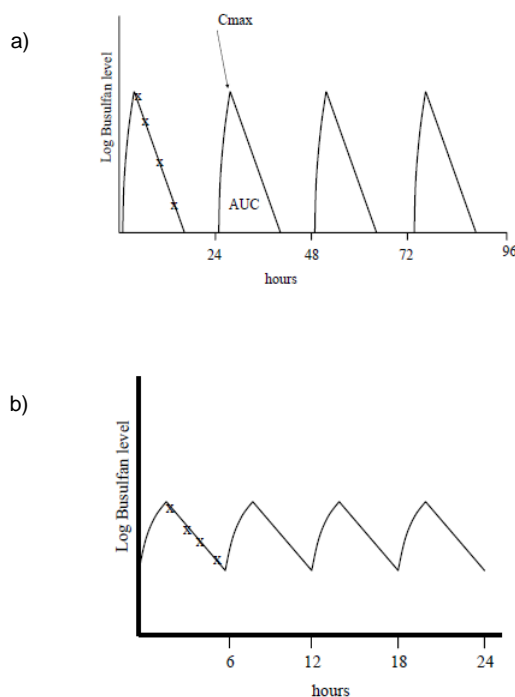


Fig.3(a): Perfil PK expectável após administração de bussulfano IV em regime de toma única diária
Fig. 3(b): Perfil PK expectável após administração de bussulfano IV em regime de tomas múltiplas (6/6h)
(adaptado de Russell *et al.*, 2008)

A média do Volume de Distribuição (Vd) varia entre 0,62 a 0,85 L*kg. O bussulfano atinge concentrações no líquido cefalorraquidiano aproximadamente equivalentes às do plasma. Distribui-se livremente pelos eritrócitos, a ligação reversível às proteínas plasmáticas é baixa ($7,4 \pm 4.9\%$) e a ligação irreversível à albumina é de $32,4 \pm 2.2\%$, o que pode explicar a sua incompleta recuperação (EMA, 2005).

O bussulfano é metabolizado por conjugação com a GSH no fígado e no intestino, sendo catalizada pelas isoformas da Glutathione-S-Transferase (GST): GSTA1, GSTM1 e GSTP1 (Fig. 4). A isoforma GSTA1 é a predominante no metabolismo do bussulfano, sendo que a GSTM1 e a GSTP1 têm apenas 46% e 18% da actividade da primeira neste processo (Ten Brink *et al.*, 2014).

O conjugado de glutathione dissocia-se em γ -glutamil-dihidro-alanil-glicina e tetrahidrotiofeno (THT). O THT é oxidado em sulfolano e subsequentemente em 3-hidroxisulfolano pelo citocromo P₄₅₀. Adicionalmente, os transportadores parecem

estar envolvidos no transporte activo do conjugado de glutationa para fora da célula. Pensa-se que nenhum dos metabolitos contribui significativamente para a eficácia ou para a toxicidade do bussulfano (EMA, 2008; Ten Brink *et al.*, 2014).

A eliminação do fármaco do plasma segue uma cinética de primeira ordem, sendo que a depuração total no plasma varia entre 0,14 – 0,16 L/h*kg e o tempo de semi-vida ($t_{1/2}$) varia de 2,8 a 3,9 horas. Foi estabelecida uma variação contínua da depuração oscilando de 0,15 a 0,24 L/h*kg em crianças de <6 meses até aos 17 anos de idade. A semi-vida terminal neste grupo oscilou entre 2,26 e 2,52 h (EMA, 2008).

Aproximadamente 30% da dose administrada é excretada na urina, durante 48 horas, com 1% de fármaco sob a forma de bussulfano inalterado. A eliminação fecal é descrita como insignificante (EMA, 2008).

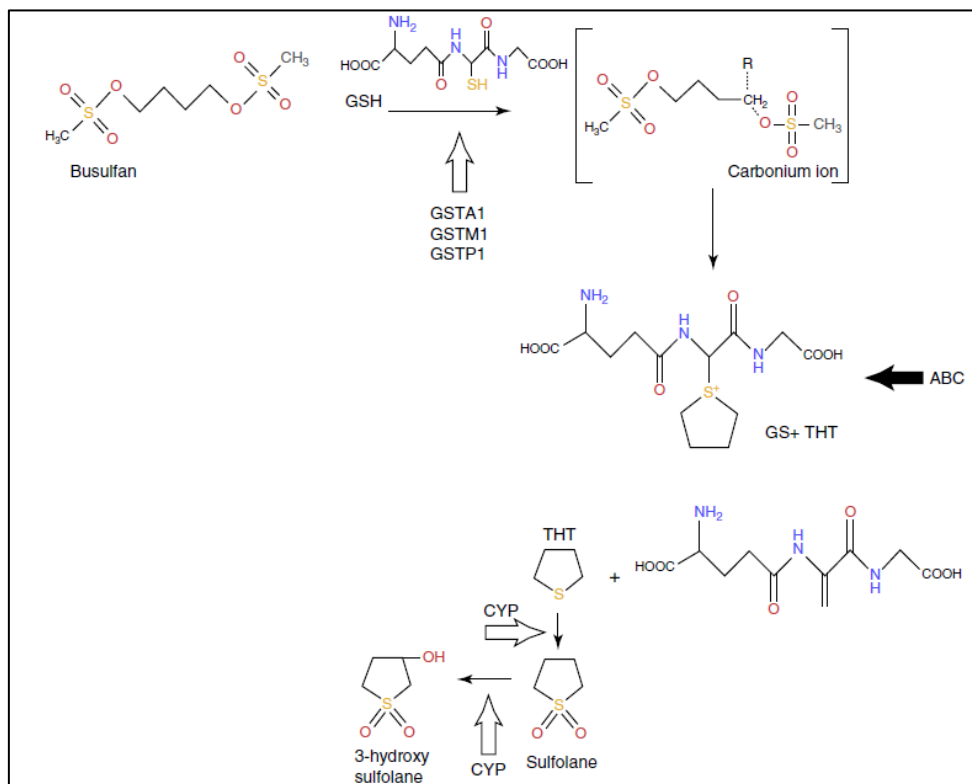


Fig.4: Metabolização do bussulfano e potencial envolvimento de enzimas e transportadores (adaptado de Ten Brink *et al.*, 2014)

2.2.3. VARIABILIDADE INTRA-INDIVIDUAL E INTER-INDIVIDUAL NOS PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS

Comparativamente com a formulação oral, a formulação IV apresenta menor poder emetizante e permite uma disponibilidade imediata e completa da dose.

Apresenta ainda um perfil farmacocinético (PK) mais estável, com uma cinética linear entre 32 mg/m^2 ($\approx 0,8 \text{ mg/kg}$) e 130 mg/m^2 ($\approx 3,2 \text{ mg/kg}$), o que contribui para uma redução na variabilidade dos parâmetros PK. A variabilidade intra-individual na exposição ao bussulfano reduziu após a introdução da formulação injectável para valores inferiores a 15% e a variabilidade inter-individual para valores entre os 20 e 30% (Bartelink *et al.*, 2009; Madden *et al.*, 2007; Ten Brink *et al.*, 2014; Tran *et al.*, 2004).

Num estudo de Bartelink *et al.* (2012), em doentes pediátricos observou-se uma variabilidade intra-individual de 15% na clearance do fármaco (CL) entre os 4 dias de administração de bussulfano IV. Contrariamente, outros estudos não reportaram uma variação intra-individual significativa na exposição ao bussulfano e a via de administração não parece afectar o $t_{1/2}$, a CL e o Vd do fármaco (EMA, 2005).

O bussulfano injectável permite ainda que a dose diária seja administrada numa única toma. Em comparação com o regime de tomas múltiplas, o regime de toma única diária é caracterizado por um pico de concentração mais elevado, que não parece estar associado a nenhuma toxicidade aguda e não há acumulação do fármaco, ao contrário do regime de tomas múltiplas onde o estado estacionário é obtido apenas na 3ª dose (Bartelink *et al.*, 2009).

No regime de toma única diária, o intervalo entre administrações permite que haja um período sem concentração de bussulfano circulante, durante o qual poderá ocorrer a recuperação da glutathiona-S-redutase e glutathiona-S-transferase, as enzimas responsáveis pelo metabolismo do bussulfano. Pensa-se que esta forma de administração poderá reduzir a toxicidade, uma vez que o doente não é continuamente exposto ao fármaco (Bartelink *et al.*, 2009).

No entanto, os parâmetros PK parecem manter-se inalterados independentemente da dosagem ou do esquema de administração, fornecendo exposições plasmáticas diárias equivalentes (Madden *et al.*, 2007; Palmer *et al.*, 2016) .

Adicionalmente, os dois regimes não sugerem diferenças significativas nos resultados clínicos obtidos, contrariando a ideia de que o regime em toma única está associado a menor toxicidade. Este regime, no entanto, é mais conveniente para o doente e para

os profissionais de saúde e permite mais facilmente a implementação de protocolos de monitorização farmacoterapêutica (TDM) (Bartelink *et al.*, 2009; Ryu *et al.*, 2007).

Embora a formulação injectável tenha vindo suprimir as diferenças PK associadas à absorção do bussulfano oral, observa-se ainda uma variabilidade inter-individual nos parâmetros farmacocinéticos que pode variar entre 16-34% em crianças e adultos (Bartelink *et al.*, 2012; Nguyen, *et al.*, 2006; Ten Brink *et al.*, 2014; Yeh *et al.*, 2012).

Pensa-se que esta variabilidade tenha uma origem multifactorial, que reflecte diferenças na idade, peso, doença de base, terapêuticas concomitantes e variações na metabolização (Russell *et al.*, 2008; Ten Brink *et al.*, 2012).

Em vários estudos, o peso corporal demonstrou ser a covariável predominante para explicar a variabilidade PK do bussulfano em adultos e crianças (EMA, 2008). Como é um fármaco lipofílico, os doentes obesos tendem a ter uma CL do fármaco em média 30% superior aos indivíduos de peso normal (Gibbs *et al.*, 1999).

Paralelamente ao peso, também a Superfície Corporal (SC) se apresenta como uma covariável que explica a variabilidade observada (Nguyen *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2006).

De acordo com um estudo realizado por Bartelink *et al.* (2012), num modelo bicompartimental, o peso é a covariável com maior valor preditivo para a CL, o Vd e para a CL inter-compartimental, explicando respectivamente 65%, 75% e 40% da variabilidade observada. Adicionalmente, a relação entre o peso e a CL pode ser descrita usando uma equação alométrica com expoente que varia com o peso, desde 1,2 em neonatos a 0,55 em adultos jovens. Assim, um aumento de peso em neonatos resulta numa CL maior de bussulfano do que um aumento de peso em crianças e adultos. Este efeito pode ser devido a diferenças na taxa de maturação da GST, diferenças no volume do fígado, fluxo sanguíneo e funções biliares nas crianças comparativamente com os adultos (Bartelink *et al.*, 2012).

Está demonstrado que as crianças mais novas (entre os 2 e 4 anos) têm um rácio elevado de THT+ (o metabolito do bussulfano) comparativamente com o bussulfano, devido à elevada conjugação com a GSH comparativamente com crianças mais velhas e adultos. Não foram medidos níveis elevados de GSH e sugere-se que o aumento do metabolismo se deve principalmente à maior actividade da GST do que a maior quantidade de GSH disponível (Ten Brink *et al.*, 2014).

Também em crianças muito pequenas, a CL do bussulfano aumenta aproximadamente 1,7 vezes entre as 6 semanas e 2 anos de vida (Savic *et al.*, 2013; Ten Brink *et al.*, 2014).

Vários grupos têm analisado o impacto de polimorfismos nos genes que codificam para a GST na PK do bussulfano. Crianças heterozigóticas ou homozigóticas para o haplótipo GSTA1*B parecem exibir uma diminuição na CL do fármaco em 30% após administração IV. No entanto, outros grupos não têm encontrado associações relevantes (Ten Brink *et al.*, 2014).

Quanto às doenças de base, os doentes com β -talassémia apresentaram maior CL de bussulfano devido à sobrecarga de ferro que induz a activação da GST. Num estudo publicado por Gaziev *et al.* (2010) em doentes com talassémia a CL de bussulfano após a 1ª dose foi 20% superior à CL após as doses 5, 9 e 13 (Gaziev *et al.*, 2010). Por outro lado, doentes pediátricos com doenças congénitas parecem apresentar CL mais baixas (Ten Brink *et al.*, 2014).

Até entre doenças oncológicas parece haver diferenças no metabolismo do bussulfano. Segundo Gibbs *et al.* (1999), os doentes com linfoma não-Hodgkin têm menores CL de bussulfano do que os doentes com LMC (Russell *et al.*, 2008).

De acordo com Yeh *et al.* (2012), a CL de bussulfano não está associada ao género nem à idade, mas com o dia do doseamento e com o tipo de condicionamento. Nos regimes com bussulfano e ciclofosfamida não se verificaram diferenças na CL entre os vários dias de administração, ao contrário dos regimes com bussulfano e fludarabina em que se verificou uma diminuição da CL entre o primeiro e quarto dia (Yeh *et al.*, 2012). Contrariamente, de acordo com Almog *et al.* (2011) a co-administração de fludarabina não afectou a PK do bussulfano e os parâmetros PK mantiveram-se estáveis e lineares em diferentes protocolos MAC e RIC (Almog *et al.*, 2011).

Quanto a outras interacções que podem afectar a PK do bussulfano, as mais importantes incluem a fenitoína, o paracetamol, o metronidazol e o itraconazol. Estes fármacos ou utilizam, tal como o bussulfano, a GSH no seu metabolismo ou interagem com o citocromo *CYP3A4* (Tab. 5) (Glantzbecker, *et al.*, 2012).

O itraconazol é um inibidor potente do citocromo *CYP3A4* e a fenitoína um forte indutor. A fenitoína é frequentemente substituída por outro anticonvulsivante, como o levetiracetam ou o clonazepam. O efeito do metronidazol deve-se possivelmente à depleção da GSH pelos seus metabolitos reactivos (Ten Brink *et al.*, 2014).

O uso de paracetamol, em concomitância ou 72 horas antes do bussulfano, pode diminuir a CL do bussulfano por reduzir a concentração de GSH disponível. Embora o significado clínico desta interacção esteja por esclarecer, o uso de paracetamol neste período deve ser evitado (Palmer *et al.*, 2016; Ten Brink *et al.*, 2014).

Tab.5: Interações fármaco-fármaco com o bussulfano (adaptado de Glotzbecker *et al.*, 2012)

Drug	Mechanism	Effect	Recommendation	Data Type
Acetaminophen	Competition for glutathione	Increased busulfan serum level	Do not use 72 hours before or 72 hours after busulfan administration.	Theoretical based on metabolism of agents
Itraconazole, voriconazole ^a	Reduced busulfan clearance	Increased busulfan serum level	Use with caution; monitor for adverse effects of busulfan; consider fluconazole as an alternative.	PK, HSCT
Metronidazole	Inhibition of CYP3A4; competition for glutathione	Increased busulfan trough level	Do not use 72 hours before or 72 hours after busulfan administration.	PK, prospective HSCT
Phenytoin	Induction of GST and CYP3A4	Decreased busulfan plasma level $\geq 15\%$	Consider using another anticonvulsant; if using phenytoin, monitor AUC of busulfan to guide levels.	CR, PK

PK indicates pharmacokinetic studies; CR, case reports.

^aVoriconazole interaction is theoretical based on the metabolism of the agent by the CYP450 3A4 system

Embora, tenham sido identificados fármacos que potencialmente interferem com o bussulfano, a evidência dos seus efeitos na prática clínica é limitada (Nguyen *et al.*, 2006; Palmer *et al.*, 2016; Ten Brink *et al.*, 2014).

2.2.4. FARMACODINÂMICA

Estão publicados numerosos estudos que descrevem a associação entre a exposição ao bussulfano e os resultados clínicos do TCPH.

A exposição a altos níveis plasmáticos de bussulfano tem sido associada a risco aumentado de toxicidades como mucosite grave, GvHD, DVO e mortalidade relacionada com o transplante (TRM). Em contraste, a exposição a níveis baixos tem sido associada a maior incidência de rejeição e recaída (Ciurea *et al.*, 2009; Russell *et al.*, 2008).

O valor alvo para a exposição ao bussulfano pode ser expresso em diferentes unidades de medida: concentração em estado estacionário (C_{ss}) em ng/mL e área sob a curva da concentração *versus* tempo (AUC) em $\mu\text{Molar}\cdot\text{min}$ ou em $\text{mg}\cdot\text{h/L}$. Estas medidas podem ser ainda apresentadas por dose ou por exposição cumulativa (Bartelink *et al.*, 2016).

Ao longo das últimas décadas têm sido estudadas várias gamas de valores alvo para a exposição ao bussulfano nos regimes com ciclofosfamida (BuCy) ou melfalano (BuMel) e mais recentemente nos regimes com fludarabina (BuFlu) (Ten Brink *et al.*, 2014).

A literatura sugere uma janela terapêutica traduzida por uma AUC_(0-6h) entre 3,9 e 6,2 mg*h/L, equivalente a uma exposição diária entre 14,8 e 24,6 mg*h/L e a uma exposição cumulativa de 60 a 98 mg*h/L (EMA, 2008).

Segundo Bartelink *et al.* (2009) uma margem terapêutica mais estreita, entre 74-82 mg*h/L, para o regime BuCy está relacionada com maior a sobrevivência livre de eventos e sobrevivência global e menor incidência de rejeição e recaída. Adicionalmente, a GvHD grau II-IV pareceu ser mais frequente em doentes expostos a níveis mais elevados de bussulfano (Bartelink *et al.*, 2009).

Dados de um estudo recente de fase III em doentes idosos com LMA indicam que o condicionamento com BuFlu está associado a menor TRM do que o condicionamento com BuCy e mantém a mesma atividade antileucêmica (Bartelink *et al.*, 2016; Rambaldi *et al.*, 2015). Nestes regimes, em doentes pediátricos no contexto de transplantes alogênicos, o bussulfano tem sido ajustado para uma AUC alvo entre 80-95 mg*h/L e o perfil de toxicidade é favorável comparativamente com o regime BuCy ou BuMel e igualmente eficaz (Andersson *et al.*, 2008; Bartelink *et al.*, 2014; Geddes *et al.*, 2008; Ten Brink *et al.*, 2014).

Mais recentemente, uma AUC entre 78 e 101 mg*h/L mostrou estar relacionada com maior sobrevivência livre de eventos em crianças e adultos jovens comparativamente com exposições inferiores ou superiores (Fig. 5). A rejeição e recaída ocorrem com maior frequência com exposições inferiores e toxicidades agudas e TRM são significativamente maiores em grupos com exposições superiores (Bartelink *et al.*, 2016).

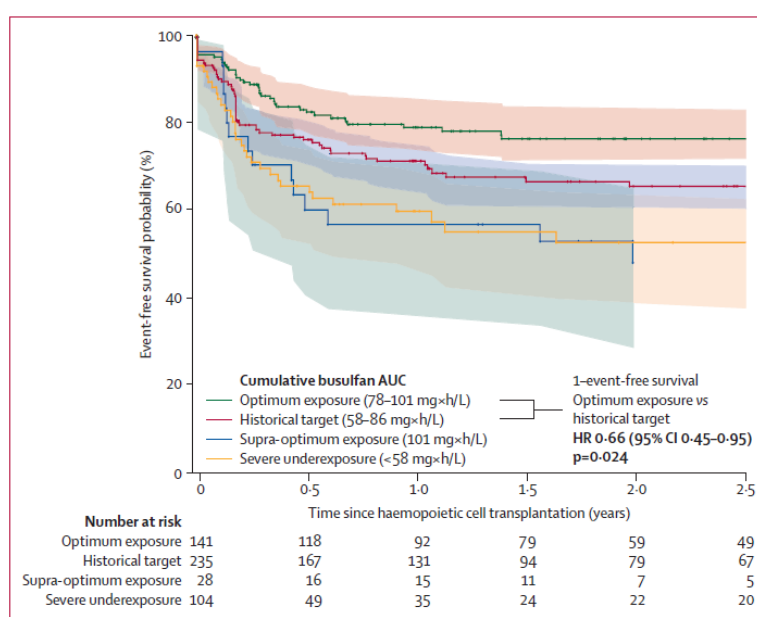


Fig. 5: Curvas Kaplan-Meier da probabilidade de sobrevivência livre de eventos nos diferentes grupos de exposição ao bussulfano (adaptado de Bartelink *et al.*, 2016)

A exposição a altos níveis de bussulfano e a combinação de bussulfano com ciclofosfamida estão relacionados com risco aumentado de DVO. A hepatotoxicidade do bussulfano é dose dependente, pelo que uma AUC cumulativa para 4 dias > 100 mg*h/L poderá estar associada a maior taxa de DVO (Krivoy *et al.*, 2008).

Por outro lado, a incidência de DVO pode diminuir quando a administração de bussulfano e ciclofosfamida são espaçadas o suficiente para que haja reposição da GSH ou quando a ciclofosfamida é substituída pela fludarabina (Ciurea *et al.*, 2009; Ten Brink *et al.*, 2014). Também a alteração na ordem de administração dos fármacos, ou seja, administrar primeiro a ciclofosfamida e só depois o bussulfano está associado a menor mortalidade avaliada 100 dias após o transplante e menor incidência de DVO nos doentes com mielofibrose (Rezvani *et al.*, 2013).

2.3. MONITORIZAÇÃO FARMACOTERAPÊUTICA DE BUSSULFANO

A monitorização farmacoterapêutica (TDM) tem grande valor clínico para fármacos com janelas terapêuticas estreitas, com uma relação clara entre a exposição e o resultado clínico, quando a variabilidade inter-individual é significativa e a variabilidade intra-individual é pequena, quando são feitas múltiplas administrações, não existem outros parâmetros laboratoriais alternativos e se dispõe de método analítico apropriado. O bussulfano IV cumpre todos estes critérios (Ten Brink *et al.*, 2014).

A variabilidade farmacocinética associada à estreita margem terapêutica têm suportado a TDM do bussulfano. A TDM, e conseqüente utilização de doses de bussulfano ajustadas individualmente, permitem uma optimização da eficácia e uma diminuição da incidência de toxicidades, com reflexo na recuperação pós-transplante dos doentes e na redução do impacto associado ao tratamento das toxicidades.

Considera-se que a TDM é necessária nos regimes de alta dose, nos regimes em que há evidência de associações farmacodinâmicas ou quando o regime foi desenvolvido já com TDM (por exemplo: Bussulfano/melfalano, vorinostat / gemcitabina / bussulfano /melfalano ou ciclofosfamida/bussulfano). O benefício da TDM nos regimes RIC não foi ainda sistematicamente avaliada (Palmer *et al.*, 2016).

Para a TDM do bussulfano, são feitas colheitas sequenciais de amostras de sangue para doseamento plasmático de bussulfano e posterior análise PK. A obtenção das amostras durante um período de tempo adequado é fundamental para a estimativa precisa da exposição ao bussulfano. Este período de colheita deve ter em conta o tempo de semi-vida do bussulfano (entre 2 a 3 horas), a frequência de administração e questões logísticas que permitam realizar a TDM em tempo útil (Palmer *et al.*, 2016).

Vários métodos analíticos têm sido desenvolvidos e publicados (Tab. 6) para a determinação de bussulfano em plasma, baseados em técnicas cromatográficas acopladas a diferentes métodos de detecção, nomeadamente a cromatografia gasosa (GC) acoplada a um detector de captura de electrões ou de espectrometria de massa (MS) (Athanasiadou *et al.*, 2014; Burns, *et al.*, 1995). Foram igualmente apresentadas metodologias baseadas na técnica de cromatografia líquida (LC) acoplada a detectores de ultravioleta (UV) ou de fluorescência, e mais recentemente um método baseado na técnica por imunoensaio ELISA (Courtney *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2009).

Contudo, são os métodos que utilizam a técnica de LC acoplada ao MS ou ao MS/MS (MS em tandem), que oferecem um maior grau de sensibilidade, necessitando apenas de um pequeno volume de amostra (o que é relevante em doentes pediátricos), e tempos de análise curtos, para além de possibilitarem a eliminação de procedimentos

de derivatização complexos e morosos, vulgarmente utilizados noutras metodologias, nomeadamente, por GC-MS (French, et al., 2014).

Tab. 6: Resumo dos métodos analíticos para doseamento de bussulfano publicados na literatura (adaptado de Ten Brink *et al.*, 2014)

Method	Concentration range	Sample quantity	Run time (min)	Derivatization time	Estimated total time
LC-MSMS	123–2463 µg/L	50 µl plasma	3	Not applicable	2 h for ten samples
LS-MS	10–2000 µg/L	200 µl plasma	10	Not applicable	Unknown
GC-MS	20–2000 µg/L 40–4000 µg/L	1000 µl plasma 1000 µl blood	14 12 min	2 h 1 h	Unknown 24 h for 40 samples; 3 h manual labor
HPLC-UV	100–2000 µg/L 30–8000 µg/L	200 µl plasma 200 µl serum	10 10	Direct Direct	32 min per samples 2 h for ten samples

No que diz respeito à estimativa dos parâmetros PK, têm sido usadas estratégias de modelação não compartimental e compartimental. Nas primeiras, é utilizado o método dos trapézios para calcular as AUCs por dose, a CL (Dose/AUC) e o respectivo ajuste de dose. Nas segundas, podem ser abordadas estratégias de modelação Bayesianas ou não Bayesianas na estimativa dos parâmetros PK, nomeadamente no Vd e na CL. Idealmente, a estratégia Bayesiana é recomendada e estratégias que envolvam dose de teste não são encorajadas (Palmer *et al.*, 2016).

3. TRANSPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS NO IPOLFG

A Unidade de Transplantação de Progenitores Hematopoiéticos do IPOLFG foi o primeiro centro nacional a realizar transplante medular. Foi inaugurada em 1987, e apesar da transplantação de medula óssea se ter iniciado em Portugal com algum atraso em relação a outros países europeus, rapidamente o programa do IPOLFG acompanhou o que de mais relevante se faz nesta área no plano internacional. Ao longo dos seus anos de actividade introduziu actuações pioneiras como a 1ª transplantação utilizando células de sangue de cordão umbilical em 1994 e os primeiros transplantes alogénicos com células do sangue periférico, a 1ª transplantação com dador não relacionado em 1995, a 1ª transplantação em ambulatório em 1999 e disponibilizando ainda técnicas apenas nela praticadas como a fotofereze extracorporal e a irradiação corporal total, esta última em colaboração com o Serviço de Radioterapia.

Desde o início da sua actividade foram realizadas mais de 1800 transplantações, autólogas e alogénicas, em crianças e adultos. Toda esta actividade é reportada regularmente à Autoridade para os Serviços de Sangue e Transplantação (ASST), ao *European Group for Blood and Marrow Transplantation* (EBMT) e ao *Center for International Blood & Marrow Transplant Research* (CIBMTR). Assim, é um serviço de referência nacional, reconhecido e acreditado internacionalmente.

Para além da actividade de transplantação a Unidade é também um centro de colheita de progenitores hematopoiéticos, tanto para utilização própria, como para disponibilização para outros centros, nacionais ou no estrangeiro, sendo parte integrante da rede internacional que permite a realização de transplantes com dadores não familiares.

4. METODOLOGIA

TIPO DE ESTUDO

Estudo quasi-experimental, longitudinal, prospectivo e analítico.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Adultos e crianças seguidos no Serviço de Transplantação de Progenitores Hematopoiéticos (UTM) do IPOLFG submetidos a TCPH sob regime de condicionamento que incluísse o bussulfano.

A participação em todas as fases do estudo envolveu consentimento informado.

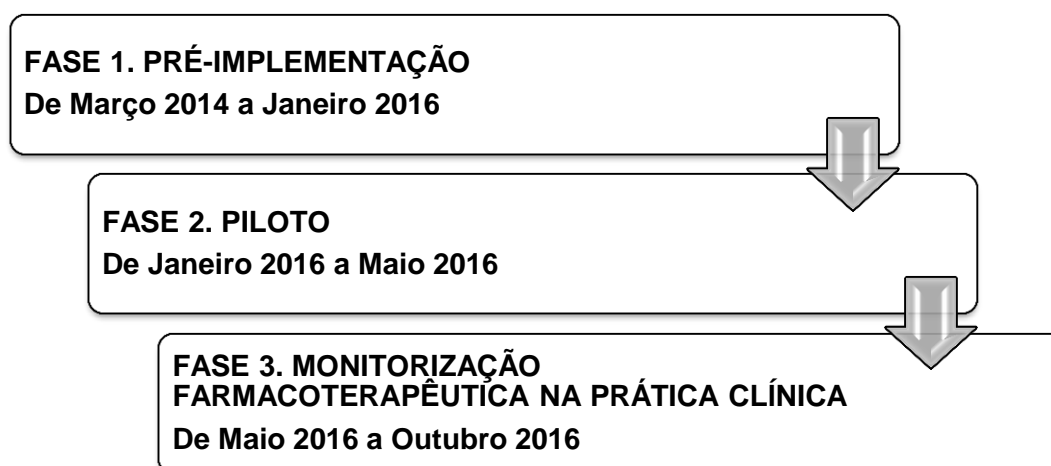
CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Durante a fase piloto do estudo, foram excluídos os doentes, cuja programação do regime de condicionamento, levava que a administração de bussulfano fosse realizada durante o fim-de-semana.

APROVAÇÕES

Este estudo obteve parecer favorável do Conselho de Administração, Centro de Investigação Clínica e Comissão de Ética do IPOLFG (Março de 2015).

DESENHO DO ESTUDO



4.1. FASE 1. PRÉ-IMPLEMENTAÇÃO

A fase pré-implantação envolveu pesquisa bibliográfica e o estabelecimento de parcerias.

Incluiu-se também nesta fase o desenvolvimento e validação da metodologia analítica para o doseamento plasmático de bussulfano.

4.1.1. PESQUISA BIBLIOGRÁFICA E DE PARCERIAS

Em reunião multidisciplinar e com base na literatura publicada até então, foi identificada a necessidade e oportunidade de intervenção farmacêutica na TDM de bussulfano.

Assim, foi feita uma pesquisa bibliográfica e foram consultados vários centros na área de transplante de medula: *University Medical Center Utrecht* (Holanda), *Leiden University Medical Center* (Holanda), *Maastricht University Medical Centre* (Holanda), *Institut Goustave Roussy* (França), *Columbia University Medical Center* (EUA), *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* (EUA) e *University Medical Center Hamburg-Eppendorf* (Alemanha). Nesta consulta pretendeu-se obter informação sobre aspectos práticos da TDM de bussulfano nesses centros, como o método de doseamento utilizado, esquema de administração, protocolo de colheitas, *software* utilizado para análise farmacocinética, circuito implementado e número de doentes sob TDM por ano.

Posteriormente, e tendo em conta os métodos analíticos descritos na bibliografia e os métodos utilizados nos centros consultados, avaliou-se a possibilidade de executar o doseamento plasmático de bussulfano no IPOLFG ou na Faculdade de Farmácia de Lisboa (FFUL). Não sendo possível fazer internamente este doseamento, optou-se por recorrer a entidades externas.

Consultaram-se vários laboratórios na região de Lisboa (Laboratório de cromatografia e electroforese da Faculdade de Ciências, Serviço de Toxicologia Forense do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Departamento de medicina desportiva, Centro de espectrometria de massas e Laboratório de análises de águas do Instituto Superior Técnico, Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica/ Instituto de Tecnologia Química e Biológica - IBET/ITQB) e analisaram-se as respostas obtidas, considerando o método analítico disponível, as condições gerais da análise/funcionamento do laboratório, e o preço proposto. Com base nestes critérios, decidiu-se recorrer ao Serviço de Toxicologia Forense do Instituto de

Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF), com o qual se estabeleceu um protocolo de colaboração.

De seguida fez-se uma pesquisa dos transportadores disponíveis, com o intuito de efectuar o transporte das amostras entre o IPOLFG e o INMLCF. Após a análise das respostas obtidas seleccionou-se o transportador que trabalha habitualmente com o IPOLFG.

Solicitou-se ainda o apoio do Serviço de Imunohemoterapia (SI) do IPOLFG para a recolha de amostras de plasma, utilizadas na validação da técnica analítica, e para o processamento das amostras biológicas ao longo deste trabalho.

4.1.2. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE BUSSULFANO EM AMOSTRAS DE PLASMA

Para o desenvolvimento e validação do método de quantificação de bussulfano em amostras de plasma foi realizada uma parceria com o Serviço de Toxicologia Forense do INMLCF.

Numa fase inicial procedeu-se à:

- Aquisição de padrões pelo IPOLFG [bussulfano, em solução a 1 mg/mL em metanol e com um grau de pureza > 99% e padrão interno bussulfano deuterado (Bu-D8) com um grau de pureza de 100%] e reagentes (acetonitrilo, a água e o metanol, formato de amónio, ácido fórmico 98-100%);
- Recolha de amostras de plasma, provenientes de doentes submetidos a regimes de condicionamento que não incluía o bussulfano, e de amostras de plasma “brancas”, ou seja, isentas da substância a pesquisar, obtidas de indivíduos saudáveis, dadores de sangue no IPOLFG, para avaliar o efeito de matriz e a existência de interferentes no doseamento do fármaco.

Desenvolvimento

O desenvolvimento do método de quantificação de bussulfano em amostras de plasma compreendeu as seguintes etapas:

1. Selecção da fase móvel em simultâneo com a optimização dos parâmetros da fonte de ionização e do analisador;

2. Selecção de duas transições iónicas características resultantes da fragmentação do ião molecular para o bussulfano e de uma transição iónica para o padrão interno;
3. Optimização das condições cromatográficas testando várias colunas e diferentes gradientes da fase móvel;
4. Estabelecimento do procedimento de preparação das amostras de plasma (tendo-se adoptado um procedimento simples de precipitação de proteínas seguida de um passo de diluição).

A análise das amostras foi efectuada utilizando um Cromatógrafo de Líquidos de Ultra Performance (UPLC) Acquity acoplado a um espectrómetro de massa/massa (MS/MS) triplo quadrupolo Acquity TQ Detector (Waters, Milford, MA, EUA).

O controlo do equipamento e a aquisição de dados foi realizada através do *software* MassLynx™ V4.1 SCN714 e o processamento de dados foi efectuada com recurso ao *software* TargetLynx™ V4.1 SCN 714.

A linearidade e modelo de calibração foram validadas na gama de trabalho de 50 a 8000 ng/mL.

O limite de detecção e de quantificação é de 20 e 50 ng/mL, respectivamente.

Importa ainda referir que o método desenvolvido requer um volume pequeno de amostra (50 µL), um procedimento de preparação das amostras simples, apresenta uma eficiência de extracção elevada e não apresenta efeitos de matriz significativos. Tem elevada sensibilidade resultante da aplicação da tecnologia UPLC-MS/MS que permite uma análise rápida das amostras com um tempo total de 4,5 minutos por amostra.

Validação

Antes de ser feita a análise de amostras reais, o método analítico foi validado de modo a garantir a qualidade dos resultados.

A validação do método analítico desenvolvido foi realizada de acordo com as recomendações internacionais e as práticas comuns utilizadas para a validação de métodos em toxicologia forense (*Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, Scientific Working Group for Forensic Toxicology*). Assim, os parâmetros incluídos na validação foram os seguintes: selectividade; efeito de matriz; eficiência de extração; arrastamento; limite de detecção e de quantificação; modelo de calibração (linearidade); repetibilidade; precisão intermédia; exactidão e robustez.

Validação cruzada dos resultados com centro de referência

A validação cruzada de resultados analíticos consistiu na análise cruzada de amostras, calibradores e controlos positivos entre o INMLCF e o UMC Utrecht e na comparação dos resultados obtidos.

No INMLCF, as amostras foram testadas em dois aparelhos: UPLC-TQD (Waters) e QuattroMicro (Waters). Ambos os equipamentos são LC-MS/MS com detectores do tipo triplo quadrupolo. O primeiro é um modelo mais recente, cujo cromatógrafo é UPLC e tem um detector mais sensível e rápido.

4.2. FASE 2. PILOTO

Nesta fase pretendeu-se implementar o procedimento de TDM de bussulfano num período de teste para se aferir a sua exequibilidade a nível institucional, sem que fossem feitos eventuais ajustes às doses de bussulfano.

No IPOLFG, o bussulfano é administrado numa perfusão IV de 2 horas de 6 em 6 horas, no máximo, em 4 dias consecutivos (total de 16 doses). No entanto, a duração é variável de acordo com o regime de condicionamento seleccionado, podendo ser também de 2 ou 3 dias.

Nesta fase do estudo (prévia à implementação na prática clínica) foram colhidas amostras, sempre que possível, após a 1ª, 5ª, 9ª e 13ª toma de bussulfano. Inicialmente, a 1ª dose de bussulfano era habitualmente administrada às 6h, sendo depois alterado este horário para as 18h, de modo a que fosse possível realizar todo o circuito inerente à TDM (descrito mais à frente no ponto 4.3.1.).

Esta fase compreendeu 2 etapas:

- Colheita e processamento de amostras biológicas em tempo real com doseamento e análise PK *a posteriori*;
- Colheita, processamento de amostras biológicas, doseamento e análise PK em tempo real.

4.2.1. COLHEITA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS EM TEMPO REAL / DOSEAMENTO E ANÁLISE PK A POSTERIORI

Nesta etapa introduziu-se a colheita de amostras biológicas após a administração de bussulfano, bem como o processamento das mesmas.

As amostras foram congeladas a – 80°C (temperatura em que não há degradação de bussulfano) e enviadas posteriormente para o INMLCF para doseamento do bussulfano. A análise PK foi também realizada *a posteriori*.

Os objectivos nesta fase foram: testar o protocolo de administração de bussulfano, o procedimento de colheita das amostras biológicas e o processamento das amostras; otimizar o envio das amostras entre os serviços intervenientes; testar o método analítico e o tempo necessário para análise e o método de análise *PK*.

4.2.2. COLHEITA, PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS, DOSEAMENTO E ANÁLISE PK EM TEMPO REAL

Os objectivos nesta fase foram: otimizar a articulação entre os diversos intervenientes; testar o transporte em tempo real (transporte entre IPOLFG e INMLCF) e otimizar todo o circuito de forma a obter uma proposta posológica em menos de 24h.

4.3. FASE 3. MONITORIZAÇÃO FARMACOTERAPÊUTICA DE BUSSULFANO NA PRÁTICA CLÍNICA

4.3.1. CIRCUITO

As questões logísticas associadas a um procedimento de TDM de bussulfano são complexas, uma vez que envolvem muitos intervenientes, todos os passos devem ser feitos com bastante rigor e o tempo de resposta é um aspecto limitante (pretende-se ter uma resposta em tempo útil, ou seja, em menos de 24h).

Assim, apenas em contexto multidisciplinar foi possível delinear o circuito (Fig. 6), desenhar os procedimentos e os formulários de recolha de dados.

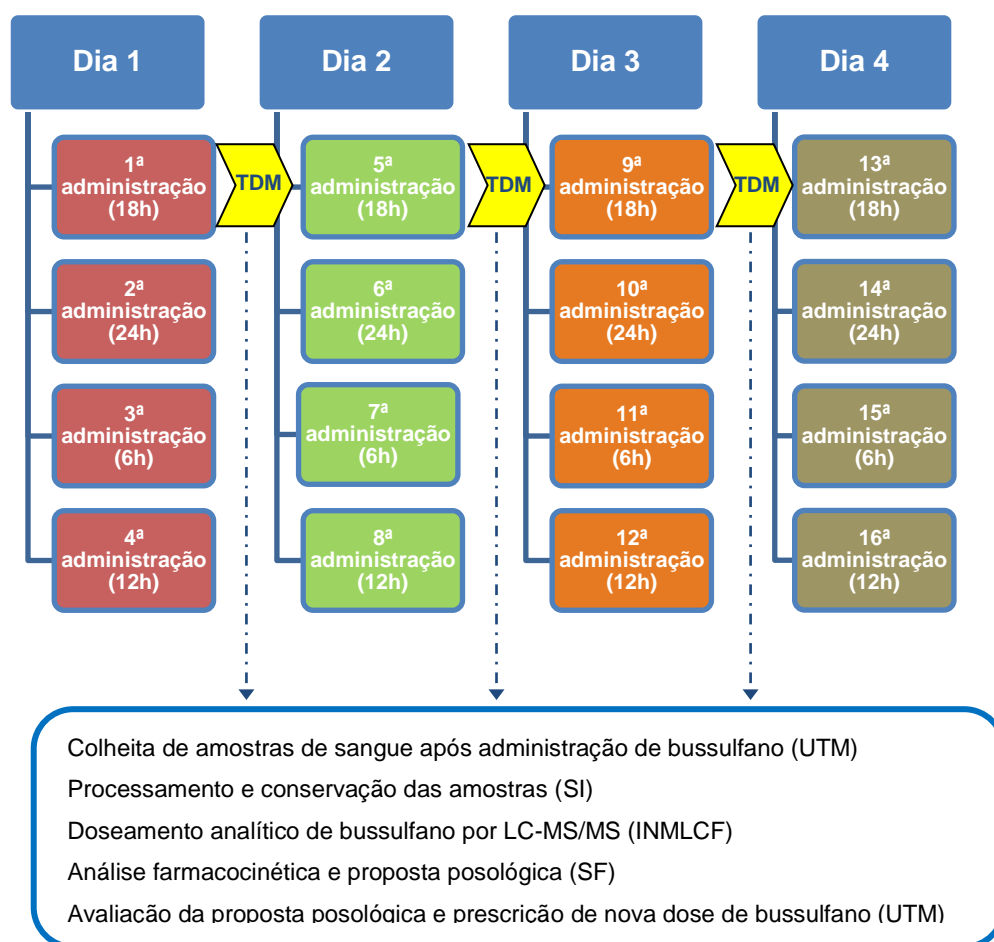


Fig. 6: Circuito TDM bussulfano no IPOLFG

Na prática clínica, estipulou-se que se faria TDM à 1ª, 5ª e 9ª tomas de bussulfano. Nas situações em que fosse realizado um grande ajuste posológico também se efectuaria na 13ª toma. Assim, entre a 1ª- 4ª administração não houve alteração na dose do fármaco, bem como entre a 5ª- 8ª e a 13ª-16ª administração.

Sempre que esteve prevista a administração de um regime de condicionamento que incluísse bussulfano, a UTM informou o SF, que comunicou com os restantes intervenientes.

Após ser estabelecida a dose de bussulfano a administrar, a mistura intravenosa de bussulfano foi preparada na Unidade de Preparação de Citotóxicos do SF. A solução para perfusão de bussulfano 6mg/mL (Busilvex[®], Pierre Fabre Médicament Production, França) foi diluída numa solução injectável de cloreto de sódio a 9 mg/mL (0,9%), sendo que a concentração final de bussulfano permaneceu em aproximadamente 0,5 mg/mL.

De seguida foi feito o transporte da mesma para UTM, onde o medicamento foi administrado ao doente. Após a administração, foram realizadas as colheitas de sangue e os tubos de colheita foram armazenados no frigorífico da UTM até estar concluído o protocolo de colheitas. Terminada esta etapa, os tubos foram transportados para o SI, onde se executou o processamento das amostras e o seu armazenamento a -80°C.

Por volta das 8h do dia seguinte, o transportador fez a recolha das amostras e o respectivo transporte para o INMLCF. Aqui foi feita a preparação das amostras e o doseamento plasmático de bussulfano por cromatografia líquida associada a espectrometria de massa (LC-MS/MS).

Uma vez concluído este processo, os resultados do doseamento foram comunicados por email para o SF. Aqui foi feita a análise dos dados e a análise PK, do que resulta uma proposta posológica. Esta foi comunicada ao médico prescriptor, que ao aprovar a nova posologia, fez as alterações necessárias na prescrição.

4.3.2. ADMINISTRAÇÃO DE BUSSULFANO, COLHEITA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

O bussulfano foi administrado de acordo com os protocolos institucionais para os regimes de condicionamento pré-TCPH. De uma forma sucinta, foi associado a outros citotóxicos como a ciclofosfamida (BuCy), melfalano (BuMel), tiotepa (BuTiotepa) ou fludarabina (BuFlu), ou a mais do que um dos fármacos referidos.

A dose de bussulfano foi prescrita segundo as recomendações do RCM e utilizando para o cálculo o peso ideal ajustado, de acordo com o seguinte racional:

Se $\text{Peso Real} \geq \text{peso ideal} * 1.3 \rightarrow \text{peso ideal ajustado} = \text{peso ideal} + 0.25 (\text{Peso real} - \text{peso ideal})$

Se $\text{Peso Real} < \text{peso ideal} * 1.3 \rightarrow \text{peso ideal ajustado} = \text{peso real}$

A mistura IV de bussulfano foi administrada durante 2 horas, sendo que a taxa de perfusão se calculou de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Taxa de perfusão (ml/h)} = [\text{Volume total da preparação de bussulfano} - \text{Volume inicial de Bussulfano que preenche o sistema} + \text{Volume de NaCl 0,9\% final para lavagem do sistema}] / 2h$$

Foram definidos todos os sistemas de administração e volumes de enchimento do sistema de administração e de lavagem após administração.

As amostras de sangue foram colhidas de acordo com o seguinte esquema:

Amostra 1: 5 minutos após final da perfusão

Amostra 2: 1 hora após final da perfusão

Amostra 3: 2 horas após final da perfusão

Amostra 4: 3 horas após final da perfusão

Amostra 5: 4 horas após final da perfusão ou antes da administração seguinte (24h)

Foi utilizado para as colheitas de sangue o lúmen do catéter venoso central onde não foi administrado o fármaco e após parar todas as perfusões de todos os lúmens. Foram usados tubos com EDTA e o volume colhido por amostra foi de 2mL nos adultos e 1mL nas crianças.

As amostras foram de seguida centrifugadas em centrífuga refrigerada (Centrífuga de soros Hettich 320) e o sobrenadante armazenado em *eppendorfs* a -80 °C em arca congeladora com temperatura controlada (Cryocell Merit Ultra freezer).

É importante referir que, para uma análise rigorosa da PK do fármaco, é necessário ter informação fidedigna sobre quando é iniciada e terminada a administração do fármaco, registo exacto das horas de colheita, mesmo que não cumpram rigorosamente o protocolo.

As etapas de administração, colheita e processamento das amostras requerem o preenchimento de um formulário próprio, com registo de hora e identificação dos intervenientes (Anexo II).

4.3.3. ANÁLISE FARMACOCINÉTICA (PK)

A TDM inclui a análise das concentrações séricas de bussulfano e o cálculo dos parâmetros PK do indivíduo. A articulação da informação clínica do doente com a informação farmacocinética gerada permite definir uma proposta posológica.

A modelação PK foi feita utilizando programa ADAPT-5 (Biomedical Simulations Resource, EUA). Utilizou-se um modelo monocompartimental e uma análise individual, que utiliza o método da máxima verossimilhança (ML) para a estimativa dos parâmetros farmacocinéticos.

O modelo monocompartimental considera o organismo humano como um compartimento único, assumindo que a distribuição do fármaco é instantânea, estabelecendo-se um equilíbrio entre o sangue e os tecidos onde se distribui o fármaco e que a eliminação se processa de acordo com uma cinética de primeira ordem (Larry *et al.*, 2008).

O método de máxima verossimilhança é um método de ajustamento que estima os valores dos diferentes parâmetros do modelo estatístico de maneira a maximizar a probabilidade dos dados observados (Bonate *et al.*, 2006), neste caso otimizando quer os parâmetros farmacocinéticos do modelo, quer os parâmetros do modelo de variância que descreve a variabilidade nos dados experimentais.

Os parâmetros farmacocinéticos a calcular foram:

- CL (volume plasmático depurado de fármaco por unidade de tempo);
- Vd (volume no qual o fármaco precisaria de ser uniformemente distribuído para produzir a concentração sanguínea observada);
- $t_{1/2}$ (tempo necessário para eliminar metade da dose administrada de um fármaco).

Como condições iniciais foram definidas uma CL de 10 L/h e um Vd de 60 L para adultos e uma CL de 3L/h e um Vd de 10 L para crianças.

Para a variância assumiu-se que a mesma é de natureza proporcional à concentração com um declive inicial $\beta = 0,1$ (10%).

A área da curva de concentração *versus* tempo (AUC) bem como a proposta de nova dose foram calculados numa folha de cálculo *Excel* desenhada para este efeito.

Os cálculos foram feitos de acordo com as seguintes fórmulas:

$$\text{AUC calculada (mg*h/L)} = \text{Dose (mg)} / \text{CL (L/h)}$$

$$\text{AUC cumulativa calculada (mg*h/L)} = \text{Dose} / \text{CL (L/h)} \times \text{n}^\circ \text{ de dias em que faz bussulfano}$$

$$\text{Cálculo da nova dose} = [(\text{AUC alvo} - \text{AUC calculada}) / (\text{dias que faltam de bussulfano} \times \text{AUC calculada})] \times \text{dose bussulfano actual}$$

$$\% \text{ de ajuste de dose} = (\text{Nova dose calculada} - \text{Dose actual}) / \text{Dose actual} \times 100\%$$

Foram definidos os valores alvo da AUC cumulativa de bussulfano de acordo com os intervalos terapêuticos descritos na bibliografia e o número de dias em que se administra o bussulfano (Tab. 7).

Nos regimes com mais do que um citotóxico para além do bussulfano foi considerada a AUC cumulativa alvo mais baixa.

Tab. 7: AUC cumulativa alvo (mg*h/L)

Regimes de condicionamento	Nº dias de Bussulfano	AUC cumulativa alvo (mg*h/L)
Bussulfano com Fludarabina	4	90 ±5%
	3	70±5%
Bussulfano com Ciclofosfamida, Melfalano ou Tiotepa	4	75±5%
	3	60±5%

Foram definidas ainda as seguintes premissas:

- Se o ajuste de dose calculado fosse <5% mantinha-se a mesma dose (para evitar pequenas flutuações na dose sem impacto nos resultados clínicos);
- Se o ajuste de dose proposto fosse > 25% limitava-se o ajuste a 25% (para que os ajustes fossem feitos gradualmente, tentando contornar possíveis erros ao longo do processo);
- Para efeitos de cálculo de nova dose no 1º dia reduziu-se 10% à dose recomendada (por estar descrita uma diminuição da CL de aproximadamente 10% entre o 1º dia e os dias subsequentes).

Considerando o esquema de condicionamento, foram ainda definidos os dias de início de tratamento com bussulfano e os dias para processamento das amostras, transporte, doseamento e a monitorização farmacoterapêutica.

Por fim, foram ainda estabelecidos as vias e horários de comunicação entre os diversos intervenientes.

4.3.4. RECOLHA DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados PK foram obtidos pela equipa farmacêutica do IPOLFG, no momento da análise PK de cada doente.

Os dados clínicos foram obtidos pela equipa farmacêutica e médica da UTM do IPOLFG.

Foram criados formulários próprios que pretendem recolher informação na admissão de cada doente, alta, 30 dias após o transplante e 100 dias após o transplante (Anexo III):

- Formulário 1. Recolha de dados clínicos (na admissão);
- Formulário 2. Avaliação de toxicidades (alta e 100±10 dias após o transplante);
- Formulário 3. Avaliação de resultados clínicos, como *engraftment*, quimerismo mielóide e linfóide, recaída, progressão da doença, rejeição 1ª, rejeição 2ª, morte (30 ±10 dias após o transplante e 100±10 dias após o transplante);
- Formulário 4. *Follow-up* da DVO (100±10 dias após o transplante).

A informação relativa aos resultados clínicos do transplante e das toxicidades desenvolvidas serão utilizadas em trabalhos futuros para avaliar o potencial benefício clínico deste procedimento.

A análise estatística dos resultados obtidos, incluindo análise descritiva, análise de variância (ANOVA), regressão linear, análises de correlação e modelo linear generalizado (GLM), foi feita utilizando o *software* STATGRAPHICS Centurion XV (Stat Point Inc, EUA).

5. RESULTADOS

5.1. INFORMAÇÃO RECOLHIDA

Na Tab.8 resume-se a informação remetida pelos vários centros consultados.

Conclui-se que as metodologias analíticas são variáveis entre centros, embora todos recorram a métodos cromatográficos.

Destacam-se as diferenças nos regimes de administração (tomas múltiplas e toma única diária), bem como o número de colheitas realizadas. Também a população alvo para TDM varia entre os vários centros apresentados.

Tab. 8: Resumo da informação recolhida centros consultados

CENTRO	INFORMAÇÃO RECOLHIDA
<i>University Medical Center Utrecht</i>	Metodologia analítica: LC-MS/MS (validada pelas <i>guidelines</i> da FDA) Software de análise PK: MW \Pharm Regime de administração de Bussulfano: 24/24h (perfusão 3h) Nomograma publicado em <i>Bartelink et al in. Clin Pharmacokinet. 2012</i> Protocolo de colheita de amostras: 5 minutos, 1h, 2h e 3h após o início da perfusão TDM no D1. Para ajustes de dose >25%, também em D2 (ou D3)
<i>Leiden University Medical Center</i>	Metodologia analítica: HPLC com detecção UV Regime de administração de Bussulfano: 24/24h (perfusão 3h) Protocolo de colheita de amostras: 4, 5 e 7 horas após o início da perfusão TDM no D1. Para grandes ajustes de dose, também em D2 30 doentes pediátricos sob regime de condicionamento com bussulfano /ano; TDM para todos
<i>Maastricht University Medical Centre</i>	Doseamento de bussulfano e análise PK no laboratório da farmácia do <i>University Medical Center Utrecht</i>
<i>Institut Goustave Roussy</i>	Metodologia analítica: GC-MS ou LC-MS/MS Análise PK: Departamento de PK da Pierre Fabre Oncologia Modelo populacional publicado em <i>Nguyen et al in BMT 2004</i> Regime de administração de Bussulfano: 6/6h (perfusão 2h) Nomograma aprovado pela EMA para o Busilvex® Protocolo de colheita de amostras: início da perfusão, 30 minutos e 3h após o final

	<p>da perfusão (dose 1 e dose 9); 3h após o final da perfusão (dose 13)</p> <p>TDM na dose 1, controlo da exposição nas doses 9 e 13</p> <p>População alvo: crianças com peso <9kg, citólise hepática, patologia hepática, submetidas a 2º transplante, obesas com IMC > 25 kg/m², que receberam tratamento com anticorpos monoclonais anti CD33, linfo-histiocitose, osteopetrose, imunodeficiência severa combinada, doenças lisossomais de sobrecarga, doenças imunológicas raras</p>
<i>Columbia University Medical Center</i>	<p>Metodologia analítica: LC-MS/MS (em fase de validação)</p> <p>Regimes de administração de Bussulfano: 24/24h (perfusão 3h) e 6/6h (perfusão 2h)</p>
<i>Memorial Sloan Kettering Cancer Center</i>	<p>Metodologia analítica: TFLC-MS/MS (turbulent flow liquid chromatography tandem mass spectrometry)</p> <p>Regimes de administração de Bussulfano: 24/24h, 12/12h e 6/6h</p> <p>Protocolo de colheita de amostras: 6 pontos</p> <p>4 doentes por semana</p>
<i>University Medical Center Hamburg-Eppendorf</i>	<p>Metodologia analítica: GC-MS (após derivatização)</p> <p>Análise PK apenas para investigação, sem aplicação na prática clínica</p>

5.2. RESULTADOS ANALÍTICOS DA VALIDAÇÃO CRUZADA

Os resultados das análises realizadas no âmbito da validação cruzada encontram-se no Anexo II.

O desvio percentual entre as concentrações obtidas com o equipamento QuattroMicro e as obtidas no UMC Utrecht para a análise das amostras variou entre -7% e -3%. No que diz respeito aos resultados obtidos com o equipamento UPLC-TQD e os obtidos no UMC Utrecht obteve-se uma diferença percentual entre -6% e 4%.

Embora existam diferentes *guidelines* internacionais (dependendo da aplicação prática da metodologia), é consensual aceitar um desvio até 15% relativamente à referência, podendo ir até 20% perto dos limites de quantificação.

5.3. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Entre Janeiro e Outubro de 2016, 21 doentes receberam um regime de condicionamento contendo bussulfano. Destes, os primeiros 7 doentes foram incluídos na fase piloto do estudo e os restantes 14 fizeram parte da fase de implementação na prática clínica. No início foram excluídos doentes cuja programação da administração de bussulfano incluía os fins-de-semana, uma vez que o doseamento só pode ser realizado nos dias úteis. Ao longo do projecto, a programação dos doentes para TCPH passou a ter em conta este aspecto.

As características demográficas dos doentes estudados são apresentadas na Tab. 9. A amostra incluiu crianças (9) e adultos (12) com idades compreendidas entre os 1,7 e os 63 anos. Os regimes de condicionamento administrados foram: BuCy (10), BuMel (3) e BuFlu (8).

Em particular, para os 14 doentes incluídos na fase de implementação na prática clínica são apresentados com mais detalhe diagnóstico, estado de remissão da doença, características do transplante, caracterização quanto ao risco de DVO e eventuais regimes profiláticos para DVO (Tab. 10).

A maioria dos doentes tinha como diagnóstico uma doença oncológica: Leucemia Mielóide Aguda (5), Leucemia Linfoblástica Aguda (1), Leucemia Mielomonocítica Crónica (1), Linfoma de Burkitt (1), Neuroblastoma (2). Apenas 4 doentes não apresentavam doença oncológica: Síndrome de Wiskott-Aldrich (1), Síndrome de Hurler (2) e Anemia Blackfan-diamond (1).

5.4. CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS

Os parâmetros PK são apresentados na Tab. 10. A CL média foi de 9,5 L/h, 8,8 L/h, 8,6 L/h e 8,7 L/h, no 1º, 2º, 3º e 4º dia, respectivamente. O Vd médio foi de 35,8 L, 40,1 L, 37,2 L e 40,3 L, no 1º, 2º, 3º e 4º dia, respectivamente. O $t_{1/2}$ foi de 2,5 h no 1º dia e de 3h nos restantes dias.

Verificou-se uma grande variabilidade nos parâmetros PK, com um coeficiente de variação na ordem dos 60% na CL e no Vd e de 30% no $t_{1/2}$.

Tab. 9: Caracterização demográfica da amostra

N	Sexo	Idade (anos)	Peso Real (kg)	Peso ajustado (kg)	Altura (cm)	SC (m2)	Tratamento
1	M	39	76.6	76.6	175	1.93	BuCy
2	M	28	98.0	98.0	188	2.26	BuMel
3	F	10	28.5	28.5	134	1.03	BuFlu
4	M	40	76.0	76.0	172	1.91	BuCy
5	M	9	40.0	32.5	134	1.23	BuCy
6	M	34	52.5	52.5	155	1.50	BuCy
7	M	5	14.2	14.2	109	0.66	BuFlu
8	M	1.67	11.8	11.8	83	0.52	BuCy
9	M	43	88.6	88.6	185	2.13	BuCy
10	M	49	104.0	104.0	190	2.34	BuFlu
11	F	6	19.0	19.0	112	0.77	BuFlu
12	M	63	89.6	85.6	190	2.17	BuFlu
13	M	3	14.5	14.5	86	0.59	BuFlu
14	M	39	94.0	81.9	183	2.19	BuFlu
15	M	42	91.4	73.7	172	1.88	BuCy
16	M	3	14.0	14.0	98	0.62	BuMel
17	M	15	75.0	75.0	175	1.91	BuCy
18	M	2	12.3	12.3	85	0.54	BuFlu
19	M	30	85.0	76.0	178	2.02	BuCy
20	F	45	67.0	61.5	168	1.77	BuCy
21	M	6	13.3	13.3	98	0.60	BuMel
média	-	24.4	55.5	52.8	146.2	1.46	-
mediana	-	28.0	67.0	61.5	168.0	1.77	-
D.P.	-	19.4	34.9	33.2	39.9	0.69	-
CV%	-	79	63	63	27	47	-
variação	3F - 18M	1.7 - 63	11.8 - 104	11.8 - 104	83 - 190	0.52 - 2.34	10 BuCy 8 BuFlu 3 BuMel

Tab. 10: Caracterização detalhada da amostra

Diagnóstico	Nº de doentes
Leucemia Mielóide Aguda	5
Leucemia Linfoblástica Aguda	1
Leucemia mielomonocítica Crónica	1
Linfoma Burkitt	1
Neuroblastoma	2
Sínd. Wiskott-Aldrich	1
Sínd. Hurler	2
Anemia Blackfan-diamond	1
Estado Remissão	
1ª Resposta completa	3
2ª Resposta completa	2
Resposta molecular	1
Resposta medular	1
Resposta parcial	1
Recaída	2
NA	4
Risco	
Baixo	10
Alto	2
NA	2
QT prévia	
Sim	10
Não	4
Tipo Transplante	
Alogénico relacionado	1
Alogénico Não relacionado	11
Autólogo	2
Origem das CPHT	
Medula óssea	3
Cordão umbilical	2
sangue periférico	9
Disparidade CMV	
Neg/Neg	3
Pos/Pos	6
Neg/Pos	2
Pos/Neg	1
NA	2
Risco de DVO	
Sim	6
Não	8
Profilaxia DVO	
Sim (Ác. Ursodesoxicólico)	6
Não	8

NA: Não aplicável; CMV: citomegavírus

Baixo risco :LMA em RC ≤2 ou LMC; Alto risco: LMA em RC >2 ou sem RC, SMD
 Risco de DVO: Doença hepática pré-existente, 2 ou mais TCPH mieloablativos, leucemia após recaída, osteopetrose, condicionamento com BuMel, síndromes activação macrofágica, adrenoleucodistrofia

Tab. 11: Caracterização dos parâmetros farmacocinéticos

N	Tratamento		Dia 1				Dia 2				Dia 3				Dia 4			
	AUC alvo (trat.mg/L)	Tomas	Dose (mg)	Cl (L/h)	t1/2 (h)	Vd (L)	Dose (mg)	Cl (L/h)	t1/2 (h)	Vd (L)	Dose (mg)	Cl (L/h)	t1/2 (h)	Vd (L)	Dose (mg)	Cl (L/h)	t1/2 (h)	Vd (L)
1	60	12	60	12.2	4.2	73.3	60.0	14.3	3.8	79.3	60.0	15.2	3.6	79.0	-	-	-	-
2	75	16	75	19.4	2.5	71.2	75.0	17.4	3.6	89.4	75.0	16.2	4.3	100.8	75.0	14.9	3.9	83.4
3	70	12	27	4.6	2.6	24.1	27.0	5.8	2.2	18.1	27.0	5.4	3.3	26.1	-	-	-	-
4	75	16	60	15.2	2.4	53.2	60.0	15.4	2.9	64.7	60.0	14.6	3.2	66.9	60.0	14.4	3.1	64.5
5	75	16	30	7.4	2.4	25.9	30.0	8.9	2.4	31.2	30.0	7.9	2.0	22.5	30.0	7.0	2.8	28.3
6	75	16	42	9.7	2.8	35.9	42.0	9.0	3.1	40.4	42.0	7.9	3.0	34.3	42.0	8.4	2.6	31.2
7	90	16	17	-	-	-	17.0	3.3	2.5	12.0	17.0	2.4	2.4	8.2	17.0	3.2	2.2	10.2
8	75	16	14	2.4	2.1	7.3	11.0	2.3	2.6	8.3	11.0	2.6	2.9	10.7	11.0	-	-	-
9	75	16	71	17.1	2.2	54.0	75.0	15.8	1.5	33.0	75.0	13.2	2.5	47.7	56.0	10.3	2.8	41.2
10	90	16	84	18.2	2.3	60.3	84.0	15.1	2.7	58.7	84.0	12.3	3.2	57.2	84.0	13.3	3.7	71.9
11	90	16	21	2.7	1.7	6.7	15.8	2.2	3.5	10.4	11.0	2.3	3.2	10.5	11.0	3.0	3.0	13.2
12	90	16	72	9.9	3.2	45.2	54.0	9.9	3.1	44.1	54.0	-	-	-	54.0	-	-	-
13	60	12	17	4.1	1.4	8.0	17.0	3.6	2.0	10.5	21.3	-	-	-	-	-	-	-
14	90	16	75	13.9	2.7	54.5	75.0	11.4	2.3	38.1	60.0	11.9	3.4	58.1	60.0	11.2	3.3	52.4
15	75	16	59	17.1	2.1	52.5	74.0	14.9	2.5	53.5	74.0	14.2	2.4	49.8	74.0	-	-	-
16	75	16	17	4.5	1.6	10.5	21.3	4.4	1.7	10.7	21.3	3.9	1.9	10.4	18.0	3.3	1.8	8.7
17	75	16	60	7.6	3.5	38.0	45.0	10.1	9.3	134.7	34.0	7.3	3.6	37.4	25.0	-	-	-
18	60	12	15	2.9	1.9	7.9	15.0	2.0	1.9	5.3	6.0	2.6	2.4	9.0	-	-	-	-
19	75	16	60	7.3	4.3	45.3	45.0	7.2	4.6	48.3	27.0	6.3	3.8	4.2	20.0	7.0	3.8	38.3
20	75	16	54	10.8	2.1	32.1	50.0	-	-	-	50.0	-	-	-	50.0	-	-	-
21	75	16	16	3.3	2.1	9.9	15.0	3.2	2.2	10.4	15.0	-	-	-	15.0	-	-	-
média	-	-	-	9.5	2.5	35.8	-	8.8	3.0	40.1	-	8.6	3.0	37.2	-	8.7	3.0	40.3
mediana	-	-	-	8.7	2.4	37.0	-	8.9	2.5	35.6	-	7.9	3.2	34.3	-	8.4	3.0	38.3
D.P.	-	-	-	5.7	0.8	22.3	-	5.3	1.7	33.5	-	5.0	0.7	28.5	-	4.5	0.7	25.4
CV%	-	-	-	60.1	30.9	62.4	-	60.3	55.1	83.6	-	58.4	22.3	76.5	-	51.2	21.8	63.1
variação	-	-	-	2.4 - 19.4	1.4 - 4.3	6.7 - 73.3	-	2 - 17.4	1.5 - 9.3	5.3 - 134.7	-	2.3 - 16.2	1.9 - 4.3	4.2 - 100.8	-	3 - 14.9	1.8 - 3.9	8.7 - 83.4

5.5. VARIABILIDADE DOS PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS

▪ Peso Ajustado

Correlacionando o peso ajustado e a CL verificou-se que estão fortemente relacionados ($r^2=0,7963$) e existe linearidade entre os dois parâmetros (Fig. 7). Desta forma, padronizando a CL ao peso (CL / Peso), resultou na redução significativa da variabilidade neste parâmetro para cerca de 30%.

A mesma relação foi também verificada no Vd. O Vd e o peso ajustado parecem também estar fortemente relacionados ($r^2=0,8834$) e existe linearidade entre os dois parâmetros (Fig. 8). Padronizando o Vd ao peso (Vd /Peso), resultou na redução significativa da variabilidade neste parâmetro para cerca de 20%.

Assim, a CL média encontrada foi de 0,19 L/h*kg e o Vd médio de 0,65 L*kg.

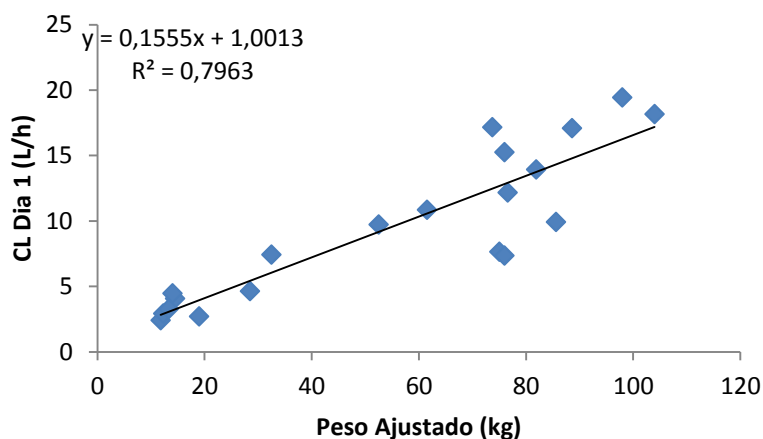


Fig. 7: Correlação entre CL e peso ajustado

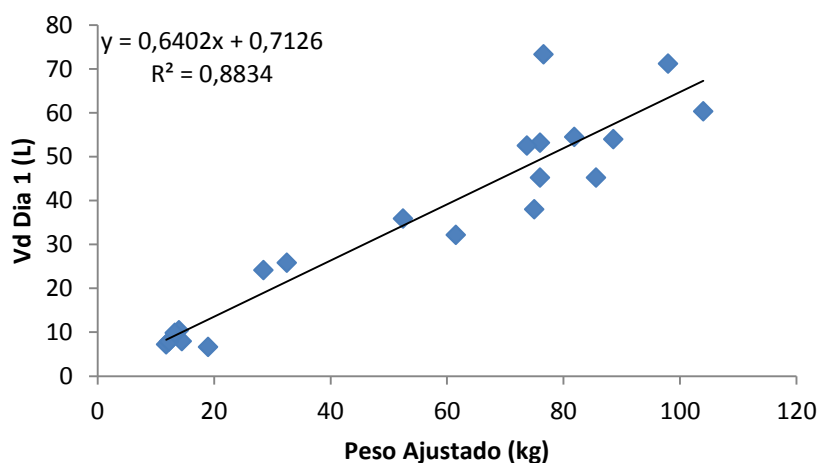


Fig. 8: Correlação entre Vd e peso ajustado

Com base nos valores padronizados de CL/Peso (L/h*kg) e Vd/Peso (L/kg), testaram-se outros factores que possam também ter impacto na variabilidade destes parâmetros, nomeadamente a idade, o dia de tratamento e o tipo de tratamento. Para tal, trabalhou-se com os dados transformados logaritmicamente, uma vez que tipicamente os parâmetros PK apresentam distribuições Log-Normais.

- **Idade**

Avaliando a relação entre a CL e a idade, observou-se uma diminuição da mesma com o aumento da idade, porém de forma não estatisticamente significativa ($p = 0,082$) (Fig. 9).

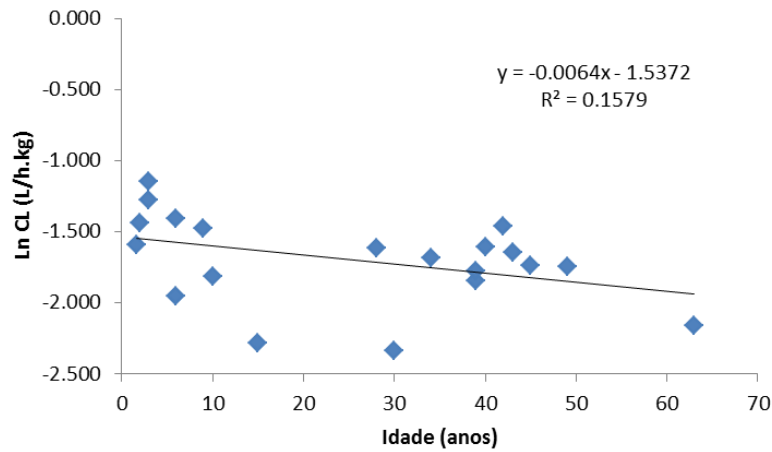


Fig.9: Correlação entre LnCL e a Idade

A avaliação por ANOVA, considerando como factor a idade menor/maior que 10 anos, mostrou no entanto um efeito estatisticamente significativo ($p = 0,024$) (Fig. 10). Desta forma, a idade menor que 10 anos foi também um factor que influenciou a CL.

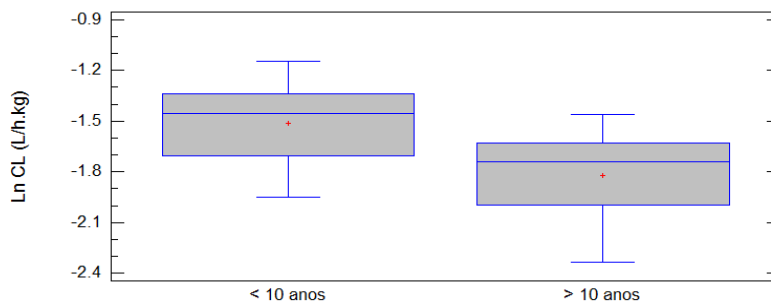


Fig. 10: Valores de LnCL de acordo com a idade

A idade, por outro lado, não influenciou significativamente o Vd, como se pode ver na Fig. 11.

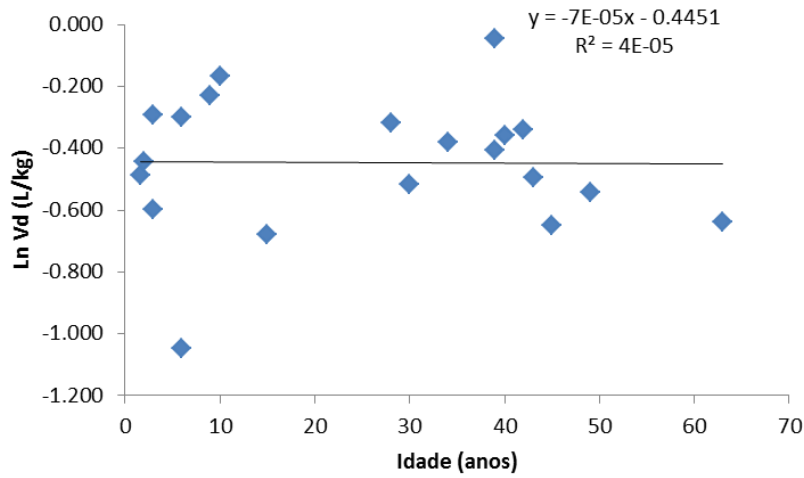


Fig. 11: Correlação entre LnVd e a Idade

▪ **Dia de tratamento**

Observou-se que a CL parece diminuir com o dia de tratamento, porém de forma não estatisticamente significativa ($p = 0,529$) (Fig. 12).

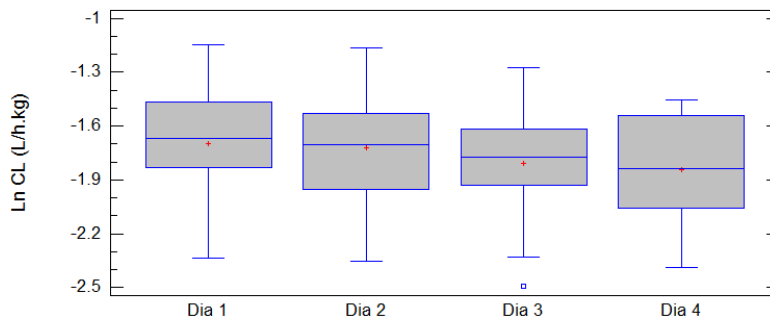


Fig. 12: Valores de LnCL e o dia do tratamento

Relativamente ao Vd, o mesmo não mostrou variar com o dia de tratamento ($p = 0,745$) (Fig. 13).

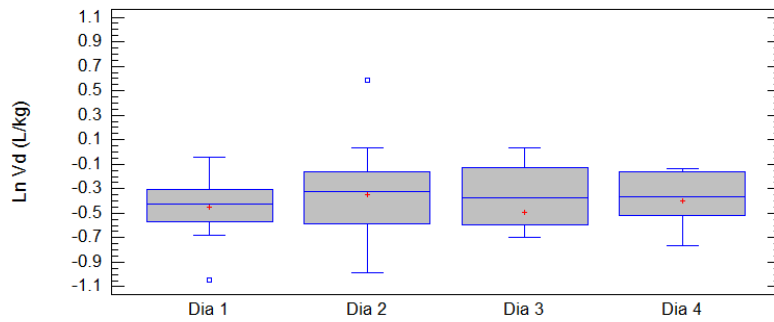


Fig. 13: Valores de LnVd e o dia do tratamento

▪ **Tratamento administrado**

Os doentes foram sujeitos a 3 tipos de tratamento, nomeadamente, BuCy (Bussulfano seguido de Ciclofosfamida), BuMel (Bussulfano seguido de Melfalan) e BuFlu (Fludarabina seguida de Bussulfano). Nos primeiros dois tratamentos, como quer a Ciclofosfamida quer o Melfalano foram administrados após o término da administração do Bussulfano, os mesmos puderam ser agrupados.

Como se pode ver nas Fig. 14 e 15, o tratamento não parece influenciar a CL ($p = 0,709$) e o Vd ($p = 0,127$) do bussulfano no primeiro dia.

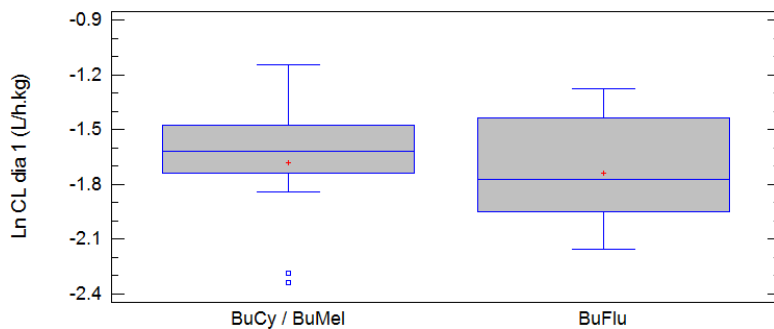


Fig. 14: Valores de LnCL de acordo com o tipo de tratamento

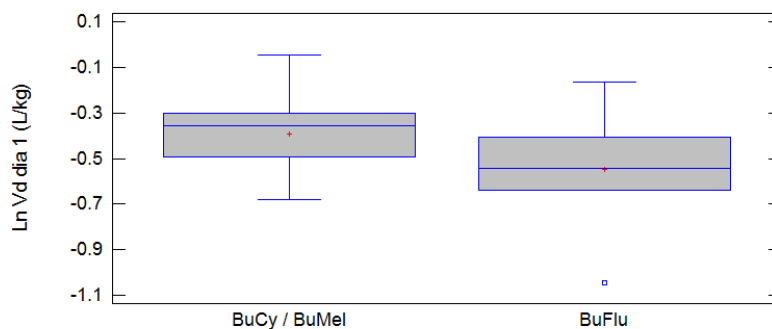


Fig. 15: Valores de LnVd de acordo com o tipo de tratamento

Análise de factores combinados

Apesar da análise individual dos factores “tratamento” e “dia de tratamento” terem concluído a inexistência de relação estatisticamente significativa com os parâmetros CL e Vd, realizou-se também uma análise por GLM (General Linear Models), que permite individualizar o peso de cada efeito individual, retirando-lhe a influência dos restantes. Assim, construiu-se um modelo tendo como fontes de variabilidade o tratamento, o dia de tratamento e os doentes agrupados (“nested”) com o tratamento. Mais uma vez, os valores dos parâmetros PK foram transformados logaritmicamente, de forma a normalizar a sua distribuição.

Relativamente à CL, foram obtidos os seguintes resultados:

Tab.12: Análise de variância da CL

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	5.71517	23	0.248485	17.41	0.0000
Residual	0.627987	44	0.0142724		
Total (Corr.)	6.34315	67			

Tab. 13: Soma dos quadrados Tipo III

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Doente(trat)	5.39623	19	0.284012	19.90	0.0000
trat	0.0572228	1	0.0572228	4.01	0.0514
Dia	0.157138	3	0.0523792	3.67	0.0191
Residual	0.627987	44	0.0142724		
Total (corrected)	6.34315	67			

Como pode ser observado na Tab. 12, o modelo mostrou significância estatística, indicando uma relação entre a CL e as variáveis estudadas. Na Tab. 13 observa-se que essa relação é estatisticamente significativa entre os diferentes doentes (agrupados por tratamento) e a CL, bem como entre os diferentes dias de tratamento e a CL. O tratamento em si, não parece ter relação com a CL do Bussulfano.

Relativamente ao Vd, foram obtidos os seguintes resultados:

Tab. 14: Análise de variância do Vd

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Model	4.73946	23	0.206064	1.49	0.1267
Residual	6.09165	44	0.138447		
Total (Corr.)	10.8311	67			

Tab. 15: Soma dos quadrados Tipo III

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Doente(trat)	4.33405	19	0.228108	1.65	0.0863
trat	0.180452	1	0.180452	1.30	0.2598
Dia	0.275724	3	0.091908	0.66	0.5787
Residual	6.09165	44	0.138447		
Total (corrected)	10.8311	67			

Neste caso, o Vd não mostrou estar relacionado com nenhum dos factores estudados.

Neste estudo, a variabilidade residual foi cerca de 12% na CL e 20% no Vd. Esta variabilidade inclui vários factores como a variabilidade intra-individual e a variabilidade inerente à metodologia analítica e procedimento de colheita de amostra biológicas.

Verificou-se também que a CL diminuiu cerca de 2% entre o 1º e 2º dia, 10% entre o 1º e 3º dia e 14% entre o 1º e 4º dia.

5.6. AVALIAÇÃO DA MONITORIZAÇÃO FARMACOTERAPÊUTICA

A eficácia da monitorização farmacoterapêutica (TDM) em termos farmacocinéticos pode ser observada na seguinte Fig. 16 e Tab. 16., onde é representada a diferença entre a AUC alvo do tratamento em cada doente e a AUC estimada ao fim de cada dia extrapolando o regime desse dia até ao final do tratamento.

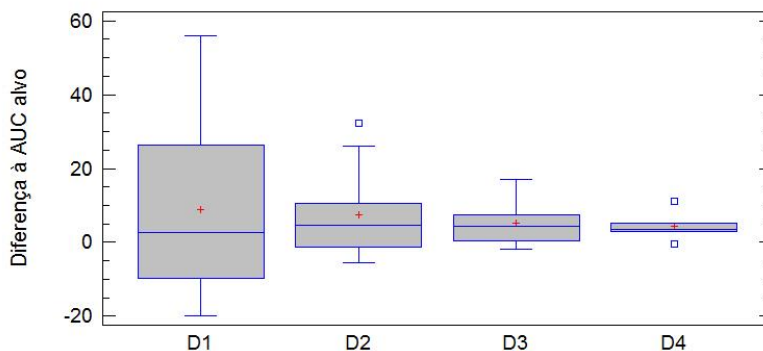


Fig. 16: Valores da Diferença da AUC alvo e a AUC estimada ao longo dos dias

Tab. 16: Estatística- Resumo

	<i>Count</i>	<i>Average</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	<i>Range</i>
Dia1	14	8.83571	-19.9	55.8	75.7
Dia 2	13	7.50769	-5.4	32.3	37.7
Dia 3	10	5.13	-1.7	17.0	18.7
Dia 4	6	4.3	-0.4	11.2	11.6

Verificou-se uma melhoria clara na precisão da obtenção da AUC alvo ao longo do tratamento, com uma variação de 75,7 mg*h/L no 1º dia para 11,6 mg*h/L no 4º dia.

Adicionalmente, os resultados mostram que a obtenção de perfil PK se justifica pelo menos até ao 2º dia.

Na população estudada foi possível verificar uma grande variabilidade relativamente à exposição ao bussulfano, traduzida por uma AUC cumulativa estimada a partir do 1º dia entre 50,4 e 130,8 mg*h/L. Considerando uma janela terapêutica compreendida entre o valor alvo da AUC \pm 10%, apenas 42% dos doentes estudados teriam uma exposição óptima ao bussulfano. A TDM permitiu aumentar o número de doentes para 69% no 2º dia, 80% no 3º dia e 83% no 4º dia.

6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A individualização da dose de bussulfano, com base no valor da CL do fármaco em cada indivíduo, é considerada uma prática importante devido à estreita janela terapêutica do bussulfano e a exposição tem sido associada, em vários estudos, a importantes resultados clínicos nos doentes submetidos a TCPH. Assim, a individualização da dose de bussulfano, por via da TDM deve ser considerada para minimizar a incidência de DVO, diminuir a taxa de rejeição e recaída e morte relacionada com o transplante (Palmer *et al.*, 2016).

É consensual que a TDM seja utilizada em regimes de condicionamento com alta dose de bussulfano (> 9mg/kg), nos regimes em que há evidência de associações farmacodinâmicas e nos regimes que foram desenhados pressupondo a utilização desta ferramenta terapêutica (Palmer *et al.*, 2016).

É sobretudo a população pediátrica que tem sido mais estudada, por ser a população onde se tem verificado maior variabilidade nos parâmetros PK e a menos estudada aquando da aprovação do fármaco.

Na 3ª fase do estudo aqui apresentado, implementação da monitorização farmacoterapêutica de bussulfano na prática clínica, a população tratada é bastante heterogénea relativamente à idade, peso, diagnóstico, características do transplante e regime de condicionamento.

À semelhança do descrito na literatura, o modelo seleccionado para estimativa dos parâmetros PK foi o modelo monocompartimental. O coeficiente de determinação (r^2) obtido foi próximo de 1, variando entre 0,899 e 1, o que significa que houve grande aproximação entre os dados dos doentes e os do modelo.

No estudo realizado, a CL padronizada ao peso foi em média de 0,19 L/h*kg e o Vd médio foi de 0,65 L*kg. Estes valores estão de acordo com o que se encontra descrito na bibliografia consultada, na qual a CL varia entre 0,14 -0,18 L/h*kg e, em particular em crianças de idade <6 meses até aos 17 anos está descrita uma variação contínua da depuração oscilando entre 0,15- 0,24 L/h*kg. O mesmo se verifica para o Vd, em que o intervalo descrito na literatura é de 0,62 e 0,85 L*kg (EMA, 2008).

O coeficiente de variação observado foi elevado ($\approx 60\%$), explicado em parte pela grande heterogeneidade da população estudada. Assim, foi necessário proceder à análise do impacto de covariáveis como o peso ideal ajustado, a idade, o dia do tratamento e o tipo de tratamento nesta variabilidade. Foram seleccionadas estas covariáveis por serem aqueles que frequentemente estão descritas na bibliografia.

Desta análise, concluiu-se que o peso contribuiu aproximadamente em 30% para a variabilidade observada na CL e 40% no Vd. A variabilidade inter-individual na CL, após ajuste ao peso, está de acordo com o descrito por Nguyen *et al.* (2006), podendo variar entre 16 e 34%.

Também a idade influenciou a CL, sendo significativamente maior no grupo “idade <10 anos” do que no grupo “idade > 10 anos”. A CL média no grupo “idade <10 anos” foi de 0,22 L/h*kg e de 0,16 L/h*kg no grupo “idade > 10 anos”. O impacto da idade na CL do bussulfano está amplamente descrito na literatura e foi brevemente resumido na revisão efectuada no capítulo 2. Pensa-se que o aumento da CL nas crianças pode ser devido a diferenças na taxa de maturação da GST, diferenças no volume do fígado, fluxo sanguíneo e funções biliares comparativamente com os adultos (Imke H. Bartelink *et al.*, 2012). A idade, por outro lado, não influencia significativamente o Vd.

O dia do tratamento demonstrou influenciar significativamente a CL, o que vai ao encontro com o referido num estudo publicado por Bartelink *et al.* (2012), no qual se observou uma diminuição de 12% na CL do bussulfano do primeiro dia para os restantes. Verificou-se também que a CL diminuiu cerca de 2% entre o 1º e 2º dia, 10% entre o 1º e 3º dia e 14% entre o 1º e 4º dia. A pequena diferença encontrada entre a CL do 1º e 2º dia não reflecte a diferença descrita na literatura, podendo variar entre 12% e 20 %. (Bartelink *et al.*, 2012; Gaziev *et al.*, 2010) No entanto, noutros estudos, com a administração em toma única a diminuição da CL entre a 1ª dose e a 3ª dose foi em média apenas de 4,6% (Yeh *et al.*, 2012).

Neste estudo, verificou-se uma relação significativa entre os diferentes doentes agrupados com o tratamento e a CL e não se verificaram alterações na CL em função do tipo de tratamento. Daqui pode-se depreender que a diferença na CL se deve às características inerentes ao doente e à doença e não propriamente ao tratamento. Embora, alguns estudos tenham verificado uma diminuição em média de 10% da CL entre a 1ª e a 3ª dose nos regimes com bussulfano em concomitância com a fludarabina, esta associação não tem sido descrita por todos (Bartelink *et al.*, 2012; Yeh *et al.*, 2012).

Neste estudo, a variabilidade residual da CL foi cerca de 12%. Esta variabilidade inclui vários factores como a variabilidade intra-individual e a variabilidade inerente à metodologia analítica e procedimento de colheita de amostra biológicas. Normalmente, é descrita uma variabilidade intra-individual nos estudos consultados, entre os 10 e 30% (Bartelink *et al.*, 2012; Nguyen *et al.*, 2006; Yeh *et al.*, 2012).

Idealmente, o valor alvo da exposição ao bussulfano deveria ser definido para cada regime, no entanto, a literatura publicada é muito heterogênea e com pequenas séries de casos (Palmer *et al.*, 2016).

A exposição ótima ao bussulfano, foi nos primeiros estudos definida por uma AUC cumulativa para 4 dias entre 66 e 105 mg*h/L em doentes adultos com LMC. Bartelink *et al.* (2009) demonstrou que uma margem terapêutica mais estreita de 74-82 mg*h/L para o condicionamento com BuCy ou BuMel em várias indicações estaria relacionada com maior sobrevivência livre de eventos e sobrevivência global e menor incidência de rejeição e recaída em crianças. Vários autores mostraram que uma AUC alvo entre 80-95 mg*h/L para o bussulfano quando associado com a fludarabina, apresentava um perfil de toxicidade favorável comparativamente com o regime BuCy ou BuMel e igualmente eficaz em doentes com indicações semelhantes para transplante alogénico (Andersson *et al.*, 2008; Bartelink *et al.*, 2014; Geddes *et al.*, 2008; Ten Brink *et al.*, 2014).

Por fim e, muito recentemente, foi demonstrado por Bartelink *et al.* (2016) num grande estudo retrospectivo que envolveu 15 centros e 674 doentes, que uma exposição cumulativa de bussulfano entre 78 e 101 mg*h/L em associação com um citotóxico não alquilante, como a fludarabina, é preditivo da mais alta sobrevivência livre de eventos em crianças e adultos independentemente da indicação e da fonte de células estaminais (Bartelink *et al.*, 2016).

Optou-se por definir em 75 mg*h/L \pm 5% o valor alvo da AUC quando no regime de condicionamento é administrado outro alquilante para além do bussulfano (como ciclofosfamida, melfalano e tiotepa) e 90 mg*h/L \pm 5% para o valor alvo da AUC quando o bussulfano é administrado com a fludarabina. Estes valores são centrais dentro das janelas terapêuticas descritas, o que permite ter alguma margem para possíveis acertos de dose.

Foi possível observar uma melhoria clara na precisão da obtenção da AUC alvo ao longo do tratamento. Na população estudada foi possível verificar uma grande variabilidade relativamente à exposição ao bussulfano, traduzida por uma AUC cumulativa estimada a partir do 1º dia entre 50,4 e 130,8 mg*h/L.

Considerando uma janela terapêutica compreendida entre o valor alvo da AUC \pm 10%, apenas 42% dos doentes estudados teriam uma exposição ótima ao bussulfano sem TDM. A TDM permitiu aumentar esse valor para 69% no 2º dia, 80% no 3º dia e 83% no 4º dia.

Neste estudo foi definido que o limite máximo para ajustes de dose era de 25%, para que os ajustes fossem feitos gradualmente, tentando contornar possíveis erros em todo o processo. Assim, esta premissa contribuiu para que apenas no 4º dia se verificasse uma variação de 11,6 mg*h/L em torno do valor alvo da AUC.

Adicionalmente, os resultados mostram que a obtenção de perfil PK se justifica pelo menos até ao 2º dia, uma vez que se verifica uma menor dispersão em torno do alvo do 3º para o 4º dia, comparativamente com a dispersão observada nos dias anteriores.

Na grande parte dos centros consultados, faz-se apenas TDM de bussulfano no 1º dia de tratamento, repetindo-se apenas o procedimento ao 2º (ou 3º) dia quando os ajustes são $\geq 25\%$. No entanto, foram relatados casos de sobredosagem de bussulfano quando a dose era definida apenas com base nas concentrações séricas obtidas no 1º dia. Uma vez que o $t_{1/2}$ descrito para o bussulfano é em média 2,5 h e o estado estacionário é obtido para a maioria dos fármacos após 5 semi-vidas plasmática, a AUC com base nos valores do 1º dia pode ser sub-estimada e consequentemente a dose poderá ser sobre-estimada (Johnson-Davis, *et al.* 2010). Uma vez que o bussulfano é lipofílico, esta é uma preocupação sobretudo nos doentes obesos, uma vez que o grande Vd pode afectar o tempo necessário para atingir o estado estacionário. Neste sentido, e por estar descrita uma diminuição da CL entre o 1º dia e os restantes, foi também definido que para efeitos de cálculo de nova dose se reduziria 10% à dose recomendada.

Embora a análise dos resultados clínicos pós transplante e sob TDM não seja contemplada no âmbito deste estudo, pode apenas referir-se que em nenhum dos doentes tratados se desenvolveu DVO, uma das principais toxicidades que se sabem ser dependentes da dose de bussulfano.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

A implementação da TDM na prática clínica implica quer uma exigente articulação entre os diversos intervenientes, provenientes de diferentes áreas profissionais, quer um grande rigor no trabalho desenvolvido. Apenas com circuitos e procedimentos bem delineados, para além da estreita colaboração entre as várias equipas, foi possível implementar um procedimento desta natureza onde o tempo de actuação é um factor fundamental.

Com base nos resultados farmacocinéticos obtidos neste estudo, concluiu-se que:

- A CL média, o Vd médio e $t_{1/2}$ médio encontrados estão de acordo com o descrito na literatura;
- O peso ideal ajustado é a covariável que mais contribui para a variabilidade inter-individual na CL e no Vd;
- A diferença entre a CL no grupo “idade <10 anos” e o grupo “> 10 anos” é estatisticamente significativa;
- Os doentes agrupados por tratamento bem como os diferentes dias de tratamento relacionam-se de forma significativa com a CL;
- O tipo de tratamento (BuCy ou BuMel e BuFlu) não parece ter relação com a CL do Bussulfano;
- O Vd não mostra estar relacionado com nenhum dos factores (idade, dia de tratamento e tipo de tratamento);
- A variabilidade residual, onde se inclui a variabilidade intra-individual foi cerca de 12% para a CL e 20% para o Vd;
- A CL diminuiu apenas 2% entre o 1º e 2º dia, contrariamente ao descrito, mas mantém-se estável nos restantes dias;
- Existe uma melhoria clara na precisão da obtenção da AUC alvo entre o 1º e o 4º dia;
- A obtenção do perfil PK justifica-se pelo menos até ao 2º dia;
- Considerando uma janela terapêutica compreendida entre o valor alvo da AUC $\pm 10\%$, apenas 42% dos doentes estudados teriam uma exposição óptima ao bussulfano no 1º dia sem TDM. Este valor melhora significativamente com a realização da TDM.

De acordo com a revisão efectuada, a implementação de um regime em toma única diária é desejável comparativamente com o regime de tomas múltiplas, uma vez que o perfil PK do bussulfano é semelhante nos dois regimes, não está associado a maior

toxicidade e é mais conveniente para doentes e profissionais de saúde, para além de facilitar o procedimento inerente à TDM.

Assim e, considerando os resultados obtidos, a exequibilidade do procedimento implementado e a disponibilidade de metodologia analítica adequada conclui-se que estão reunidas as condições para a implementação do regime posológico de toma única diária.

Pretende-se a prazo e, com uma amostra significativa, avaliar a correlação entre a exposição ao bussulfano e os resultados clínicos: toxicidades, *engraftment*, rejeição, recaída e mortalidade relacionada com o transplante.

Pretende-se também criar um modelo farmacocinético populacional, que permitirá caracterizar os parâmetros PK da população tratada no IPOLFG. Adicionalmente, permitirá reduzir o número de colheitas biológicas realizadas e eventualmente o número de dias em que se faz TDM, tal como é descrito em vários estudos (Yeh *et al.*, 2012; Palmer *et al.*, 2016).

Pretende-se também rever a necessidade de realizar TDM nos regimes RIC e não mieloablativos, onde o risco de toxicidade é menor.

A integração da monitorização farmacoterapêutica na actividade diária da farmácia hospitalar tem sido extensamente defendida, dado o consenso em torno dos benefícios obtidos. Dentro destes e, tal como foi anteriormente descrito neste trabalho, destaca-se a antecipação e a consequente minimização das toxicidades e efeitos subterapêuticos, assim como a optimização da eficácia e da eficiência da intervenção terapêutica.

O bussulfano faz parte da maioria dos regimes de condicionamento pré-TCPH e, em Portugal, a monitorização farmacoterapêutica deste fármaco não é uma prática instituída, contrastando com a realidade de outros países (Holanda, França, Inglaterra, EUA). Este procedimento é pioneiro a nível nacional, identificando-se como principais limitações à generalização desta metodologia a complexidade técnica associada, bem como a necessidade do cumprimento de um protocolo rigoroso.

Este estudo permitiu também reforçar a necessidade de uma abordagem multidisciplinar a estes doentes e, espera-se, melhorar a prazo os resultados clínicos obtidos, reproduzindo no IPOLFG os benefícios da TDM de bussulfano descritos noutros centros.

Este estudo permitiu ainda criar conhecimento, estabelecer parcerias e potenciar sinergias que poderão facilitar a generalização desta actividade a outros fármacos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almog, S., Kurnik, D., Shimoni, A., Loebstein, R., Hassoun, E., Gopher, A., ... Nagler, A. (2011). Linearity and stability of intravenous busulfan pharmacokinetics and the role of glutathione in busulfan elimination. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 17(1), 117–123.
- Andersson, B. S., de Lima, M., Thall, P. F., Wang, X., Couriel, D., Korbling, M., ... Champlin, R. E. (2008). Once daily i.v. busulfan and fludarabine (i.v. Bu-Flu) compares favorably with i.v. busulfan and cyclophosphamide (i.v. BuCy2) as pretransplant conditioning therapy in AML/MDS. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 14(6), 672–684.
- Athanasiadou, I., Angelis, Y. S., Lyris, E., Archontaki, H., Georgakopoulos, C., & Valsami, G. (2014). Gas chromatographic–mass spectrometric quantitation of busulfan in human plasma for therapeutic drug monitoring: A new on-line derivatization procedure for the conversion of busulfan to 1,4-diiodobutane. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 90, 207–214.
- Bartelink, I. H., Boelens, J. J., Bredius, R. G. M., Egberts, A. C. G., Wang, C., Bierings, M. B., ... Knibbe, C. A. J. (2012). Body weight-dependent pharmacokinetics of busulfan in paediatric haematopoietic stem cell transplantation patients. *Clinical Pharmacokinetics*, 51(5), 331–345.
- Bartelink, I. H., Bredius, R. G. M., Belitser, S. V, Suttorp, M. M., Bierings, M., Knibbe, C. A. J., ... Boelens, J. J. (2009). Association between busulfan exposure and outcome in children receiving intravenous busulfan before hematologic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 15(2), 231–41.
- Bartelink, I. H., Lalmohamed, A., van Reij, E. M. L., Dvorak, C. C., Savic, R. M., Zwaveling, J., ... Boelens, J. J. (2016). Association of busulfan exposure with survival and toxicity after haemopoietic cell transplantation in children and young adults: a multicentre, retrospective cohort analysis. *The Lancet Haematology*, 3(11), e526–e536.
- Bartelink, I. H., Van Kesteren, C., Boelens, J. J., Egberts, T. C. G., Bierings, M. B., Cuvelier, G. D. E., ... Knibbe, C. A. J. (2012). Predictive performance of a busulfan pharmacokinetic model in children and young adults. *Therapeutic Drug Monitoring*, 34(5), 574–583.

- Bartelink, I. H., Van Reij, E. M. L., Gerhardt, C. E., Van Maarseveen, E. M., De Wildt, A., Versluys, B., ... Boelens, J. J. (2014). Fludarabine and exposure-targeted busulfan compares favorably with busulfan/cyclophosphamide-based regimens in pediatric hematopoietic cell transplantation: Maintaining efficacy with less toxicity. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, *20*, 345–353.
- Bonate, P. (2006). *Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling and simulation. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling and Simulation*. Boston: Kluwer Academic Publishers.
- Burns, R. B., Heggie, J. R., & Embree, L. (1995). A gas-chromatographic assay method for busulfan with sensitivity for test dose therapeutic monitoring. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *13*(9), 1073–1078.
- Ciurea, S. O., & Andersson, B. S. (2009). Busulfan in hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, *15*(5), 523–36.
- Coppell, J. A., Richardson, P. G., Soiffer, R., Martin, P. L., Kernan, N. A., Chen, A., ... Niederwieser, D. (2010). Hepatic veno-occlusive disease following stem cell transplantation: incidence, clinical course, and outcome. *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, *16*(2), 157–68.
- Courtney, J. B., Harney, R., Li, Y., Lundell, G., McMillin, G. A., Agarwal, G., ... Salamone, S. J. (2009). Determination of busulfan in human plasma using an ELISA Format. *Therapeutic Drug Monitoring*, *31*(4), 489–494.
- DeLeve, L. D., & Wang, X. (2000). Role of oxidative stress and glutathione in busulfan toxicity in cultured murine hepatocytes. *Pharmacology*, *60*(3), 143–154.
- EMA. (2005). Busilvex: EPAR - Scientific discussion p. 1-33. (Available at http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Scientific_Discussion/human/000472/WC500052062.pdf; accessed at October 15, 2016).
- EMA. (2008). Busilvex: RCM - Product Information p. 1-33 (Available at http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_Product_Information/human/000472/WC500052066.pdf; accessed at October 15, 2016).
- French, D., Sujishi, K. K., Long-Boyle, J. R., & Ritchie, J. C. (2014). Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay to quantify

- plasma busulfan. *Therapeutic Drug Monitoring*, 36(2), 169–74.
- Gaziev, J., Nguyen, L., Puozzo, C., Mozzi, A. F., Casella, M., Donnorso, M. P., ... Lucarelli, G. (2010). Novel pharmacokinetic behavior of intravenous busulfan in children with thalassemia undergoing hematopoietic stem cell transplantation: A prospective evaluation of pharmacokinetic and pharmacodynamic profile with therapeutic drug monitoring. *Blood*, 115(22), 4597–4604.
- Geddes, M., Kangaroo, S. B., Naveed, F., Quinlan, D., Chaudhry, M. A., Stewart, D., ... Russell, J. A. (2008). High busulfan exposure is associated with worse outcomes in a daily i.v. busulfan and fludarabine allogeneic transplant regimen. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 14(2), 220–228.
- Gibbs, J. P., Gooley, T., Corneau, B., Murray, G., Stewart, P., Appelbaum, F. R., & Slattery, J. T. (1999). The impact of obesity and disease on busulfan oral clearance in adults. *Blood*, 93(12), 4436–4440.
- Glantzbeck, B., Duncan, C., Alyea, E., Campbell, B., & Soiffer, R. (2012). Important drug interactions in hematopoietic stem cell transplantation: What Every Physician Should Know. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*.
- Gratwohl, A., & Carreras, E. (2012). Principles of conditioning. *EBMT Handbook*.
- Johnson-Davis, K. L., McMillin, G. A., Juenke, J. M., Ford, C. D., & Petersen, F. B. (2010). Which dose of busulfan is best? *Clinical Chemistry*, 56(7), 1061–1064.
- Krivoy, et al. (2008). Busulfan use in hematopoietic stem cell transplantation: Pharmacology, Dose Adjustment, Safety and Efficacy in Adults and Children. *Current Drug Safety*, 3(1), 60–66.
- LARRY, A. B. (2008). *APPLIED CLINICAL PHARMACOKINETICS*. *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53).
- Madden, T., Lima, M. De, Thapar, N., Nguyen, J., Roberson, S., Couriel, D., ... Andersson, B. S. (2007). Pharmacokinetics of once-daily IV busulfan as part of pretransplantation preparative regimens: A comparison with an every 6-Hour Dosing Schedule, 64, 56–64.

- Mccune, J. S., Bemer, M. J., Barrett, J. S., Baker, K. S., Gamis, A. S., & Holford, N. H. G. (2014). Busulfan in infants to adult hematopoietic cell transplant recipients: A population pharmacokinetic model for initial and Bayesian dose personalization. *Clin Cancer Res. February, 1(203)*, 754–763.
- Nguyen, L., Fuller, D., Lennon, S., Leger, F., & Puozzo, C. (2004). I.V. busulfan in pediatrics: a novel dosing to improve safety/efficacy for hematopoietic progenitor cell transplantation recipients. *Bone Marrow Transplantation, 33(10)*, 979–987.
- Nguyen, L., Leger, F., Lennon, S., & Puozzo, C. (2006). Intravenous busulfan in adults prior to haematopoietic stem cell transplantation: a population pharmacokinetic study. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 57(2)*, 191–198.
- Palmer, J., McCune, J. S., Perales, M.-A., Marks, D., Bubalo, J., Mohty, M., ... Carpenter, P. A. (2016). Personalizing busulfan-based conditioning: considerations from the American Society for Blood and Marrow Transplantation Practice Guidelines Committee. *Biology of Blood and Marrow Transplantation, 22(11)*, 1915–1925.
- Perumbeti. (2016). Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Practice Essentials, Overview, Indications for HSCT. Retrieved from <http://emedicine.medscape.com/article/208954-overview>
- Rambaldi, A., Grassi, A., Masciulli, A., Boschini, C., Micò, M. C., Busca, A., ... Bosi, A. (2015). Busulfan plus cyclophosphamide versus busulfan plus fludarabine as a preparative regimen for allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation in patients with acute myeloid leukaemia: an open-label, multicentre, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncology, 16(16)*, 1525–1536.
- Rezvani, A. R., McCune, J. S., Storer, B. E., Batchelder, A., Kida, A., Deeg, H. J., & McDonald, G. B. (2013). Cyclophosphamide followed by Intravenous Targeted Busulfan for Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Pharmacokinetics and Clinical Outcomes. *Biology of Blood and Marrow Transplantation, 19(7)*, 1033–1039.
- Richardson, P. G., Ho, V. T., Giralt, S., Arai, S., Mineishi, S., Cutler, C., ... Soiffer, R. (2012). Safety and efficacy of defibrotide for the treatment of severe hepatic veno-occlusive disease, 253–265.
- Russell, J. A., & Kangaroo, S. B. (2008). Therapeutic drug monitoring of busulfan in transplantation. *Current Pharmaceutical Design, 14(20)*, 1936–1949.

- Ryu, S. G., Lee, J. H., Choi, S. J., Lee, J. H., Lee, Y. S., Seol, M., ... Lee, K. H. (2007). Randomized comparison of four-times-daily versus once-daily intravenous busulfan in conditioning therapy for hematopoietic cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 13(9), 1095–1105.
- Savic, R. M., Cowan, M. J., Dvorak, C. C., Pai, S.-Y., Pereira, L., Bartelink, I. H., ... Long-Boyle, J. (2013). Effect of weight and maturation on busulfan clearance in infants and small children undergoing hematopoietic cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 19(11), 1608–1614.
- ten Brink, M. H., Wessels, J. A., den Hartigh, J., van der Straaten, T., von dem Borne, P. A., Guchelaar, H.-J., & Zwaveling, J. (2012). Effect of genetic polymorphisms in genes encoding GST isoenzymes on BU pharmacokinetics in adult patients undergoing hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplantation*, 47(2), 190–5.
- Ten Brink, M. H., Zwaveling, J., Swen, J. J., Bredius, R. G. M., Lankester, A. C., & Guchelaar, H. J. (2014). Personalized busulfan and treosulfan conditioning for pediatric stem cell transplantation: the role of pharmacogenetics and pharmacokinetics. *Drug Discovery Today*, 19(10), 1572–1586.
- Tran, H., Petropoulos, D., Worth, L., Mullen, C. A., Madden, T., Andersson, B., ... Chan, K. W. (2004). Pharmacokinetics and individualized dose adjustment of intravenous busulfan in children with advanced hematologic malignancies undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 10(11), 805–812.
- Xu, Q. A., & Al., E. (2009). Quantitative determination of busulfan in human plasma by UPLC. *Chromatographia*, 70(9–10), 1505–1510.
- Yeh, R. F., Pawlikowski, M. A., Blough, D. K., McDonald, G. B., O'Donnell, P. V., Rezvani, A., ... McCune, J. S. (2012). Accurate targeting of daily intravenous busulfan with 8-Hour blood sampling in hospitalized adult hematopoietic cell transplant recipients. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 18(2), 265–272.

ANEXO I

Resultados - Validação cruzada

Comparação de resultados da quantificação do bussulfano utilizando os dois equipamentos (UPLC-TQD e Alliance 2795/QuattroMicro), as mesmas amostras, analisadas no mesmo dia, com os resultados obtidos em UMC Utrecht.

Amostra	Descrição	Conc. Pad.	Equip. UPLC-TQD		Equip. QuattroMicro	
			Conc. (ng/mL)	%Dev	Conc.	%Dev
CAL(50ngmL)	Calibrador SQTF	50	49	-1,6	50	-0,1
CAL(200ngmL)	Calibrador SQTF	200	205	2,3	192	-3,8
CAL(500ngmL)	Calibrador SQTF	500	556	11,3	559	11,9
CAL(1000ngmL)	Calibrador SQTF	1000	1007	0,7	995	-0,5
CAL(2000ngmL)	Calibrador SQTF	2000	1951	-2,5	1958	-2,1
CAL(5000ngmL)	Calibrador SQTF	5000	4488	-10,2	4735	-5,3
CP(50ngmL)_1	Controlo Positivo SQTF	50	49	-1,6	46	-7,3
CP(50ngmL)_2	Controlo Positivo SQTF	50	58	15,2	58	15
CP(500ngmL)_1	Controlo Positivo SQTF	500	462	-7,7	458	-8,4
CP(500ngmL)_2	Controlo Positivo SQTF	500	511	2,3	475	-5
CP(5000ngmL)_1	Controlo Positivo SQTF	5000	4780	-4,4	4881	-2,4
CP(5000ngmL)_2	Controlo Positivo SQTF	5000	4638	-7,2	4510	-9,8

Amostra	Descrição	Média TQD	Média QM	Resul.Utrecht	Desvio	
					TQD vs. Utr	QM vs. Utr
U1	Paciente Wardt T=0	4307	4149	4413	-2%	-6%
U2	Paciente Wardt T=1	3518	3336	3502	0%	-5%
U3	Paciente Wardt T=2	2737	2575	2707	1%	-5%
U4	Paciente Wardt T=3	2059	2035	2183	-6%	-7%
U5	Paciente Knibberler T=0	3474	3256	3430	1%	-5%
U6	Paciente Knibberler T=1	2644	2488	2556	3%	-3%
U7	Paciente Knibberler T=2	2072	1915	1998	4%	-4%
U8	Paciente Knibberler T=3	1584	1498	1559	2%	-4%

ANEXO II

FORMULÁRIO 1: REGISTO DA COLHEITA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Nome: _____	Nº Obs.: _____
Código do doente: _____ (Iniciais do nome)	

DIA 1 - DATA: __/__/__

Confirmação dos sistemas de administração e taxa de perfusão do Bussulfano _____ (ENF^{a/e})

1ª DOSE DE BU INÍCIO DA PERFUSÃO: ____ H ____ MIN FINAL DA PERFUSÃO: ____ H ____ MIN

AMOSTRAS	HORÁRIO COLHEITAS		HORA COLHEITA REAL (EXACTA)	ENF ^{a/e} (NOME /N. MEC.)
AMOSTRA 1	5 min após final da perfusão			
AMOSTRA 2	1 h após final da perfusão			
AMOSTRA 3	2 h após final da perfusão			
AMOSTRA 4	3 h após final da perfusão			
AMOSTRA 5	4 h após final da perfusão			

2ª DOSE DE BU INÍCIO DA PERFUSÃO: ____ H ____ MIN FINAL DA PERFUSÃO: ____ H ____ MIN

DIA 2 (DATA: __/__/__)

Confirmação dos sistemas de administração e taxa de perfusão do Bussulfano _____ (ENF^{a/e})

5ª DOSE DE BU INÍCIO DA PERFUSÃO: ____ H ____ MIN FINAL DA PERFUSÃO: ____ H ____ MIN

AMOSTRAS	HORÁRIO COLHEITAS		HORA COLHEITA REAL (EXACTA)	ENF ^{a/e} (NOME /N. MEC.)
AMOSTRA 6	5 min após final da perfusão			
AMOSTRA 7	1 h após final da perfusão			
AMOSTRA 8	2 h após final da perfusão			
AMOSTRA 9	3 h após final da perfusão			
AMOSTRA 10	4 h após final da perfusão			

6ª DOSE DE BU INÍCIO DA PERFUSÃO: ____ H ____ MIN FINAL DA PERFUSÃO: ____ H ____ M

DIA 3 (DATA: __/__/__)

Confirmação dos sistemas de administração e taxa de perfusão do Bussulfano _____ (ENF^{a/e})

9ª DOSE DE BU INÍCIO DA PERFUSÃO: ____ H ____ MIN FINAL DA PERFUSÃO: ____ H ____ MIN

AMOSTRAS	HORÁRIO COLHEITAS		HORA COLHEITA REAL (EXACTA)	ENF ^{a/e} (NOME /N. MEC.)
AMOSTRA 11	5 min após final da perfusão			
AMOSTRA 12	1 h após final da perfusão			
AMOSTRA 13	2 h após final da perfusão			
AMOSTRA 14	3 h após final da perfusão			
AMOSTRA 15	4 h após final da perfusão			

10ª DOSE DE BU INÍCIO DA PERFUSÃO: ____ H ____ MIN FINAL DA PERFUSÃO: ____ H ____ MIN

DIA 4 (DATA: __/__/__)

Confirmação dos sistemas de administração e taxa de perfusão do Bussulfano _____ (ENF^{a/e})

13ª DOSE DE BU INÍCIO DA PERFUSÃO: ____ H ____ MIN FINAL DA PERFUSÃO: ____ H ____ MIN

AMOSTRAS	HORÁRIO COLHEITAS		HORA COLHEITA REAL (EXACTA)	ENF ^{a/e} (NOME /N. MEC.)
AMOSTRA 16	5 min após final da perfusão			
AMOSTRA 17	1 h após final da perfusão			
AMOSTRA 18	2 h após final da perfusão			
AMOSTRA 19	3 h após final da perfusão			
AMOSTRA 20	4 h após final da perfusão			

14ª DOSE DE BU INÍCIO DA PERFUSÃO: ____ H ____ MIN FINAL DA PERFUSÃO: ____ H ____ MIN

FORMULÁRIO 2: PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS (LAB. IMUNOHEMOTERAPIA)

Nome: _____	Nº Obs.: _____
Código do doente: _____ (Iniciais do nome)	

Identificação das Amostras	1	Recepção das Amostras		Centrifugação (Refrigerada, 4000 rpm, 5min)		Armazenamento (- 80 °C)		Entrega ao Transportador	
		2	3	4	5	6	7	8	9
Dia 1 (Data: ___/___/___)	1								
	2								
	3								
	4								
	5								
Dia 2 (Data: ___/___/___)	6								
	7								
	8								
	9								
	10								
Dia 3 (Data: ___/___/___)	11								
	12								
	13								
	14								
	15								
Dia 4 (Data: ___/___/___)	16								
	17								
	18								
	19								
	20								

ANEXO III

FORMULÁRIO 3: RECOLHA DE DADOS CLÍNICOS – ADMISSÃO

DATA: __/__/__

NOME: _____

Nº OBSERVAÇÃO: _____ CÓDIGO DO DOENTE (INICIAIS DO NOME): _____

DADOS DEMOGRÁFICOS

Sexo: _____ (M/F) Peso: _____ (Kg) Peso ideal Aj: _____ (Kg)

Idade: _____ (anos) Altura: _____ (cm) SC Aj: _____ (m2)

Performance status: _____

DADOS ANALÍTICOS PRÉ-TRANSPLANTE

Cr: _____ (mg/dL) Clcr: _____ (ml/min) Bilrub. total: _____ (mg/dL)

Ferritina: _____ (ng/mL) AST: _____ (U/L) Fosfatase alcalina: _____ (U/L)

ALT: _____ (U/L) Disparidade CMV: _____ (+/-)

DIAGNÓSTICO

Diagnóstico/ estadio: _____

Estado de Remissão: _____

Baixo Risco: _____ Alto Risco: _____

Baixo risco :LMA em RC ≤2 ou LMC; Alto risco: LMA em RC >2 ou sem RC, SMD

Co-patologias: _____

QUIMIOTERAPIA PRÉVIA

Esquemas de Quimioterapia	Data

Se aplicável:

Dose cumulativa de etoposido: _____ (mg/m²)

Dose cumulativa de carboplatina: _____ (mg/m²)

REGIME DE CONDICIONAMENTO

Regime	Dose	Data

TRANSPLANTE (ASSINALE COM UM X)

Data Infusão: ___/___/___

Autólogo _____

Alogénico _____

Dador Relacionado _____

Dador Não Relacionado _____

Haplo idêntico _____

Origem das CPHT

Medula óssea _____

Sangue periférico _____

Cordão umbilical _____

Celularidade do produto: _____

CD34 _____

CD3 _____

DOENÇA HEPÁTICA VENO-OCCLUSIVA (DVO)

Risco de DVO: _____ (S/N)

(Risco de DVO: Doença hepática pré-existente, 2 ou mais TCPH mieloablativos, leucemia após recaída, osteopetrose, condicionamento com BuMel, síndromes activação macrofágica, adrenoleucodistrofia)

Profilaxia: _____ (S/N)

Fármacos utilizados:

Fármaco	Dose	Duração

DOENÇA AGUDA DO ENXERTO VS HOSPEDEIRO (AGVHD)

Profilaxia: _____ (S/N)

Fármacos utilizados:

Fármaco	Dose	Duração

ADMINISTRAÇÃO CONCOMITANTE DE FÁRMACOS QUE POSSAM INTERFERIR COM O METABOLISMO DO BU (ASSINALE COM UM X)

Paracetamol _____

Voriconazol _____

Anticoagulantes _____

Aspirina _____

Posaconazol _____

Metronidazol _____

AINE's _____

Clopidogrel _____

Antiepiléticos _____

Outros _____

OUTRAS INFORMAÇÕES RELEVANTES

Data/Assinatura/nº mec: _____

FORMULÁRIO 4: AVALIAÇÃO TOXICIDADES - ALTA E D+100

DATA: __/__/__

NOME: _____

Nº OBSERVAÇÃO: _____ CÓDIGO DO DOENTE (INICIAIS DO NOME): _____

ALTA							D+100 (± 10 dias)						
DATA	TOXICIDADE (critérios CTCAE 4.0)	GRAU I	GRAU II	GRAU III	GRAU IV	GRAU V	DATA	TOXICIDADE (critérios CTCAE 4.0)	GRAU I	GRAU II	GRAU III	GRAU IV	GRAU V

Data/Assinatura/nº mec: _____

Data/Assinatura/nº mec: _____

FORMULÁRIO 5: AVALIAÇÃO RESULTADOS CLÍNICOS D+30 E D+100

DATA: ___/___/___

NOME: _____

Nº OBSERVAÇÃO: _____ CÓDIGO DO DOENTE (INICIAIS DO NOME): _____

PARÂMETROS	D+30 (± 10 dias)	D+100 (± 10 dias)
<i>Engraftment</i> (Neutrófilos > 0.5 x10 ⁹ e plaquetas > 20.000)		
Quimerismo Mielóide		
Quimerismo Linfóide		
Recaída		
Progressão da Doença		
Rejeição Primária		
Rejeição Secundária		
Morte (mencionar a causa)		

Data/Assinatura/nº mec: _____

Data/Assinatura/nº mec: _____

FORMULÁRIO 6: FOLLOW-UP DOENÇA VENO-OCLUSIVA – D+100

DATA: ___/___/___

NOME: _____

Nº OBSERVAÇÃO: _____

CÓDIGO DO DOENTE (INICIAIS DO NOME): _____

DIAGNÓSTICO (CRITÉRIOS DE SEATTLE)

ASSINALE COM UMA X

Hiperbilirrubinemia (bilirrubina sérica > 2.0 mg/dL ou > 34 µmol/L)	
Hepatomegália ou dor no quadrante superior direito	
Aumento de peso em relação ao baseline (>2%)	

Dados Ecográficos:

GRAVIDADE (CRITÉRIOS DE SEATTLE)

ASSINALE COM UMA X

Ligeira	Remissão completa a D+100 sem tratamento	
Moderada	Remissão completa a D+100 com tratamento	
Severa	Ausência de remissão completa ou morte a D+100	

TERAPÊUTICA INSTITUÍDA

FÁRMACO	POSOLOGIA	DURAÇÃO

EFEITOS SECUNDÁRIOS POSSÍVEIS DA TERAPÊUTICA INSTITUÍDA

FÁRMACO	EFEITO SECUNDÁRIO

Data/Assinatura/nº mec: _____