



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

CRISTIANE EFFTING

**MONITORAÇÃO TERAPÊUTICA DO BUSSULFANO ORAL, APÓS USO DE
DOSE TESTE E DURANTE CONDICIONAMENTO, EM PACIENTES
SUBMETIDOS A TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS-TRONCO
HEMATOPOIÉTICAS**

**Goiânia
2012**

CRISTIANE EFFTING

**MONITORAÇÃO TERAPÊUTICA DO BUSSULFANO ORAL, APÓS USO
DE DOSE TESTE E DURANTE CONDICIONAMENTO, EM PACIENTES
SUBMETIDOS A TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS-TRONCO
HEMATOPOIÉTICAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade Federal de Goiás para obtenção do
Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha
Co-orientador: Prof. Dr. Adriano de Moraes Arantes

**Goiânia
2012**

Dedico este trabalho

A Deus, que sempre me levou nos braços nos momentos difíceis.

Ao meu amado marido, Marcos, que esteve ao meu lado, mesmo nas horas de ausência, me incentivando, lutando e compreendendo todo o meu esforço.

Aos meus queridos pais, Celso e Nira, que sempre me apoiaram e dividem comigo mais essa vitória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha, que acreditou e seguiu comigo nessa difícil jornada. Sou grata pelo incentivo, confiança, apoio, compreensão e todo o aprendizado, acadêmico e pessoal, que compartilhou comigo nesses quatro anos.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Adriano Moraes Arantes, que, junto com meu orientador, possibilitou a realização deste trabalho, sendo exemplo de comprometimento e dedicação.

Aos amigos Fernando, Iram, Marislei, Tereza, Luciana, Maysa, Ramias, Wilsione, Hugo e Jerônimo, que me auxiliaram nos experimentos desenvolvidos, compartilhando momentos tristes e alegres durante essa jornada. Vocês foram de especial importância na realização deste trabalho.

À prestativa Suzana Oellers, que foi um apoio importante, uma ajuda valiosa na revisão deste trabalho. Sua colaboração foi de muita importância.

Aos demais amigos do Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas/Biofarmacocinética (NEPET/BIOPK), que passaram parte dessa jornada comigo.

À equipe do Instituto de Ciências Farmacêuticas (ICF) pela disponibilidade, paciência e ensinamentos, que me ampliaram a mente para a realização deste trabalho.

Ao Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia (INGOH), pelo apoio com doação de plasma sempre que solicitado.

Aos membros das equipes de enfermagem do Hospital Araújo Jorge e do Honcord, Hematologia, Oncologia e Congelamento de Células-Tronco Ltda.,

que participaram deste estudo, em especial Luciana e Tânia, que estiveram sempre dispostas a colaborar nas coletas, independentemente de dias e horários. Todos foram muito importantes para a execução desta pesquisa.

Aos professores e colegas do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde e Ciências Farmacêuticas, pelo companheirismo e aprendizado que compartilhamos nesses anos.

Aos pacientes, objetivo principal do desenvolvimento deste trabalho.

A toda a minha família, pilar essencial para minhas conquistas, vitórias e felicidade na vida.

Aos meus amigos, a família que escolhi, que segue comigo sempre, compartilhando minhas dúvidas, sofrimentos, descobertas e conquistas.

SUMÁRIO

TABELAS E FIGURAS	x
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	xxi
ABSTRACT	xxiii
1 INTRODUÇÃO	25
2 REVISÃO DA LITERATURA	27
2.1 Transplante de células-tronco hematopoiéticas	27
2.2 Indicações de TCTH	28
<i>2.2.1 Mielodisplasias</i>	<i>29</i>
<i>2.2.2 Leucemias</i>	<i>30</i>
2.3 Doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH)	32
2.4 Regimes de condicionamento	33
2.5 Bussulfano	36
<i>2.5.1 Farmacocinética do bussulfano</i>	<i>37</i>
<i>2.5.2 Concentração plasmática de bussulfano oral e desfechos clínicos relacionados</i>	<i>40</i>
<i>2.5.3 Toxicidade do bussulfano</i>	<i>41</i>
<i>2.5.4 Bussulfano endovenoso</i>	<i>45</i>
<i>2.5.5 Metodologia analítica para bussulfano</i>	<i>46</i>

2.5.6 Características químicas do bussulfano	48
2.6 Monitoração terapêutica do fármaco (MTF)	52
3 OBJETIVOS	54
4 MÉTODOS	55
4.1 Tipo de estudo	55
4.2 Casuística	55
4.3 Obtenção de dados clínicos	56
4.4 Definição dos desfechos clínicos	57
4.5 Dosagem plasmática do bussulfano	58
4.6 Estimativa de parâmetros cinéticos do bussulfano	60
4.7 Análise estatística	63
5 PUBLICAÇÕES	64
Artigo 1 – Analytical methods for oral busulfan therapeutic dose monitoring – a review	65
Abstract	66
Introduction	67
Results – Analysis of articles	69
References	75
Artigo 2 – Otimização de metodologia analítica em CLAE/DAD para monitoração terapêutica do bussulfano oral em pacientes submetidos a transplante alogênico HLA-idêntico de células-tronco hematopoiéticas	79
Abstract	80

Introdução	81
Parte experimental	83
Resultados e discussão	92
Conclusões	98
Referências	99
Artigo 3 – Individualizing oral busulfan dose after using a test dose in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation: pharmacokinetic characterization	102
Abstract	103
Introduction	105
Materials and methods	108
Results and discussion	112
Conclusions	120
References	120
6 CONCLUSÕES	124
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	126
REFERÊNCIAS	131
Anexos	138
Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética	139
Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	140
Anexo 3 – Confirmação da submissão do Artigo 2 no periódico Química Nova	144

Anexo 4 – Normas para publicação de artigos em Chromatographia (Artigo 1)	145
Anexo 5 – Normas para publicação de artigos em Química Nova (Artigo 2)	156
Anexo 6 – Normas para publicação de artigos em Therapeutic Drug Monitoring (Artigo 3)	164
Anexo 7 – Desfechos clínicos dos pacientes submetidos a monitoração terapêutica de bussulfano oral em regime de condicionamento para transplante alogênico HLA-idêntico de células-tronco hematopoiéticas	170

TABELAS E FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1.	Bussulfano -1,4-bis(metanesulfoniloxy)butano.	48
Figura 2.	Molécula de 1,4-bis(dietilditiocarbamoil) butano (DDCB), resultante da derivatização de bussulfano por dietilditiocarbamato de sódio (DDTC).	49
Figura 3.	1,6-bis(metanesulfoniloxy)hexano, o padrão interno (PI). .	49
Figura 4.	Padrão interno (PI) derivatizado por dietilditiocarbamato de sódio (DDTC).	50
ARTIGO 1 – Analytical methods for oral busulfan therapeutic dose monitoring – a review		
Table 1.	Analytical methods and techniques used for identification and quantification of busulfan in biological samples.	70
ARTIGO 2 – Otimização de metodologia analítica em CLAE/DAD para monitoração terapêutica do bussulfano oral em pacientes submetidos a transplante alogênico HLA-idêntico de células-tronco hematopoiéticas		
Tabela 1.	Condições cromatográficas encontradas durante o desenvolvimento do método analítico de análise do bussulfano oral.	93
Figura 1.	(A) Cromatograma branco. (B) Cromatograma do bussulfano derivatizado [(1,4- bis(dietilditiocarbamoil) butano] (DDCB) e padrão interno derivatizado (PI) em amostra extraída com acetonitrila e acetato de etila na concentração 2150 ng mL ⁻¹ . (C) Cromatograma branco sobreposto ao cromatograma do DDCB e PI em amostra extraída com acetonitrila e acetato de etila na concentração de 2150 ng mL ⁻¹ . (D) Cromatograma	

	branco sobreposto ao cromatograma do DDCB e PI em amostra extraída com acetonitrila e acetato de etila na concentração de 200 ng mL ⁻¹	94
Tabela 2.	Valores médios de concentrações de bussulfano (BU) em amostras de plasma obtidos no limite inferior de quantificação (LIQ), controles de qualidade baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA) durante a validação do método analítico, e de precisão e exatidão intra e intercorridas.	96
Tabela 3.	Estabilidade de curta duração após processo de extração – 10 h e 6 h à temperatura ambiente, após três ciclos de congelamento e descongelamento do extraído e da solução, e estabilidade de longa duração. Valores expressos como razão de área±desvio padrão relativo e desvio padrão relativo (%)	97
ARTIGO 3 – Individualizing oral busulfan dose after using a test dose in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation: pharmacokinetic characterization		
Table 1.	Anthropometric, clinical, laboratory, and therapeutic characteristics of patients diagnosed with myeloid leukemia.	113
Table 2.	Pharmacokinetic parameters of oral busulfan in patients diagnosed with leukemia (n = 8) that underwent test dose and conditioning regimen before hematopoietic stem cell transplantation; values expressed as mean±SD.	115
Figure 1.	Values of busulfan plasma concentration versus time of serial blood sampling during test dose in eight patients receiving a test dose of busulfan; values expressed as mean±SD.	116

Figure 2.	Values of busulfan plasma concentration versus time of serial blood sampling during pre-conditioning regimen for hematopoietic stem cell transplantation in eight patients receiving multiple doses of busulfan; values expressed as mean±SD.	117
Table 3.	Comparative analysis of variables at different periods of blood sampling to measure busulfan. Values expressed indicate p value obtained using the Student's t-test.	119
ANEXO 7		
Tabela 1.	Características antropométricas, clínicas, laboratoriais e terapêuticas dos pacientes com leucemia mieloide do grupo com monitoração (GM) e do grupo controle (GC). .	171
Tabela 2.	Dados sobre idade, compatibilidade ABO e de sexo, fonte de células, recuperação medular e recuperação plaquetária dos pacientes do grupo com monitoração (GM) e do grupo controle (GC).	172
Figura 1.	Valores médios e intervalo de confiança a 95% para o número de dias para recuperação neutrofílica (leucócitos) e recuperação plaquetária (plaquetas) em 16 pacientes avaliados.	173
Tabela 3.	Desfechos clínicos.	175
Figura 2.	Regressão linear entre a média de $\overline{C}_{ss}$ (ng mL ⁻¹) e a ocorrência de estomatite.	176
Figura 3.	Regressão logística entre a média de $\overline{C}_{ss}$ (ng mL ⁻¹) em cada paciente e a ocorrência de toxicidade hepática (0 – não houve registro de toxicidade hepática; 1 – houve registro de toxicidade hepática). A linha representa a equação logística ajustada: $Y = \exp [-8,176 + (0,005) * x] / [1 + \exp [-8,176 + (0,005) * x]]$	177

Figura 4.	Regressão logística entre a média de $\overline{C_{ss}}$ (ng mL ⁻¹) em cada paciente e a ocorrência de toxicidade no TGI (0 – não houve registro de toxicidade no TGI; 1 – houve registro de toxicidade no TGI). A linha representa a equação logística ajustada: $Y = \exp [-0,917 + (0,0007) * x] / [1 + \exp [-0,917 + (0,0007) * x]]$	179
Figura 5.	Valores médios e intervalo de confiança de 95% para as recaídas ocorridas nos pacientes do grupo com monitoração (GM) da dosagem de medicamento e do grupo controle (GC).	180
Figura 6.	Curva de sobrevida dos pacientes do grupo com monitoração (GM –pontilhado) da dosagem de medicamento e do grupo controle (GC – contínuo).	181

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila, <i>Acetonitrile</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético, <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
AML	<i>Acute myeloid leukemia</i>
+	Adição, dias pós-transplante
AdmD	<i>Administered dose</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
α	Alfa
AMA	<i>Ammonium acetate</i>
AR	Anemia refratária
HLA	Antígeno dos leucócitos humanos, <i>human leukocyte antigen</i>
ASC	Área sob a curva
ASC_T	Área sob a curva total
ACCG	Associação de Combate ao Câncer em Goiás
BIREME	Biblioteca Regional de Medicina
F	Biodisponibilidade, <i>bioavailability</i>
BIOPK	Biofarmacocinética
BM	<i>Bone marrow</i>
BU	Bussulfano
BCY	Bussulfano + ciclofosfamida, <i>busulfan + cyclophosphamide</i>
Ct	Células tronco
cm	Centímetro
CML	<i>Chronic myeloid leukemia</i>
CMV	Citomegalovírus
Cl_T/F	Clearance total, <i>total clearance</i>

CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
C₁	Concentração do bussulfano no plasma no tempo 1, <i>concentration of busulfan in plasma at time 1</i>
C₂	Concentração do bussulfano no plasma no tempo 2, <i>concentration of busulfan in plasma at time 2</i>
CME	Concentração média determinada experimentalmente
C_{max}	Concentração plasmática máxima, <i>maximum plasma concentration</i>
$\overline{C}_{ss}$	Concentração plasmática no estado de equilíbrio, <i>plasma concentration at steady state</i>
CT	Concentração teórica correspondente
Cond	<i>Conditioning regimen</i>
kel	Constante de eliminação, <i>elimination rate constant</i>
CQA	Controle de qualidade alto
CQB	Controle de qualidade baixo
CQM	Controle de qualidade médio
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CB	Crise blástica
Comp HLA	Compatibilidade HLA
C_{max}	Concentração máxima
CG	Cromatografia gasosa
CL	Cromatografia líquida
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DP	Desvio padrão
DAD	Detector de arranjo de diodos
DCE	Detector de captura de elétrons
D2	Dia dois de uso de bussulfano, <i>day two of busulfan use</i>
D3	Dia três de uso de bussulfano, <i>day three of busulfan use</i>
D4	Dia quatro de uso de bussulfano, <i>day four of busulfan use</i>

DDTC	Dietilditiocarbamato de sódio
Doa	Doador
DECH	Doença do enxerto contra o hospedeiro
DVOH	Doença veno-oclusiva hepática
Don	<i>Donor</i>
Dr.	Doutor
Dra.	Doutora
Dadm	Dose administrada
DT	Dose teste
MCQ	<i>8-mercaptoquinolin</i>
EC	<i>Electron capture</i>
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
ev	Endovenoso
EM	Espectrometria de massa
EM/EM	Espectrometria de massa em tandem
MTBE	Éter metil-terciário butílico
FA	Fase acelerada
FC	Fase crônica
k'	Fator de capacidade
S	Fator do sal, <i>salt factor</i>
F	Feminino, <i>female</i>
FA	<i>Formic acid</i>
FLUBU	Fludarabina + bussulfano, <i>fludarabine + busulfan</i>
FL	<i>Fluorescence</i> , fluorescência
GC	<i>Gas chromatography</i>
GLC	<i>Gas-liquid chromatography</i>
GAA	<i>Glacial acetic acid</i>
GSH	Glutathiona
GST	Glutathiona S-transferase
GSTA1-1	Glutathiona S-transferase A1-1
GSTM1-1	Glutathiona S-transferase M1-1

GSTP-1	Glutathione S-transferase P-1
GVHD	Graft versus host disease
Gy	Gray
GM	Grupo com monitoração
GC	Grupo controle
ABO	Grupos sanguíneos A, B e O
HSCT	<i>Hematopoietic stem cell transplantation</i>
HVOD	<i>Hepatic veno-occlusive disease</i>
HEP	<i>Heptane</i>
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
HLA comp	<i>HLA compatibility</i>
H₂O	<i>HPLC grade water</i>
h	Hora, <i>hour</i>
ICF	Instituto de Ciências Farmacêuticas
INGOH	Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia
IS	<i>Internal standard</i>
Δt	Intervalo de tempo entre as doses, <i>time between doses</i>
IES	Ionização por <i>electrospray</i>
ICT	Irradiação corporal total
ISOP	<i>Isopropanol</i>
λ	Lambda, comprimento de onda, <i>wavelength</i>
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crônica
LIQ	Limite inferior de quantificação
LILACS	Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde
L	Litro, <i>liter</i>
ln	Logaritmo natural, <i>natural logarithm</i>
M	Masculino, <i>male</i>
MS	<i>Mass spectrometry</i>
MO	Medula óssea
$t_{1/2}$	Meia-vida de eliminação plasmática, <i>elimination half-life</i>

MEOH	<i>Methanol</i>
m	Metro
μ	Mi
μL	Microlitro, <i>microliter</i>
mg	Miligrama, <i>miligram</i>
mL	Mililitro, <i>mililiter</i>
min	Minuto, <i>minute</i>
MIS	Monitoração íon-seletivo
MTF	Monitoração terapêutica de fármacos
MRT	Mortalidade relacionada ao tratamento
x	Multiplicação
NAC	N-acetil-cisteína
ng	Nanograma, <i>nanogram</i>
nm	Nanômetro, <i>nanometer</i>
NK	<i>Natural killer</i>
p	Nível de significância
NEPET	Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas
Ncell	<i>Number of transplanted cells</i>
nº	Número
Ncel	Número de células enxertadas
STD	Padrão
PI	Padrão interno
PB	<i>Peripheral blood</i>
PDA	<i>Photodiode array detector</i>
π	Pi
%	Porcento, <i>per cent</i>
KDHP	<i>Potassium dihydrogen phosphate</i>
Prof.	Professor
Profa.	Professora
Rec	Receptor, <i>receptor</i>
Cond	Regime de condicionamento

rpm	Rotações por minuto, <i>rotations per minute</i>
4HCY	4-hidroxíciclofosfamida
kg	Quilograma, <i>kilogram</i>
QT	Quimioterapia
RT	Radioterapia
SP	Sangue periférico
s	Segundo
SOS	Síndrome de obstrução sinusoidal, <i>sinusoidal obstruction syndrome</i>
SMD	Síndrome mielodisplásica
SNC	Sistema nervoso central
SAB	<i>Sodium acetate buffer</i>
DTC	<i>Sodium diethylcarbamate</i>
NaI	<i>Sodium iodide</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TA	Temperatura ambiente
t₁	Tempo 1, <i>time 1</i>
t₂	Tempo 2, <i>time 2</i>
T_{max}	Tempo para atingir a concentração máxima
TD	<i>Test dose</i>
THF	<i>Tetrahydrofuran</i>
TDM	<i>Therapeutic drug monitoring</i>
AUC_T	<i>Total area under the curve</i>
TBI	<i>Total body irradiation</i>
TRT	Toxicidade relacionada ao tratamento
TCTH	Transplante de células-tronco hematopoiéticas
TMO	Transplante de medula óssea
TGI	Trato gastrointestinal
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i>
NTD	<i>2-naphthalenediol</i>

TFTP	<i>2,3,5,6-tetrafluorothiophenol</i>
UPLC	<i>Ultra performance liquid chromatography</i>
UV	<i>Ultraviolet, ultravioleta</i>
DDCB	<i>1,4-bis(dietilditiocarbamoil) butano</i>
USP	<i>Universidade de São Paulo</i>
UFG	<i>Universidade Federal de Goiás</i>
vo	<i>Via oral</i>
v	<i>Volume, volume</i>
Vd	<i>Volume de distribuição, volume of distribution</i>

RESUMO

O bussulfano é um agente alquilante utilizado em regimes de condicionamento para ablação medular em pacientes submetidos a transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH). Apresenta estreita faixa terapêutica e grande variabilidade farmacocinética entre pacientes e entre doses no mesmo paciente. Em altas concentrações plasmáticas ($> 1000 \text{ ng mL}^{-1}$), associa-se a toxicidade, como síndrome de obstrução sinusoidal, e em baixas ($< 600 \text{ ng mL}^{-1}$), a recaída da doença de base ou rejeição do enxerto. Para evitar problemas relacionados ao tratamento, tem sido proposta sua monitoração terapêutica com ajuste da dose. Entre as metodologias descritas, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é frequentemente utilizada. Este estudo objetivou otimizar e validar técnica de dosagem de bussulfano em CLAE acoplada a detector de arranjo de diodos (DAD) e aplicá-la a pacientes submetidos a TCTH em Goiás. Foram incluídos oito pacientes no grupo para monitoração terapêutica (GM) e oito no grupo controle (GC), ou seja, sem intervenção. Os pacientes do GM receberam a dose teste (DT) 14 dias antes do tratamento; após determinação do perfil farmacocinético do fármaco para cada paciente, a dose foi ajustada para o objetivo terapêutico de 900 ng mL^{-1} . As condições cromatográficas foram: CLAE/DAD, coluna ACE[®] C18 (150 mm x 4 mm); fase móvel – metanol/água/acetonitrila (65:20:15, v/v/v); fluxo de 1 mL min^{-1} ; padrão interno – 1,6-bis-(metanosulfonilo)hexano; detecção UV $\lambda = 276 \text{ nm}$; derivatização com dietilditiocarbamato de sódio; extração líquida-líquida com acetato de etila após precipitação com acetonitrila. Os resultados incluíram: linearidade, analisada pela curva de calibração, de $200\text{--}5000 \text{ ng mL}^{-1}$; precisão, em termos de repetibilidade (intracorrída), de 1,25%-11,25% e intermediária (intercorrída), de 2,17%-10,71%; exatidão de 89,61%-102,18%; recuperação de 89%. Metade dos pacientes necessitou de aumento da dose e a média da dose administrada foi de $1,02 \pm 0,19 \text{ mg kg}^{-1}$. Observou-se alta variabilidade nos parâmetros farmacocinéticos avaliados: variação de 38% da $\overline{C_{ss}}$ entre DT e condicionamento; meia-vida aumentada em 11%; Cl_T/F reduzido em 30%, sugerindo acúmulo do fármaco quando administrado em esquema de dose múltipla. Embora menor do que a relatada na literatura, essa variação pode estar associada a toxicidade ou falha do tratamento, justificando a monitoração e acentuando a validade da avaliação farmacocinética prévia usando o

esquema de DT. Comparada com o GC, essa variação não apresentou impacto sobre toxicidade, mortalidade e sobrevida. Outros trabalhos com intervenções durante a monitoração e maior número de pacientes podem apresentar impacto positivo nos desfechos do TCTH.

Palavras-chave: Bussulfano. Transplante de células-tronco hematopoiéticas. Cromatografia líquida. Farmacocinética.

ABSTRACT

Therapeutic monitoring of oral busulfan, after the use of test dose and during conditioning regimen, in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

Busulfan is an alkylating agent, used for conditioning patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). It presents narrow therapeutic range and high variability in pharmacokinetics among patients and doses in the same patient. High plasma concentrations ($> 1000 \text{ ng mL}^{-1}$) have been related to toxicity, such as sinusoidal obstruction syndrome, whereas low levels ($< 600 \text{ ng mL}^{-1}$) have been associated with primary disease relapse or graft rejection. To avoid problems related to this treatment, therapeutic drug monitoring with dose adjustment has been proposed. Among the methods described, high-performance liquid chromatography (HPLC) is often used. This study aimed at optimizing and validating a technique to dose busulfan by HPLC coupled with photodiode array detector (PDA) and applying it to patients undergoing HSCT in Goiás. We included eight patients in the group for therapeutic monitoring (MG) and eight in the control group (CG), i.e., with no intervention. Patients in the MG received the test dose (TD) 14 days before the treatment; after determining busulfan pharmacokinetic profile for each patient, the dose was adjusted to the therapeutic objective of 900 ng mL^{-1} . The conditions for chromatography run were: HPLC/PDA, column ACE[®] C18 (150 mm x 4 mm); mobile phase – methanol/water/acetonitrile (65:20:15, v/v/v); eluent flow rate of 1 mL min^{-1} ; internal standard – 1,6-bis-(methanesulfonyloxy)hexane; UV detection $\lambda = 276 \text{ nm}$; derivatization with sodium diethylcarbamate; liquid-liquid extraction with ethyl acetate after precipitation with acetonitrile. We included eight patients in the group for therapeutic monitoring (MG) and eight in the control group (CG). Results obtained: linearity, analyzed through the calibration curve, of $200\text{--}5000 \text{ ng mL}^{-1}$; precision, in terms of repeatability (intra-run), of 1.25%-11.25%, and intermediary (inter-run), of 2.17%-10.71%; accuracy of 89.61%-102.18%; recovery of 89%. Half of the patients required dose increase and the mean dose administered was $1.02 \pm 0.19 \text{ mg kg}^{-1}$. High variability was observed in assessed pharmacokinetic parameters: 38% variation in $\overline{C_{ss}}$ between TD and conditioning regimen; half-life increased by 11%; Cl_r/F decreased by 30%, suggesting accumulation of busulfan when the drug is

administered in a multiple dose regimen. Although lower than reported in the literature, this variation may be associated with toxicity or failure in treatment, justifying patient monitoring and enhancing validity of previous pharmacokinetic evaluation using TD regimen. Compared to the CG, this variation did not present impact on toxicity, mortality, and survival rates. Other studies with intervention during monitoring and a higher number of patients may present positive impact on the results of HSCT.

Key words: Busulfan. Liquid chromatography. Hematopoietic stem cell transplantation. Pharmacokinetics.

1 INTRODUÇÃO

O bussulfano é agente alquilante bifuncional utilizado na prática clínica para preparar pacientes para transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH). Essa preparação é chamada de esquema ou regime de condicionamento. Durante essa etapa, o bussulfano causa intensa mieloablação e supressão da doença de base e também cria espaço na medula óssea para transferência de células-tronco (Ct) e implantação da nova medula. Como possui fraca propriedade imunossupressora, não deve ser utilizado como único agente de condicionamento, devendo ser sempre associado a um agente alquilante, comumente a ciclosfosfamida ou um análogo nucleosídico, como a fludarabina. O agente imunossupressor tem a função de suprimir o sistema imune do receptor para que este não rejeite a medula implantada.

O esquema de condicionamento geralmente utilizado consiste na administração de 1 mg kg^{-1} de bussulfano oral a cada 6 h por 4 dias (totalizando 16 mg kg^{-1}), seguido de $60 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ de ciclofosfamida por 2 dias (totalizando 120 mg kg^{-1}).

Embora amplamente utilizado nos esquemas de condicionamento, o bussulfano oral apresenta a desvantagem de sua imprevisível e errática absorção e está associado a grande variabilidade farmacocinética.

Também se encontra descrito na literatura que concentrações terapêuticas entre 600 ng mL⁻¹ e 900 ng mL⁻¹ estão associadas a desfechos ótimos do transplante. Isso porque concentrações abaixo de 600 ng mL⁻¹ estão associadas a recaída da doença de base e rejeição do enxerto, enquanto concentrações plasmáticas acima de 900 ng mL⁻¹ estão associadas a maior toxicidade relacionada ao tratamento, como a síndrome de obstrução sinusoidal, além de toxicidade do trato gastrointestinal, do sistema nervoso central (SNC) e do trato genitourinário.

Para minimizar esses impactos, a monitoração terapêutica do bussulfano oral, com o objetivo de quantificar sua concentração plasmática, determinar seus parâmetros farmacocinéticos, como meia-vida, *clearance* e área sob a curva de concentração *versus* tempo, tem sido utilizada com a finalidade de individualizar a terapia e manter as concentrações plasmáticas dentro da faixa terapêutica.

Considerando que o bussulfano oral apresenta farmacocinética variável, que sua monitoração é mundialmente utilizada e que seu estreito índice terapêutico, combinado com a variação farmacocinética interindividual, dificulta o manejo de doses seguras, estudou-se o perfil farmacocinético deste fármaco de modo a utilizar sua monitoração terapêutica visando a individualização do tratamento, a redução da mortalidade relacionada a transplante e uma menor taxa de recaída da doença de base

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Transplante de células-tronco hematopoiéticas

O transplante de medula óssea (TMO) é um procedimento médico em que Ct são infundidas em um paciente com a finalidade de reconstituir o sistema hematopoiético. Esse procedimento foi realizado com sucesso em humanos a partir da década de 1960, após a descoberta do sistema de histocompatibilidade maior, por Dausset, em 1958 (OLIVEIRA, 2011). O desenvolvimento desse modelo terapêutico teve reconhecimento pela atribuição do prêmio Nobel de medicina ao Dr. E. Donnall Thomas, de Seattle, Estados Unidos, em 1990, um dos primeiros na utilização de transplantes de células progenitoras na espécie humana (PATON; COUTINHO; VOLTARELLI, 2000).

Nos primeiros 30 anos desse procedimento, as células eram obtidas somente da medula óssea (MO) por aspiração em centro cirúrgico. Atualmente, as células progenitoras ainda podem ser originárias da MO, mas na última década, ocorreram avanços que permitiram que as Ct possam ser obtidas de sangue periférico (SP) ou sangue do cordão umbilical (NATH; SHAW, 2007;

OLIVEIRA, 2011). Na atualidade, há tendência de substituir o termo TMO por TCTH, em função das diferentes fontes de células progenitoras.

O TCTH pode ser autogênico, quando são utilizadas células progenitoras (ou Ct) do próprio paciente, ou alogênico, quando as Ct são provenientes de outro doador. Os TCTH alogênicos podem ser divididos em: familiar, mais frequentemente entre irmãos, ou não familiar ou não relacionado, quando os doadores são encontrados em registros internacionais e bancos de cordão umbilical (OLIVEIRA, 2011).

Segundo Paton, Coutinho e Voltarelli (2000), as complicações relacionadas ao TCTH podem ser divididas em:

- a. Complicações relacionadas ao período de aplasia medular e imunossupressão, que são as infecções, os sangramentos e a anemia;
- b. Complicações extramedulares relacionadas ao condicionamento, entre as quais estão aquelas relacionadas ao bussulfano, e que se encontram descritas no tópico de toxicidade de bussulfano;
- c. Complicações relacionadas à doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH).

2.2 Indicações de TCTH

O desenvolvimento e o aperfeiçoamento de técnicas de TCTH permitiram o tratamento de doenças que anteriormente eram fatais (PATON; COUTINHO;

VOLTARELLI, 2000). Atualmente, existem duas principais razões para que os pacientes sejam submetidos à TCTH: as mielodisplasias e as leucemias (NATH; SHAW, 2007).

2.2.1 Mielodisplasias

As mielodisplasias, ou síndrome mielodisplásica (SMD), constituem um grupo heterogêneo de doenças clonais das Ct hematopoiéticas, caracterizadas por MO hiperclular, citopenias e características displásicas no sangue e na MO. Essas desordens de clones hematopoiéticos são acompanhadas por inefetiva hematopoiese, resultando em citopenias de simples ou múltiplas linhagens do SP e, em muitos pacientes, em anormalidades do clone citogenético, com risco substancial de transformação em leucemia aguda. Apresenta maior incidência em pacientes idosos, com média de idade entre 60 e 75 anos, com taxa de mais de 100.000 pessoas por ano na faixa etária acima dos 70 anos (CHAUFFAILLE; PINHEIRO, 2011; DEEG et al., 2002; SOUZA; OLIVEIRA, 2011).

A SMD já é conhecida há mais de 50 anos e foi chamada de pré-leucemia, leucemia oligoblástica e anemia refratária (AR). Apesar da definição de pré-leucemia, a maioria dos pacientes morre de complicações das citopenias no SP. A transformação em leucemia aguda ocorre em 20% a 30% dos casos e

é mais comum nos subtipos que possuem maior porcentagem de blastos (CHAUFFAILLE; PINHEIRO, 2011).

O TCTH é uma terapia potencialmente curativa sendo que melhores resultados ocorrem em pacientes jovens, com doenças em estados menos avançados e transplantados precocemente (DEEG et al., 2002; SOUZA; OLIVEIRA, 2011).

2.2.2 Leucemias

A leucemia mieloide aguda (LMA) é uma doença mieloproliferativa em que clones de progenitores mieloides se acumulam na MO, ocorrendo substituição do tecido hematopoiético normal e citopenias no SP. Apresenta incidência de 2,4 casos por 100.000 habitantes por ano, com maior frequência em adultos (80%). A maior parte dos casos não está relacionada a fatores predisponentes, mas 5% a 10% dos casos podem estar relacionados a agentes químicos, como benzeno, radiações ionizantes, quimioterápicos alquilantes e inibidores da topoisomerase II. A apresentação clínica pode variar, mas a maioria dos pacientes apresenta manifestações de falência medular, como anemia, sepse neutropênica e plaquetopenia. Em muitos pacientes, os sintomas são vagos e inespecíficos, como febre, fraqueza ou letargia. Atualmente, cerca de 30% dos pacientes permanecem vivos e livres da doença. As mortes ocorrem em recaídas resistentes à QT, falta de resposta à terapia

inicial (doença refratária) ou morte na remissão decorrente da toxicidade induzida pelo tratamento (PELLOSO; CHAUFFAILLE, 2011).

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa clonal de uma célula-tronco hematopoiética com translocação recíproca entre cromossomos 9 e 22, originária de uma única célula progenitora multipotente que sofreu mutação genética. Era considerada fatal até a década de 1980, com sobrevida média de 48 meses; contudo, após o surgimento do TCTH, tem sido considerada potencialmente curável, e atualmente o mesilato de imatinibe e seus derivados constituem alternativa ao tratamento (CHAUFFAILLE, 2011; SLATTERY et al., 1997; WETZLER; BYRD; BLOOMFIELD, 2006). Sua incidência é de 1,5/100.000 pessoas ao ano, sendo aumentada lentamente com a idade até cerca de 45 anos (WETZLER; BYRD; BLOOMFIELD, 2006).

A LMC é considerada uma doença trifásica. A fase inicial é conhecida como fase crônica (FC), em que o paciente apresenta queixas de fraqueza, cansaço, indisposição, dores abdominais, aumento do volume do baço e sensação de plenitude gástrica. A fase acelerada (FA) precede a crise blástica (CB). Nessas fases, as células não se diferenciam e há predomínio de blastos. Os sintomas são febre, dor óssea, sangramento e sudorese (CHAUFFAILLE, 2011).

2.3 Doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH)

A DECH é uma das complicações mais importantes dos transplantes alogênicos, podendo ocorrer dias após o transplante ou até mesmo muitos meses depois do procedimento (PASQUINI, 2004).

A DECH é um processo inflamatório resultante da liberação de citocinas (interleucina-2, fator de necrose tumoral alfa e interferon gama) e apoptose, mediada por linfócitos CD8 e células *natural killer* (NK) da medula transplantada. Os principais alvos dessa reação são pele, trato digestivo e fígado. A DECH aguda pode aparecer desde a segunda semana até o dia +100 do TCTH (APPELBAUM, 2006; OLIVEIRA, 2011; PASQUINI, 2004).

Alguns fatores de risco como: idosos, incompatibilidade antígeno leucocitário humano (HLA), doador não aparentado, intensidade do regime de condicionamento e doador do sexo feminino são relacionados a maior incidência e gravidade da DECH (PASQUINI, 2004).

A prevenção da DECH consiste na administração de imunossupressores logo após a realização do transplante. Metotrexato e ciclosporina A ou tacrolimus são os esquemas mais eficazes e utilizados (APPELBAUM, 2006).

Na DECH crônica ocorre presença de células T específicas a determinantes antigênicos comuns do complexo de histocompatibilidade. Há produção anormal de interleucina-4, interferon gama e, na ausência de interleucina-2, ocorre estímulo à produção de colágeno e liberação de grânulos

de mastócitos. Ocorre em 20% a 50% dos pacientes que sobrevivem mais de 6 meses após a realização do transplante alogênico. Ocorrem manifestações sistêmicas semelhantes a distúrbios autoimunes, como erupção cutânea malar, artrite, bronqueolite e colestase após o dia +100 do TCTH (APPELBAUM, 2006; OLIVEIRA, 2011).

2.4 Regimes de condicionamento

Tanto no TCTH autogênico como no alogênico, procede-se à mieloablação, que permite a criação de espaço na cavidade da MO e a supressão do sistema imune (imunossupressão) com altas doses de RT e/ou QT, nos chamados regimes (ou esquemas) de condicionamento mieloblatoivo, que possibilitam a destruição da doença de base e do sistema imune, com o objetivo de facilitar a pega do enxerto ou enxertia medular (OLIVEIRA, 2011; PATON; COUTINHO; VOLTARELLI, 2000).

Assim, o regime de condicionamento permite a enxertia de CT transplantadas, que serão responsáveis pela reconstituição da hematopoiese, a qual começa a ser identificada no SP entre 14 a 21 dias após a infusão de CT. Esse período é caracterizado por intensa aplasia medular e pancitopenia periférica (PATON; COUTINHO; VOLTARELLI, 2000).

Os primeiros casos de TCTH associados a regimes de condicionamento demonstraram que esta terapia é curativa para LMA. Entretanto, o regime de

condicionamento inicialmente utilizado, consistindo na aplicação de 50 mg kg⁻¹ de ciclofosfamida por 4 dias mais irradiação corporal total (ICT) (10 Gy), foi associado a alta mortalidade relacionada ao tratamento (MRT), com mais de 50%, além de complicações pós-transplante, como retardo de desenvolvimento intelectual, raquitismo em crianças, segundas neoplasias, cataratas e disfunções endócrinas. Esses eventos estimularam o desenvolvimento de esquemas alternativos de condicionamento para TCTH (CIUREA; ANDERSSON, 2009).

Nos primeiros transplantes, muito foi discutido com relação ao regime de condicionamento a que o paciente deveria ser submetido. A associação de ICT com ciclofosfamida era utilizada como padrão. Porém, muitos centros não tinham acesso a ICT e, dessa forma, a QT surgiu com alternativa (NATH; SHAW, 2007).

Os ensaios clínicos utilizando bussulfano e ciclofosfamida começaram em 1978, com Santos e colaboradores, que encontraram DECH aguda e pneumonia intersticial por citomegalovírus (CMV) como as principais causas de morte pós-transplante. Depois da publicação de Santos e outros (1983), iniciaram-se os estudos para utilização de bussulfano e ciclofosfamida para evitar a ICT, intimamente relacionada com elevada morbi-mortalidade (NATH; SHAW, 2007). Essa associação ainda apresenta importante toxicidade relacionada ao tratamento (TRT), como doença veno-oclusiva hepática (DVOH), termo que recentemente vem sendo substituído por síndrome de obstrução sinusoidal (SOS), porém tem sido utilizada como padrão de condicionamento

pela facilidade de administração e maior aceitação. Contudo, SOS e/ou falência hepatorenal são preocupações relacionadas com a administração de bussulfano oral em associação com ciclofosfamida, comumente consideradas como marcador de toxicidade associado a altas doses de bussulfano (CIUREA; ANDERSSON, 2009).

Atualmente, o bussulfano é um dos agentes quimioterápicos mais frequentemente utilizados para regimes de condicionamento quimioterápico com altas doses para pacientes que serão submetidos a TCTH. Entretanto, esse fármaco não pode ser utilizado como agente único, em decorrência de sua limitada toxicidade a linfócitos maduros. Sua toxicidade medular é complementada com outros agentes de maior toxicidade para linfócitos maduros, como radiação, mostardas nitrogenadas ou, usualmente, ciclofosfamida (McCUNE; GIBBS; SLATTERY, 2000). A associação de ciclofosfamida (120-200 mg kg⁻¹) com bussulfano (12–16 mg kg⁻¹ ou 120–200 mg m⁻²) está entre os esquemas de condicionamento mieloblático mais utilizados na prática clínica (OLIVEIRA, 2011).

Essa associação tem sido utilizada como alternativa à ICT (BULLOCK et al., 2006; CHOW et al., 1997). Estudos demonstraram que a utilização desses dois fármacos tem eficácia semelhante à ICT, é mais bem tolerada, além de estar relacionada a diminuição da TRT, maior sobrevida, menor possibilidade de recaídas e, possivelmente, menos DECH (BORNHÄUSER et al., 2003; SLATTERY et al., 1997; TAKAMATSU et al., 2005).

As funções do bussulfano e da ciclofosfamida são complementares, com o primeiro realizando a ablação da medula e a segunda destruindo os linfócitos maduros, suprimindo a imunidade do paciente e o habilitando a receber o transplante (SLATTERY; RISLER, 1998). Nath e Shaw (2007) relataram que o uso do bussulfano ou da ciclofosfamida isoladamente não apresenta resultados satisfatórios. O sistema hematopoiético necessita de ambos os fármacos para que ocorra a enxertia.

2.5 Bussulfano

O bussulfano (1,4-dimetanosulfoniloxibutano) é um éster derivado do ácido sulfônico, que demonstrou potente atividade antitumoral e intensa propriedade de suprimir a proliferação de células mieloides (CIUREA; ANDERSSON, 2009). Trata-se de agente alquilante bifuncional utilizado na prática clínica desde 1950, em que os grupamentos alquil se ligam e quebram a molécula de DNA. Apresenta alta mielotoxicidade e amplo espectro de atividade contra diversos tipos de neoplasias. O bussulfano é ablativo, isto é, promove a extinção das células da MO, e quando combinado com outros imunossuppressores, permite a enxertia de células alogênicas (CIUREA; ANDERSSON, 2009; NATH; SHAW, 2007).

O bussulfano foi muito utilizado como tratamento paliativo da LMC ou de leucemias granulocíticas; porém, com o advento do mesilato de imatinibe, sua

utilização clínica ficou bastante restrita. Na atualidade, ainda apresenta importante utilização para o regime de condicionamento em pacientes que serão submetidos a TCTH. É utilizado em altas doses (1 mg kg^{-1} a cada 6 h por 16 doses) em associação com a ciclofosfamida nos chamados esquemas de condicionamento antes da infusão das CT (BULLOCK et al., 2006; BLEYZAC; BAROU; AULAGNER, 2000; CHOW et al., 1997; CIUREA; ANDERSSON, 2009).

2.5.1 Farmacocinética do bussulfano

O bussulfano é altamente lipofílico, mas apresenta absorção irregular após administração por via oral (vo). A concentração plasmática máxima (C_{max}) é atingida 1,5–2 h após a administração vo, mas pode ser alcançada mais rapidamente se os comprimidos forem esmagados. Mais de 26% dos pacientes apresentam retardo na absorção ou prolongamento na eliminação do bussulfano oral. A C_{max} varia muito entre indivíduos, com valores que variam de 609 ± 225 a $1730 \pm 845 \text{ ng mL}^{-1}$ depois de uma dose de 1 mg kg^{-1} vo (McCUNE; GIBBS; SLATTERY, 2000). A meia-vida de absorção é de 0,27–0,68 h e o tempo entre a administração e o início da absorção pode variar de 0,02 h a 1 h (HASSAN, 1999). Shaw e outros (1994) demonstraram que a administração de comprimidos de bussulfano esmagados resulta em significativa diminuição do tempo de início de absorção do fármaco, sendo de 8

min em comparação com 40 min para a absorção dos comprimidos tomados inteiros.

A formulação oral apresenta grande variabilidade dos parâmetros farmacocinéticos inter e inrapacientes (NATH; SHAW, 2007). A absorção gastrointestinal é variável e imprevisível e a exposição ao fármaco, medida pela área sob a curva total (ASC_T) ou C_{max} , pode variar até 20 vezes entre pacientes e até cinco vezes entre doses para o mesmo paciente (RUSSELL; KANGARLOO, 2008).

A biodisponibilidade relativa do fármaco varia de 22% a 120% em crianças menores de 4 anos e de 47% a 103% em crianças maiores de 4 anos e adultos. O pico de concentração varia entre indivíduos, mas é maior quando a dose é baseada na área de superfície corporal em comparação com a dose por peso corporal. O clearance do bussulfano é maior em crianças jovens (menores de 3 ou 4 anos) do que em crianças mais velhas e adultos, provavelmente em consequência das mudanças no metabolismo deste fármaco dependentes da idade. O bussulfano liga-se aproximadamente 30% a 50% às proteínas plasmáticas e aproximadamente 47% às células vermelhas do sangue. Distribui-se livremente no líquido cérebro-raquidiano e, provavelmente, pode causar convulsões (McCUNE; GIBBS; SLATTERY, 2000; NATH; SHAW, 2007).

A meia-vida de eliminação plasmática ($t_{1/2}$) é de 2,5 h, variando de 2,33 h a 2,59 h em adultos e de 1,54 h a 2,83 h em crianças, mas uma grande variabilidade interpacientes é descrita na literatura (HASSAN, 1999). Em seus estudos, Grochow e outros (1989) encontraram valores de $t_{1/2}$ de bussulfano

entre 0,97 h e 7,2 h, ao passo que Hassan e outros (2000) relataram em seus experimentos variação de 1,94 h a 4,33 h para este parâmetro. A variabilidade interpacientes em adultos e crianças depois de altas doses é similar à observada após uma única dose de 2 mg vo (HASSAN, 1999).

O bussulfano é eliminado por conjugação com a glutathione (GSH) no fígado, numa reação catalisada pela enzima glutathione S-transferase (GST). As principais GST envolvidas no metabolismo do bussulfano são α , μ , e π , codificadas pelos genes glutathione S-transferase A1-1 (GSTA1-1), glutathione S-transferase M1-1 (GSTM1-1) e glutathione S-transferase P-1 (GSTP-1). Expressões diferentes de isoformas de GST em uma população podem contribuir para grande variabilidade farmacocinética em diferentes pacientes (NATH; SHAW, 2007).

A reação de conjugação produz cerca de 12 metabólitos e, embora a maioria não seja citotóxica, um deles, o íon sulfônico de GSH, é decomposto em um componente lipofílico, o tetrahidrotiofeno, que é hepatotóxico (NATH; SHAW, 2007).

2.5.2 Concentração plasmática de bussulfano oral e desfechos clínicos relacionados

A concentração plasmática no estado de equilíbrio ($\overline{C}_{ss}$) e a ASC_T do bussulfano têm sido relacionadas a incidência de toxicidade hepática, MRT, recaída da doença primária e rejeição do enxerto (TRAN et al., 2000).

Pacientes que recebem bussulfano oral apresentam grande variação nas taxas de absorção (SLATTERY et al., 1997; TABAK et al., 2001). Já foi demonstrado que ASC_T e $\overline{C}_{ss}$ variam grandemente entre pacientes após uma dose vo, bem como que esta variação pode ter grande impacto no desfecho do transplante (TAKAMATSU et al., 2005). A extrema variação em biodisponibilidade e farmacocinética do bussulfano oral levou à descoberta da relação entre farmacocinética e desfechos clínicos como enxertia e toxicidade (CIUREA; ANDERSSON, 2009).

O bussulfano apresenta faixa terapêutica estreita e tem se relacionado baixa $\overline{C}_{ss}$ com rejeição do enxerto e recorrência da doença, enquanto altos níveis estão relacionados à toxicidade fatal, especialmente SOS.

Tran e outros (2000) afirmaram que as tentativas de ajuste de dose com base em dados farmacocinéticos individuais estão relacionadas a maiores chances de sucesso em pacientes que receberam vários regimes de

condicionamento, para os que submeteram a transplantes tanto autólogos como alogênicos.

2.5.3 Toxicidade do bussulfano

A SOS representa o maior risco de toxicidade dose-limitante do bussulfano, embora a mucosite seja a mais comum. Em seu estudo, McDonald e outros (1993) utilizaram bussulfano e ciclofosfamida em 15% dos pacientes e a incidência de SOS grave neste grupo foi de 32%; porém, seu trabalho incluiu pacientes com diferentes tipos e gravidade de doenças. A SOS é uma síndrome clínica caracterizada por retenção de fluidos, dor, hepatomegalia, icterícia, ascite e/ou ganho de peso inexplicado, sendo de especial preocupação pois pode levar à falência de múltiplos órgãos e à morte. A $\overline{C_{ss}}$ maior do que 900 ng mL⁻¹ aumenta o risco de SOS, enquanto concentrações menores do que 600 ng mL⁻¹ aumentam o risco de rejeição do enxerto. Baixos valores de ASC_T também estão associados a maiores riscos de recaídas em pacientes com LMC. A individualização da dose e a monitoração terapêutica do fármaco (MTF) podem ser usados como estratégias clínicas para manter a $\overline{C_{ss}}$ do bussulfano entre 600 ng mL⁻¹ e 900 ng mL⁻¹ e melhorar o desfecho do transplante (BULLOCK et al., 2006; McCUNE; GIBBS; SLATTERY, 2000; NATH; SHAW, 2007; TABAK et al., 2001).

Os valores de incidência de SOS em pacientes que recebem regime de condicionamento com bussulfano + ciclofosfamida variam entre diferentes estudos. Assim sendo, Peris e outros (1999) registraram incidência de aproximadamente 20% a 40%, mesmos valores relatados por Mürdter e outros (2001). Já Paton, Coutinho e Voltarelli (2005) verificaram que essa incidência pode variar entre 5% e 55%, com taxa de mortalidade geral em torno de 30%, dependendo da gravidade da SOS. Esses autores ainda afirmaram que, em casos mais leves, a mortalidade situa-se em torno de 8%, enquanto nos casos mais graves, com comprometimento de múltiplos órgãos, a mortalidade pode ser de até 98%. Em estudo mais recente, Russell e Kangarloo (2008) estimaram incidência de SOS em torno de 9% em pacientes com TCTH alogênico.

Outras manifestações que podem ocorrer são: mucosite severa, irritação gastrointestinal, neurotoxicidade, cardiotoxicidade, cistite hemorrágica e pneumonia intersticial (CHOW et al., 1997; HASSAN et al., 2000).

Altos níveis de GST são correlacionados com alto clearance e baixas concentrações plasmáticas de bussulfano, indicando que a conjugação com GSH é um importante mecanismo de detoxicação metabólica do fármaco. Recentes estudos demonstraram que o polimorfismo do gene GST está associado com o risco de desenvolvimento de SOS em pacientes que receberão TCTH (TAKAMATSU et al., 2005).

A fisiopatologia da SOS envolve diferentes fatores, como citotoxicidade, fatores imunológicos, inflamatórios e eventos hemostáticos. Em presença dessa patologia, ocorre extenso dano às estruturas centrilobulares, o que pode

resultar em oclusão venosa hepática, estreitamento luminal excêntrico e/ou flebosclerose, fibrose sinusoidal e necrose hepática (NATH; SHAW, 2007).

Outra reação adversa associada ao bussulfano é a neurotoxicidade. A incidência das convulsões é de aproximadamente 10% em adultos e 7% em crianças e está associada a altas doses ($> 600 \text{ m}^{-2}$ ou 16 mg kg^{-1}). Em adultos, as convulsões ocorrem tipicamente no terceiro ou quarto dia da administração de bussulfano, provavelmente como resultado do acúmulo do fármaco. Fenobarbital, benzodiazepínicos e fenitoína podem ser usados na profilaxia das convulsões, embora a fenitoína possa aumentar o clearance do bussulfano e o inverso possa ocorrer com o uso de benzodiazepínicos. Sugere-se que fármacos que não interfiram (ou que pouco interfiram) no sistema microsomal hepático sejam utilizados na profilaxia dessas convulsões (CIUREA; ANDERSSON, 2009). Nath e Shaw (2007) relataram que clonazepam foi mais efetivo para prevenir as convulsões do que a carbamazepina e que não interferiu na farmacocinética do bussulfano, como a fenitoína.

Tanto o bussulfano como a ciclofosfamida são metabolizados por enzimas GST do citocromo P450. Um dos metabólitos da ciclofosfamida é a 4-hidroxiciclofosfamida (4HCY), que é fortemente reativa e causa danos aos hepatócitos. A detoxificação da 4HCY e outros metabólitos da ciclofosfamida, como acroleína, envolve a conjugação com GSH. O bussulfano influencia no clearance da ciclofosfamida, possivelmente por reduzir os níveis de GST e GSH, em decorrência da inibição da atividade do citocromo P450. Isso pode impedir a eliminação de metabólitos hepatotóxicos da ciclofosfamida, o que

pode contribuir para a ocorrência de danos hepáticos e aumento do risco de desenvolvimento de SOS (NATH; SHAW, 2007).

A sensibilidade do fígado aos danos causados por bussulfano ou ciclofosfamida depende da existência de alguma depleção de GSH. Essa depleção pode acarretar o acúmulo de metabólitos tóxicos de bussulfano e ciclofosfamida, levando a dano hepático e, conseqüentemente, ao desenvolvimento de SOS. A suplementação com precursores de GSH, como N-acetil-cisteína (NAC), é um método que pode ser utilizado para tratar ou prevenir SOS (NATH; SHAW, 2007).

O desenvolvimento de SOS também inclui aspectos relacionados à administração de bussulfano e ciclofosfamida. Tutschka, Copelan e Klein (1987) observaram que a redução da dose de ciclofosfamida de 200 mg kg⁻¹ para 120 mg kg⁻¹ reduziu a incidência de pneumonia intersticial e SOS em pacientes com LMA sem comprometimento do efeito antineoplásico. Hassan e outros (2000) demonstraram que o intervalo entre a última dose do bussulfano e a primeira dose de ciclofosfamida tem grande efeito na farmacocinética desta e de seus metabólitos, o que é importante para o desenvolvimento de SOS. Se a ciclofosfamida for administrada mais de 24 h após a última dose de bussulfano, o risco de ocorrência de SOS e de mucosite é significativamente diminuído em comparação com a administração menos de 12 h após a última dose de bussulfano. Isso se explica, pois esses dois alquilantes utilizam a GST como via de detoxificação hepática. Quando esses fármacos são administrados em tempo muito próximo, contribuem em conjunto para a depleção das GST

hepáticas, resultando em risco aumentado de injúria hepática séria, como SOS (CIUREA; ANDERSSON, 2009; NATH; SHAW, 2007).

Os regimes de condicionamento mais intensos, com a adição de um terceiro alquilante (tiotepa ou melfalano), também são associados a maior incidência de SOS, talvez por maior depleção de GSH (NATH; SHAW, 2007).

2.5.4 Bussulfano endovenoso

A limitação prática do uso do bussulfano oral é sua imprevisível e errática biodisponibilidade em função de sua variável absorção intestinal. Então, propôs-se o uso de bussulfano endovenoso (ev), que poderia causar menos estresse hepático, diminuir a imprevisibilidade da biodisponibilidade oral, bem como impedir o efeito de primeira passagem do fármaco vo. Comparando-se esquemas de condicionamento de bussulfano oral + ciclofosfamida e bussulfano ev + ciclofosfamida, observou-se menor incidência de SOS em pacientes com doenças hematológicas tratados com o fármaco ev (33% vo *versus* 8% ev) e menor MRT no dia +100 (CIUREA; ANDERSSON, 2009).

Entretanto, a limitação prática do uso desse esquema de condicionamento é o custo associado, uma vez que o condicionamento com bussulfano ev é cerca de 100 vezes mais caro do que o condicionamento com bussulfano vo.

Embora a introdução de bussulfano ev tenha aumentado a segurança do regime de condicionamento, a TRT ainda ocorre. Altas doses de ciclofosfamida contribuem para significativa hepatotoxicidade. A substituição por um agente imunossupressor alternativo, sem metabolismo hepático, como um análogo nucleosídico, pode aumentar a segurança do regime de condicionamento, porque somente um dos dois fármacos administrados será dependente da GST para detoxicação.

Atendendo a esses critérios, existe a fludarabina, um nucleotídeo antimetabólito análogo da purina, inibidor da síntese de DNA, com potente propriedade imunossupressora. Ela potencializa a citotoxicidade induzida pelos alquilantes e apresenta interação sinérgica com bussulfano. A associação de bussulfano e fludarabina apresenta efetiva mieloablação, otimiza a atividade antileucêmica e traz segurança ao regime de condicionamento de TCTH (CIUREA; ANDERSSON, 2009).

2.5.5 Metodologia analítica para bussulfano

Muitos métodos foram desenvolvidos para a quantificação do bussulfano no plasma. Os métodos disponíveis para avaliação do bussulfano podem envolver a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou a cromatografia gasosa (CG), com seus detectores: ultravioleta (UV), detector de arranjo de diodos (DAD), fluorescência (FL), espectrometria de massa (EM) ou

espectrometria de massa em tandem (EM/EM), detector de captura de elétrons (DCE), monitoração íon-seletiva (MIS) ou ionização por *electrospray* (IES) para CG (BLEYZAC; BAROU; AULAGNER, 2000; BURNS; HEGGIE; EMBREE, 1995; CHOW et al., 1997; FUNAKOSHI et al., 1994; HARA et al., 2000; HEGGIE et al., 1997; JENKE et al., 2004; KELLOGG et al., 2005; MÜRDTER et al., 2001; PAP; ERDÉLYI-TÓTH; KRALOVÁNSZKY, 2000; PERIS et al., 1999; QUERNIN et al., 1998; QUERNIN et al., 1999; QUERNIN et al., 2001; RAUH et al., 2006; REIS et al., 2005; RIFAI et al., 1997; RUSSELL; KANGARLOO, 2008).

Os métodos que envolvem CG apresentam alta sensibilidade e a reprodutibilidade necessária para avaliar amostras relevantes clinicamente e para estudos farmacocinéticos. Contudo, não são aplicáveis à rotina de MTF, pois consomem muito tempo no preparo das amostras e são laboriosos demais para a prática clínica de rotina. Além disso, o tempo de corrida analítica pode ser muito alto ou o volume necessário de amostra pode ser elevado, especialmente em pacientes pediátricos (BLEYZAC; BAROU; AULAGNER, 2000; CHOW et al., 1997).

A CLAE é o método mais frequentemente utilizado como rotina. Entretanto, os testes podem requerer equipamentos caros quando o UV não é utilizado, ou não apresentam sensibilidade, especificidade ou precisão suficientes, ou não fornecem o resultado com a rapidez necessária para o ajuste da dose diariamente (BLEYZAC; BAROU; AULAGNER, 2000).

2.5.6 Características químicas do bussulfano

A molécula do bussulfano é desprovida de grupos cromóforos e, por isto, não pode ser visualizada pelos detectores comumente utilizados na CLAE (UV e FL) (PERIS et al., 1999), sendo pobre sua absorção nas regiões do comprimento de onda do UV. Na literatura, verifica-se que os métodos de quantificação desse fármaco requerem a etapa de derivatização, com a adição de grupos cromóforos. A derivatização pode ser realizada com iodito de sódio e fotólise pós-coluna, ou tiocresol usando quantificação indireta na detecção no UV, ou com dietilditiocarbamato de sódio (DDTC) com detecção direta no UV. O DDTC é amplamente utilizado para derivatização de agentes alquilantes antineoplásicos (CHOW et al., 1997; PAP; ERDÉLYI-TÓTH; KRALOVÁNSZKY, 2000; QUERNIN et al., 1999). O bussulfano (Figura 1) reage em solução aquosa com DDTC, que se liga especificamente aos núcleos eletrofílicos do bussulfano, resultando em um produto identificado como 1,4-bis(dietilditiocarbamoil) butano (DDCB) (Figura 2), que é identificado no UV (PAP; ERDÉLYI-TÓTH; KRALOVÁNSZKY, 2000).

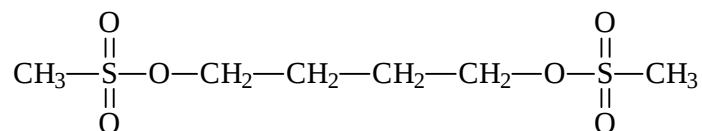


Figura 1. Bussulfano -1,4-bis(metanesulfoniloxy)butano.

A monitoração terapêutica para individualização da dose do bussulfano pode apresentar dificuldades em função do tempo necessário para obtenção, processamento e análise das amostras, bem como para compilação e análise dos resultados, em decorrência do curto intervalo entre as doses (6 h).

Para contornar essas dificuldades, tem sido proposta a dose teste (DT), que consiste em administrar previamente (7 a 14 dias antes) uma dose do medicamento para avaliar seu comportamento farmacocinético. O uso de DT para determinar os parâmetros farmacocinéticos individuais antes do condicionamento para TCTH tem sido utilizado para bussulfano. As vantagens potenciais da avaliação de uma DT incluem a minimização das complicações descritas para a monitoração após a primeira dose e a possibilidade de utilização de dose individualizada já no início da terapêutica. Além disso, torna-se possível a determinação do perfil farmacocinético do fármaco fora do ambiente hospitalar (BURNS; HEGGIE; EMBREE, 1995; TAKAMATSU et al., 2007).

Os estudos de perfil cinético e de MTF, especialmente para medicamentos/fármacos de elevado custo, estreita faixa terapêutica e biodisponibilidade variável (seja em decorrência de variáveis físico-químicas do fármaco ou da farmacotécnica do fármaco, ou seja pelas características do paciente e da doença), justificam-se plenamente, visando garantir a eficácia e aumentar a segurança, evitando ou reduzindo manifestações tóxicas (reações adversas ou intoxicações).

2.6 Monitoração terapêutica do fármaco (MTF)

A MTF é um procedimento em que a exposição de um paciente a um agente terapêutico é determinada ou deduzida pela quantificação deste agente na corrente sanguínea (RUSSELL; KANGARLOO, 2008).

Pode-se utilizar o MTF para melhorar os desfechos na QT antineoplásica se:

- a. For demonstrada relação entre a exposição ao fármaco com estreita faixa terapêutica e desfecho positivo;
- b. Os níveis de exposição alvo forem bem identificados e fornecerem desfechos ótimos;
- c. Houver significativa variabilidade interpacientes quanto à exposição ao fármaco que possa ser reduzida por MTF;
- d. As concentrações sanguíneas e a exposição ao fármaco puderem ser obtidas de maneira oportuna com precisão e repetibilidade (NATH; SHAW, 2007).

O bussulfano preenche alguns desses critérios, tais como: estreito índice terapêutico, grande variabilidade nos parâmetros farmacocinéticos interpacientes e concentrações terapêuticas bem definidas para desfechos ótimos da intervenção. Existem muitos desafios para o MTF do bussulfano e, frequentemente, não é possível obter estimativas confiáveis das concentrações deste fármaco com intervalo entre doses de 6 h quando ele é administrado vo e,

además, a variabilidade dos parâmetros farmacocinéticos é alta entre pacientes e interdoses no mesmo paciente (NATH; SHAW, 2007).

A realização do MTF objetiva garantir que a exposição ao fármaco seja suficiente para atingir os efeitos terapêuticos e reduzir sua toxicidade (RUSSELL; KANGARLOO, 2008).

3 OBJETIVOS

1. Realizar revisão sistemática de técnicas analíticas disponíveis na literatura para dosagem plasmática do bussulfano oral.

2. Desenvolver e padronizar uma técnica de dosagem de bussulfano em CLAE/DAD que seja disponível para os pacientes submetidos a TCTH em uma unidade de transplante.

3. Aplicar o método validado para quantificação do bussulfano oral em esquema de DT e no condicionamento de pacientes em uso de bussulfano oral para TCTH.

4. Calcular e estimar os parâmetros farmacocinéticos, como área sob a curva de concentração *versus* tempo e concentração plasmática no *steady state*, meia-vida de eliminação e *clearance*, após o uso de DT e durante o condicionamento com bussulfano oral.

5. Ajustar a dose do bussulfano oral, se necessário, de acordo com as características farmacocinéticas apresentadas na dose teste.

6. Estudar o perfil de variabilidade farmacocinética em pacientes em uso de bussulfano para condicionamento de TCTH por meio de técnica analítica validada em CLAE/DAD.

4 MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo

Neste estudo, analítico, longitudinal e prospectivo, foi feito controle histórico de casos (restrospectivo).

4.2 Casuística

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Araújo Jorge da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG) (Protocolo CEPACCG nº 007/09) (Anexo 1).

Foram convidados a participar do estudo oito pacientes adultos, consecutivamente, com doenças mieloproliferativas e síndromes mielodisplásicas submetidos a TCTH HLA-idêntico que receberiam regime de condicionamento contendo bussulfano oral.

Os pacientes foram incluídos no estudo mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2).

Para a análise comparativa dos desfechos clínicos, foram incluídos oito pacientes transplantados anteriormente em decorrência de doenças mieloproliferativas e síndromes mielodisplásicas. Desse grupo de pacientes, somente foram obtidos dados relevantes para a análise de desfechos clínicos, sem necessidade de amostras biológicas.

4.3 Obtenção de dados clínicos

Os dados clínicos foram obtidos pela equipe médica responsável pelo Setor de Transplante de Medula Óssea do Hospital Araújo Jorge durante os primeiros 100 dias após o transplante, sendo as seguintes informações coletadas:

- a. Em relação à doença – risco da doença de base (baixo risco: LMA em primeira ou segunda remissão, LMC; alto risco: LMA em remissão parcial ou em atividade, síndrome mielodisplásica) e data da recaída após o transplante;
- b. Em relação ao transplante – data do transplante, tipo de condicionamento, número de células infundidas (total de células nucleadas kg^{-1} ou número de células CD34^+ kg^{-1}), data da enxertia medular (leucocitária e plaquetária), diagnóstico de SOS, complicações;
- c. Em relação ao doador – sexo, idade, compatibilidade ABO e HLA em relação ao receptor;

d. Em relação ao receptor – sexo, idade, compatibilidade ABO e HLA em relação ao doador;

e. Dados pós-transplante: imunossupressão, ocorrência de DECH aguda, infecções bacterianas, fúngicas e virais e outras intercorrências.

4.4 Definição dos desfechos clínicos

a. DECH aguda e crônica: classificação de Seattle (SHULMAN et al., 1980);

b. Reativação viral por CMV: antigenemia positiva (presença de dois ou mais núcleos positivos em 200.000 leucócitos) (LJUNGMAN et al., 1993);

c. Infecção bacteriana: pneumonias, sepse, choque séptico com isolamento do agente em uma ou mais hemoculturas e/ou secreções. Pneumonia bacteriana será também diagnosticada quando sinais clínicos e radiológicos melhoraram após antibioticoterapia empírica, sem adição de antifúngicos, quando hemoculturas e lavado bronco-alveolar forem negativos (LOSSOS et al., 1995);

d. Infecção fúngica: isolamento em uma ou mais hemoculturas e/ou biópsia do órgão acometido (DENNING et al., 2002);

e. SOS: utilizado o critério de Baltimore para diagnóstico (JONES et al., 1987).

4.5 Dosagem plasmática do bussulfano

Para realizar a monitoração plasmática de bussulfano oral em pacientes com doenças mieloproliferativas agudas e síndromes mielodisplásicas, submetidos a TCTH no estado de Goiás, foi otimizado e validado um método analítico por CLAE, com o objetivo de determinar a dosagem plasmática do bussulfano oral para posterior aplicação nestes pacientes. Dados sobre o desempenho analítico (linearidade, resolução, recuperação, limite de quantificação e detecção, reprodutibilidade, sensibilidade, seletividade e estabilidade) foram estabelecidos por meio de processo de validação, obedecendo às normas estabelecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) com base na Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003, que estabelece o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos (BRASIL, 2003).

Para as análises quantitativas de bussulfano em plasma humano, foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência LC-20AT (Shimadzu, Quioto, Japão), equipado com DAD (SPD-M20A) e detector de FL (RF-10AXL), acoplado a um amostrador automático SIL-20A (Prominence auto sampler) e forno de coluna CTO-20A (Prominence column oven), controlados por módulo de comunicação CBM-20A.

As análises foram realizadas com coluna ACE[®] 5 C18 (150 mm x 4 mm), tamanho da partícula 5 µm, acoplada à pré-coluna ACE[®] 5 C18, tamanho da partícula 5 µm. A fase móvel utilizada foi metanol:água:acetonitrila (65:20:15,

v/v/v), desgaseificada com o auxílio de banho de ultrassom antes de ser colocada no sistema, sob fluxo de 1 mL min^{-1} , PI 1,6-bis-(metanosulfonilo)hexano, utilizando detector DAD e $\lambda = 276 \text{ nm}$.

As corridas analíticas foram monitoradas em registrador e integrador Shimadzu acoplados a microcomputador com software LC Solution para registro, integração, gerenciamento e tratamento dos dados analíticos.

Para MTF, os pacientes foram submetidos a DT 10 a 14 dias antes do TCTH. Após a administração do bussulfano, foram coletados 5 mL de sangue em tubos com o anticoagulante ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) nos tempos 0,5 h, 1,0 h, 1,5 h, 2,0 h, 3,0 h, 4,0 h, 5,0 h, 6,0 h, 8,0 h e 10,0 h para determinação do perfil farmacocinético do bussulfano nos pacientes e determinação da melhor dose a ser administrada para a fase de tratamento. O sangue foi centrifugado e o plasma congelado a -20°C até o momento da análise. Os outros parâmetros farmacocinéticos determinados foram: constante de eliminação (k_{el}), $t_{1/2}$, ASC_T , $\overline{C_{ss}}$ e clearance total (Cl_T/F).

Para monitoração pré-TCTH (durante o condicionamento), amostras de 5 mL de SP foram colhidos em tubos com EDTA nos dias 2, 3 e 4 – D2, D3 e D4, respectivamente, de uso de bussulfano, nos tempos 0,5 h, 2,0 h, 4,0 h e 6,0 h após a administração do fármaco no esquema de condicionamento pré-transplante (BULLOCK et al., 2006), demonstrando que quatro amostras colhidas nos tempos citados são suficientes para estimar a $\overline{C_{ss}}$ de um paciente em

regime de condicionamento. Após a coleta, foram estimados os parâmetros farmacocinéticos para análise e comparação.

As coletas para monitoração foram realizadas conforme o protocolo de administração de drogas da unidade de internação de transplante de medula óssea, de acordo com o qual, a primeira dose da manhã deve ser administrada às 6h00, em jejum, com 200 mL de água. Todos os pacientes tiveram as mesmas condições de administração e receberam dieta controlada. O peso corporal e as excretas foram avaliados diariamente e os sinais vitais foram monitorados pelo menos a cada quatro horas.

4.6 Estimativa de parâmetros cinéticos do bussulfano

O estudo farmacocinético do bussulfano administrado vo na DT e no condicionamento pré-TCTH (5^a, 9^a e 13^a doses) foi avaliado com base no modelo monocompartimental aberto.

Depois de obtidas as concentrações do bussulfano nos respectivos tempos, os valores foram plotados em uma curva de decaimento de concentração *versus* tempo em escala semilogarítmica, realizando-se os cálculos dos parâmetros farmacocinéticos, conforme mostrado a seguir (TOZER; ROWLAND, 2009).

A k_{el} foi calculada pela reta de decaimento em papel monolog de acordo com a Equação 1:

$$-kel = \frac{\ln C_1 - \ln C_2}{t_2 - t_1} \quad \text{Equação 1}$$

sendo:

C_1 = concentração do bussulfano no plasma no tempo 1 (t_1)

C_2 = concentração do bussulfano no plasma no tempo 2 (t_2)

Para o cálculo da ASC_T , de acordo com a Equação 2, primeiramente, calculou-se a área sob a curva (ASC) de 0 a 10 h (ASC_{0-10h}) pelo método trapezoidal, extrapolando-a para o infinito ($ASC_{10-\infty}$).

$$ASC_{Total} = ASC_{(0-10h)} + ASC_{(10-\infty)} \quad \text{Equação 2}$$

A $t_{1/2}$ foi calculada utilizando-se a Equação 3:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{kel} \quad \text{Equação 3}$$

Os demais parâmetros (concentração máxima – C_{max} – e o tempo para atingi-la – T_{max}) foram obtidos a partir da curva de decaimento sem nenhuma transformação.

Estimou-se o Cl_T/F pela relação da dose e ASC_T , conforme a Equação 4:

$$Cl_{T/F} = \frac{Dose * F * S}{ASC_{total}} \quad \text{Equação 4}$$

sendo:

F = biodisponibilidade (considerada = 1)

S = fator do sal (= 1)

Para a determinação da nova dose a ser administrada, o valor de Cl_T/F foi multiplicado pelo valor da ASC alvo (valor pretendido para ajuste de dose).

A $\overline{C}_{ss}$ do bussulfano foi determinada pela razão da ASC_T pelo intervalo de tempo entre as doses (Δt), conforme a Equação 5:

$$\overline{C}_{ss} = \frac{ASC_{total}}{\Delta t} \quad \text{Equação 5}$$

O volume de distribuição (Vd) foi obtido pela razão entre o Cl_T/F e a kel (Equação 6).

$$Vd = \frac{Cl_{T/F}}{Kel} \quad \text{Equação 6}$$

Após a determinação do perfil farmacocinético do bussulfano em cada paciente, a dose foi ajustada com a proposta do objetivo terapêutico de 900 ng mL^{-1} .

Posteriormente, na fase de condicionamento, os pacientes receberam 16 doses de bussulfano oral, uma dose a cada 6 h por 4 dias, ajustadas conforme o perfil farmacocinético obtido na DT.

4.7 Análise estatística

Os dados foram digitados e manipulados no software Excell para Windows para posterior análise em programa estatístico *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS, SPSS Incorporation, Chicago, IL, Estados Unidos) versão 17.0.

Todas as variáveis em estudo apresentaram distribuição normal. Portanto, foi utilizado o teste t-Student para os dados pareados a fim de verificar a existência de diferença significativa nas variáveis em relação ao período de coleta de dados. Também foi aplicada a análise de regressão linear para verificar a existência de correlação entre $\overline{C_{ss}}$, $t_{(1/2)}$ e CL_T/F .

Foram aplicadas regressão linear e regressão logística para correlação dos desfechos clínicos com as $\overline{C_{ss}}$ obtidas.

Foi considerado o nível de 95% de confiança, ou seja, consideraram-se significativas diferenças com $p < 0,05$.

5 PUBLICAÇÕES

Artigo 1 – Analytical methods for oral busulfan therapeutic dose monitoring – a review

Autores: Cristiane Effting, Adriano de Moraes Arantes, Luiz Carlos Cunha

A ser submetido para publicação no periódico Chromatographia

Artigo 2 – Otimização de metodologia analítica em CLAE/DAD para monitoração terapêutica do bussulfano oral em pacientes submetidos a transplante alogênico HLA-idêntico de células-tronco hematopoiéticas

Autores: Cristiane Effting, Fernando Gomes Ferreira Oliveira, Hugo Bazílio, Iram Moreira Mundim, Tereza Cristina de Deus Honório, Luiz Carlos Cunha, Adriano de Moraes Arantes

Submetido para publicação no periódico Química Nova

Artigo 3 – Individualizing oral busulfan dose after using a test dose in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation: pharmacokinetic characterization

Autores: Cristiane Effting, Adriano de Moraes Arantes, Luciana Vieira Queiroz Labre, Wilsione José Carneiro, Jerônimo Raimundo de Oliveira Neto, César Bariani, Luiz Carlos Cunha

A ser submetido para publicação no periódico Therapeutic Drug Monitoring

Analytical Methods for Oral Busulfan Therapeutic Dose Monitoring – A review

Cristiane Effting^{1,2} • Adriano de Moraes Arantes³ • Luiz Carlos da Cunha¹

Correspondence: Cristiane Effting, MSc, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Unidade II, NEPET-UFG, Av. Universitária nº 1166, Fundos, Praça Universitária, 74605-220, Goiânia-GO, Brasil. Tel.: + 55 62 3209-6181. (e-mail: farm_cristiane@yahoo.com.br)

¹ Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, Brazil

² Universidade Estadual de Goiás

³ Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital Araújo Jorge, Goiânia-GO, Brazil

Abstract

Busulfan has been used in conditioning regimens in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. Due to the high interindividual variability of the pharmacokinetics of this drug, as well as its narrow therapeutic range, therapeutic drug monitoring (TDM) has been proposed, with dose adjustment, to avoid hepatic veno-occlusive disease (HVOD), also known as sinusoidal obstruction syndrome (SOS), or disease relapse, caused by variations above or below the expected mean concentrations. Several articles have been published aiming to present an adequate method for busulfan monitoring. Among the techniques used, high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with ultraviolet (UV), photodiode array (PDA), fluorescence (FL), or mass spectrometry (MS and MS/MS) detectors, as well as gas chromatography (GC) coupled with electron capture (EC), electrospray ionization (ESI), and MS detectors are worth mentioning. Additionally, techniques developed for ultra performance liquid chromatography with PDA (UPLC/PDA) are also available. A variety of methods have been described that present advantages and disadvantages, and almost always they meet the required standards of linearity, sensitivity, precision, accuracy, reproducibility, and selectivity, proving to be suitable for TDM. The differences observed refer mostly to chromatographic run and cost, associated to degrees of sensitivity. The choice of the appropriate analytical methods depends on the experience of the analyst and availability of laboratory equipment.

Keywords HPLC · GC · Busulfan · Quantification · Analytical techniques

Introduction

Busulfan is a bifunctional alkylating agent, which has been used in clinical practice since the 1950s. Currently, it still presents important usage in conditioning regimens before hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). It is used in high doses (1 mg/kg every 6 h for 16 doses) associated with cyclophosphamide in the so-called conditioning regimens [1–3].

Busulfan associated with cyclophosphamide has been used as an alternative to total body irradiation (TBI) [1, 3]. Several studies demonstrate that this drug therapy is better tolerated and has been related to higher survival rates and lower relapse rates [4, 5].

Patients receiving oral busulfan present high variability in absorption and bioavailability rates. Low busulfan concentrations have been associated with graft rejection, whereas high concentrations have been related to increased risk of toxicity [6, 7].

High plasma concentration at steady state ($\overline{C_{ss}}$) and high total area under the curve (AUC_T) versus time have been connected to increased incidence of liver toxicity (especially hepatic veno-occlusive disease – HVOD, increasingly referred to as sinusoidal obstruction syndrome – SOS) and mortality related to treatment [8].

Plasma concentration monitoring of busulfan is particularly important in patients treated with high doses during HSCT conditioning regimen, due to the manifestation of non-hematologic toxicity, especially SOS, which can occur in approximately 20–40% of the patients undergoing conditioning regimen with busulfan + cyclophosphamide, reaching a mortality rate of up to 50% [9]. Among other toxic manifestations that can occur, severe mucositis, gastrointestinal irritation, neurotoxicity, cardiotoxicity, hemorrhagic cystitis, and interstitial pneumonia are worth mentioning [1, 10].

Recent dose adjustment attempts based on individual pharmacokinetic data are related to better chances of success in patients undergoing several conditioning regimen, either before autologous or allogeneic stem cell transplantation [8].

Based on the apparent correlation between busulfan pharmacokinetics and pharmacodynamics, many authors have proposed individualized drug therapy by monitoring plasma concentration after the first dose or the test dose (TD) [11, 12].

Therapeutic drug monitoring (TDM) for individualized busulfan therapy using the pharmacokinetics after the first dose presents potential complications, though. Therapy individualization may not be possible until the next dose, because of the need to collect samples after the administration of the first dose for analysis. This requires immediate sample processing and may imply some time limitations, for sample processing, chromatographic run, and data analyses [13].

Due to the operational difficulties to perform TDM and the treatment simultaneously, the usage of a TD was proposed, i.e. administering the drug 7–14 days before HSCT conditioning regimen to determine its individual pharmacokinetic parameters, so that it is possible to assess the patient's response to treatment. The usage of TD to determine the individual pharmacokinetic profile prior to the therapy has been proposed for busulfan [13].

Studies on TD and plasma concentration monitoring of busulfan require short-term analytical techniques, so that the results can be useful for drug dose adjustment.

The criteria to choose the analytical methods include some physicochemical properties, especially those that may make drug detection and quantification either easier or more difficult. Busulfan lacks chromophore groups and therefore presents very low absorbance in the wavelength of ultraviolet (UV) and visible regions. Derivatization techniques, which add a chromophore group to this compound, making it detectable under UV light, are necessary to determine busulfan concentration in biological fluids [1, 14, 15].

This is a systematic review aiming to study the chromatographic methods available in the literature and analyze the advantages and disadvantages of each technique.

This paper presents a review of the analytical methods used for busulfan determination focusing on therapeutic control and pharmacokinetic studies. We selected studies on analytical methods for busulfan determination included in Biblioteca Regional de Medicina (BIREME), Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) databases, published between 1990 and 2011, using the

following descriptors: determination, quantification, detection, validation, busulfan, high-performance liquid chromatography (HPLC), and gas chromatography (GC). Initially, 23 articles were selected; for four articles, just the abstract or title and authors were found and they were, therefore, excluded; the full texts of 19 of them were available in the databases consulted and are presented and discussed in the present paper.

Results – Analysis of articles

Table 1 shows a summary of the analytical methods and techniques used for identification and quantification of busulfan, and also presents some features of the chromatographic systems (equipment, detector, column, mobile phase) employed and analytical parameters for method validation (sampling, sample volume, precision, derivatizing agents, retention time, and quantification limit). The most common methods for identification of busulfan in plasma apply HPLC (17/19 or 90.5%) or GC (2/19 or 10.5%).

The techniques employing HPLC are coupled with UV detectors (9/17 or 53%), fluorescence (FL; 2/17 or 12%), or mass spectrometry (MS and MS/MS; 6/17 or 35%).

Both techniques employing GC used MS or electron capture (EC) detectors, which can be coupled with electrospray ionization (ESI) detectors [1, 2, 9, 11–25].

Ultra performance liquid chromatography (UPLC) has been recently described for this purpose. The method retains the same principles as HPLC while increasing the overall interlaced attributes of speed, sensitivity, and resolution, since it operates at higher pressure than that used in HPLC, with shorter columns and fine particles, which favors selectivity and resolution [26].

In addition to busulfan identification, it is necessary to quantify this compound in plasma. A variety of chromatographic methods has been used in the last few years to predict the total area under the curve (AUC_T – a parameter that indicates bioavailability) versus time and determine busulfan $\overline{C_{ss}}$. In the literature, we find descriptions of several methods, including gas-liquid chromatography/MS (GLC/MS), GC with EC detector, HPLC with UV detector or MS and, more recently, chromatography using postcolumn photolysis.

Table 1 Analytical methods and techniques used for identification and quantification of busulfan in biological samples

Method	Plasma volume (mL)	Column	Mobile phase ^a	Precision ^b (%)	Derivatizing agent ^c	Quantification limit (ng/mL)	Run time (min)	Reference
HPLC/UV	0.2	Hypersil ODS C18	ACN/THF/H ₂ O (65:5:30)	4.8-5.3	DTC	50	10	2
	0.2	Microsorb-MV C18	ACN/THF/H ₂ O (11:4:5)	9.24-14.56	DTC	150	10 ^d	1
	0.5	Capcel Pak C18	ACN/KDHP (60:40 e 65:35)	0.5-4.2	DTC	10	24	16
	0.5	Nova Pak C18	MEOH/H ₂ O (80:20)	3.8-20.4	DTC	60	20	17
	1.0	Lichrospher 100 RP-18	MEOH/H ₂ O (70:30)	2.93-5.76	NaI	50	16 ^d	22
	0.4	Hypersil 5CN	HEP/ISOP/GAA (600:76:30)	2.73-11.1	DTC	18 (μM)	15	20
	1.0	ODS C18	MEOH/H ₂ O (80:20)	0.5-9.1	TFTP	50	40	14
	0.2	Perkin-Elmer C18	MEOH/H ₂ O (70:30)	2.3-6.5	DTC	0.2 (μM)	8 ^d	18
HPLC/FL	1.0	YMC Pak C4	MEOH/SAB (8:2)	4.2-10.9	NTD	10	15 ^d	15
	1.0	Nova Pak C18	SAB/ACN (45:50)	3.2-9.5	MCQ	20	20	9
HPLC/ESI/MS	0.2	LUNA C8	AMA/GAA/ACN (85:15;50:50;85:15)	3.5-8.4	–	5	7	21
	0.2	CIL Cluzeau	MEOH/AMA (60:40)	2.0-7.6	–	5	10	11

Continues

Method	Plasma volume (mL)	Column	Mobile phase ^a	Precision ^b (%)	Derivatizing agent ^c	Quantification limit (ng/mL)	Run time (min)	Reference
HPLC/ESI/MS/MS	0.2	XDB-C18 (Zorbax Eclipse)	H ₂ O/MEOH (80:20)	1.8-7.3	–	1.096	2.5	27
	0.2	Nova Pak C18	AMA/MEOH (60:40) 0,1% FA	3.2-10.2	–	50	3.5	12
	0.05	C18	MEOH 100%	4.2-6.3	–	5	5	23
	0.1	Chromolith RP C18	AMA/MEOH (65:35)	2-4%	–	10	3.5	24
UPLC/UV	2.0	BEH-C18 (Waters Acquity)	TFA 2%/ACN (62-38%; 13-87%)	2.7-3.9	DTC	25	1.3	26
CG/MS	1.0	CPSi5CB WCOT	Helium	0.7-22.9	TFTP	20	16	19
CG/CE	1.5	Supelco 2250	Saliva ^e	2.2-13	TFTP	100	7	13

^a ACN = acetonitrile; AMA = ammonium acetate; FA = formic acid; GAA = glacial acetic acid; H₂O = HPLC grade water; HEP = heptane; ISOP = isopropanol; KDHP = potassium dihydrogen phosphate; MEOH = methanol; SAB = sodium acetate buffer; TFA = trifluoroacetic acid; THF = tetrahydrofuran

^b Values refer to inter-assay precision

^c DTC = sodium diethylcarbamate; NaI = sodium iodide; MCQ = 8-mercaptoquinolin; NTD = 2-naphthalenediol; TFTP = 2,3,5,6-tetrafluorothiophenol

^d Run time estimated by time of retention of busulfan and internal standard mentioned by the authors, since no description of analytical run time is described in the articles

^e Matrix analyzed

Although these methods present a selective quantification, they also have limitations. HPLC/UV and GC/MS, for instance, are specific and sensitive, but also time consuming and expensive, since they require several steps for sample preparation and chromatographic run time of up to 30 min.

On the other hand, HPLC/ESI showed higher sensitivity and specific determinations of busulfan, and the main advantages of this method are the elimination of derivatization and some steps of the extraction phase, as well as a run time of just 10 min, greatly optimizing the time required for sample preparation and chromatographic run [12].

Different HPLC and GC methods, presenting innumerable advantages and disadvantages, have been described for busulfan determination in plasma and other biological fluids. Due to the limited detection of busulfan in the wavelength of UV region, it is necessary to use both a derivatizing agent and an internal standard before the analysis. Regarding sensitivity, the literature shows that quantification limits obtained with HPLC analyses range from 50 ng/mL to 150 ng/mL, whereas using GC techniques, detection limits are lower, approximately 20 ng/mL [21].

Also, the type of detector coupled with the equipment can greatly increase its sensitivity, since HPLC equipments coupled with MS present quantification limit of 5 ng/mL. Some authors affirm that although GC/MS techniques present high sensitivity and specificity, they are time consuming and more difficult to carry out, which limits their usage for TDM [2, 17].

Certain methods, such as HPLC/UV, are more frequently used (53% of the techniques found in the literature), especially because of their popularity worldwide. Normally, these methods employ derivatization with sodium diethylcarbamate (DTC) and extraction with ethyl acetate [1, 2, 17, 18, 20].

Techniques employing extraction with ethyl acetate and derivatization with 1,4-diiodobutane [22], extraction with toluene and derivatization with 2,3,5,6-tetrafluorothiophenol [14], or with diethyl ether dichloromethane (7:3 v/v) and online derivatization with DTC and column switching [16] were also reported in the literature consulted.

Methods using HPLC/MS are considered to present high sensitivity and require small sample volumes, a feature that is especially important for pediatric

patients, minimizing the blood samples needed. Nevertheless, the instruments used in these methods are more expensive, both for acquisition and maintenance, compared with the methods using HPLC/UV, HPLC/photodiode array detector (PDA), or HPLC/FL.

In contrast, methods using GC/MS are reported to yield shorter run times than those employing HPLC, but require analysts with higher technical knowledge [25]. Furthermore, their use for routine analyses is limited, since they are time consuming, very expensive, and GC/MS equipments are not available in all laboratories [1, 14, 22].

Quernin and colleagues tested GC/MS [19], HPLC/UV [14], and HPLC/MS [11] methods in a series of studies. In the first study [19], they developed an analytical technique using GC/MS that was sensitive but difficult to apply to routine analyses because, besides being time consuming and expensive, the equipment is not available in many laboratory facilities.

In the second work [14], they developed another analytical technique using HPLC, but it required longer analysis time compared to the previous study (40 min for HPLC/UV and 16 min for GC/MS) and showed less sensitivity (50 ng/mL for HPLC/UV and 20 ng/mL for GC/MS), although the latter cannot be considered a problem, since this degree of sensitivity is enough for monitoring busulfan plasma concentration. Both methods present high sensitivity, but require at least 2 h for derivatization.

In the last study [11], with HPLC/MS, the authors used a smaller sample volume (200 μ L plasma) and achieved excellent sensitivity (quantification limit of 5 ng/mL) and run time (10 min); moreover, the extraction technique is simpler, reducing the time required for sample preparation. Using this technique, it was possible to determine busulfan plasma concentration in approximately 4.5 h, compared with 11–17 h required by the methods previously tested [11, 14, 19].

Another study proposed a novel technique for HPLC that presented good precision and sensitivity, with a small plasma volume (200 μ L) and reduced chromatographic run time (10 min) due to a simplification of sample preparation that involves only one derivatization step and reduced evaporation time [2].

A technique for busulfan determination by HPLC using postcolumn photolysis, based on postcolumn derivatization of this drug and UV-detection of iodide ions

generated by a postcolumn photochemical dissociation of the derivative, proved to be sensitive, but the run time was too long for daily determination of busulfan $\overline{C}_{ss}$ [22].

HPLC/ESI coupled with double MS (MS/MS) has been reported to be a powerful method for quantitative determination of drugs in biological fluids, requiring simpler sample preparation and presenting high specificity and good chromatographic resolution. Also, the high sensitivity of this method allows determination of drugs in small plasma volumes with short chromatographic run time [12].

In a comparative study for quantitative determination of busulfan in saliva and plasma, using HPLC/MS/MS, excellent correlations were found between the concentrations of this compound in both media. The technique was considered fast, precise, sensitive, accurate, and robust, with run time of 3.5 min, quantification limit of 10 ng/mL, using 100 μ L samples. Using this method, up to 15 samples can be analyzed in less than 2 h, requiring approximately 30 min for sample preparation [24].

In another study involving HPLC/MS/MS, the method showed good sensitivity and selectivity, and was considered fast for busulfan analysis in plasma. Compared with other methods found in the literature, it presents better sensitivity (1.096 ng/mL) and a shorter run time (2.5 min), almost seven times lower than the mean run times reported for HPLC/UV [27].

Another method using UPLC proved to be twice as fast, with a run time of 1.3 min. Although UPLC is a novel method, it presents some advantages in relation to more traditional techniques, such as HPLC or HPLC/MS, namely higher speed, resolution, and sensitivity. Furthermore, it also presents better reproducibility of the amount injected and stability, resulting in an expressive reduction of solvent usage and waste generation. On the other hand, the high cost and reduced useful life of chromatography columns are the disadvantages of this method [26].

The methods using HPLC/ESI/MS or HPLC/ESI/MS/MS do not require derivatization, permit simpler and faster sample preparation, present short chromatographic run time due to the characteristics of the equipment, and compared with other methods, have extremely low detection limits. However, the most critical step for TDM of busulfan is not the quantification limit but the time required for analysis. Consequently, HPLC/MS/MS and UPLC are technically the best choices to

perform the analyses for busulfan quantification. The use of HPLC is supported by low cost investment, simplicity to train technical staff, and universalization of equipments coupled with UV and PDA detectors.

In conclusion, all the aforementioned methods are suitable for TDM of busulfan. The final choice of the appropriate method should be based on associated costs, definition of chromatographic run time, availability of analytical instrumentation to carry out the analyses, and the analyst's experience [25].

References

1. Chow DSL, Bhagwatwar HP, Phadungpojna S, Anderson BS (1997) Stability-indicating high-performance liquid chromatographic assay of busulfan in aqueous and plasma samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 704:277–288
2. Bleyzac N, Barou P, Aulagner G (2000) Rapid and sensitive high performance liquid chromatographic method for busulfan assay in plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 742:427–432
3. Bullock JM, Smith PF, Booker BM, Loughner J, Capozzi D, McCarthy Jr PL, Shaw LM (2006) Development of a pharmacokinetic and Bayesian optimal sampling model for individualization of oral busulfan in hematopoietic stem cell transplantation. *Ther Drug Monit* 28:62–66
4. Slattery J, Risler LJ (1998) Therapeutic monitoring of busulfan in hematopoietic stem cell transplantation. *Ther Drug Monit* 20:543–549
5. Takamatsu Y, Ogata K, Yamauchi K, Hara S, Kamimura T, Hayashi S, Suzumiya J, Tamura K (2005) An evaluation of busulfan pharmacokinetics in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Jpn J Clin Oncol* 35:400–403
6. Slattery JT, Clift RA, Buckner CD, Radich J, Storer B, Bensinger WI, Soll E, Anasetti C, Bowden R, Bryant E, Chauncey T, Deeg HJ, Doney KC, Flowers M, Gooley T, Hansen JA, Martin PJ, MacDonald GB, Nash R, Petersdorf EW, Sanders JE, Schoch G, Stewart P, Storb R, Sullivan KM, Thomas ED, Witherspoon RP, Appelbaum FR (1997) Marrow transplantation for chronic

myeloid leukemia: the influence of plasma busulfan levels on the outcome of transplantation. *Blood* 89:3055–3060

7. Tabak A, Hoffer E, Rowe JM, Krivoy N (2001) Monitoring of busulfan area under the curve: estimation by a single measurement. *Ther Drug Monit* 23:526–528
8. Tran HT, Madden T, Petropoulos D, Worth LL, Felix EA, Sprigg-Saenz HA, Choroszy M, Danielson M, Przepiorka D, Chan KW (2000) Individualizing high-dose oral busulfan: prospective dose adjustment in a pediatric population undergoing allogeneic stem cell transplantation for advanced hematologic malignancies. *Bone Marrow Transplant* 26:463–470
9. Peris JE, Latorre JA, Castel V, Verdeguer A, Esteve S, Torres-Molina F (1999) Determination of busulfan in human plasma using high-performance liquid chromatography with pre-column derivatization and fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 730:33–40
10. Hassan M, Ljungman P, Ringdén O, Hassan Z, Öberg G, Nilsson C, Békassy A, Bielenstein M, Abdel-Rehim M, Georén S, Astner L (2000) The effect of busulphan on the pharmacokinetics of cyclophosphamide and its 4-hydroxy metabolite: time interval influence on therapeutic efficacy and therapy-related toxicity. *Bone Marrow Transplant* 25:915–924
11. Quernin MH, Duval M, Litalien C, Vilmer E, Jacqz-Aigrain E (2001) Quantification of busulfan in plasma by liquid chromatography-ion spray mass spectrometry Application to pharmacokinetic studies in children. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 763:61–69
12. Reis EO, Vianna-Jorge R, Suarez-Kurtz G, Lima ELS, Azevedo DA (2005) Development of a rapid and specific assay for detection of busulfan in human plasma by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun In Mass Spectrom* 19:1666–1674
13. Burns RB, Heggie JR, Embree L (1995) A gas-chromatographic assay method for busulfan with sensitivity for test dose therapeutic monitoring. *J Pharm Biomed Anal* 13:1073–1078
14. Quernin MH, Poonkuzhali B, Médard Y, Dennison D, Srivastava A, Krishnamoorthy R, Chandy M, Jacqz-Aigrain E (1999) High-performance liquid

chromatographic method for quantification of busulfan in plasma after derivatization by tetrafluorothiophenol. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 721:147–152

15. Hara S, Tsuchie M, Tsujioka R, Kimura M, Fujii M, Kuroda T, Ono N (2000) High-performance liquid chromatographic quantification of busulfan in human serum after fluorescence derivatization by 2-naphthalenethiol. *Anal Sci* 16:287–291
16. Funakoshi K, Yamashita K, Chao W, Yamaguchi M, Yashiki T (1994) High performance liquid chromatographic determination of busulfan in human serum with on-line derivatization, column switching and ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 660:200–204
17. Heggie JR, Wu M, Burns RB, Ng CS, Fung HC, Knight G, Barnet MJ, Spinelli JJ, Embree L (1997) Validation of a high-performance liquid chromatographic assay method for pharmacokinetic evaluation of busulfan. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 692:437–444
18. Rifai N, Sakamoto M, Lafi M, Guinan E (1997) Measurement of plasma busulfan concentration by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Ther Drug Monit* 19:169–174
19. Quernin MH, Poonkuzhali B, Montes C, Krishnamoorthy R, Dennison D, Srivastava A, Vilmer E, Chandy M, Jacqz-Aigrain E (1998) Quantification of busulfan in plasma by gas chromatography-mass spectrometry following derivatization with tetrafluorothiophenol. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 709:47–56
20. Pap E, Erdélyi-Tóth V, Kralovánszky J (2000) High performance liquid chromatographic determination of busulfan in plasma. *Chromatographia* 51:S188–S192
21. Mürdter TE, Coller J, Claviez A, Schönberger F, Hofmann U, Dreger P, Schwab M (2001) Sensitive and rapid quantification of busulfan in small plasma volumes by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Clin Chem* 47:1437–1442
22. Jenke A, Renner U, Schuler US, Wauer S, Leopold T, Schleyer E, Ehninger G (2004) Improved assay for determination of busulfan by liquid chromatography

using postcolumn photolysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 805:147–153

23. Kellogg MD, Law T, Sakamoto M, Rifai N (2005) Tandem mass spectrometry method for the quantification of serum busulfan. *Ther Drug Monit* 27:625–629
24. Rauh M, Stachel D, Kuhlen M, Gröschl M, Holter W, Rascher W (2006) Quantification of busulfan in saliva and plasma in haematopoietic stem cell transplantation in children: validation of liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *Clin Pharmacokinet* 45:305–316
25. Russell JA, Kangarloo SB (2008) Therapeutic drug monitoring of busulfan in transplantation. *Curr Pharm Des* 14:1936–1949
26. Xu QA, Kazerooni R, Thapar JK, Andersson BD, Madden TL (2009) Quantitative determination of busulfan in human plasma by UPLC. *Chromatographia* 70:1505–1510
27. Chen L, Zhou Z, Shen M, Ma A (2009) Quantitative analysis of busulfan in human plasma by LC-MS–MS. *Chromatographia* 70:1727–1732

**OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA EM CLAE/DAD PARA
MONITORAÇÃO TERAPÊUTICA DO BUSSULFANO ORAL EM PACIENTES
SUBMETIDOS A TRANSPLANTE ALOGÊNICO HLA-IDÊNTICO DE
CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS**

**Cristiane Effting, Fernando Gomes Ferreira Oliveira, Hugo Bazílio, Iram
Moreira Mundim, Tereza Cristina de Deus Honório e Luiz Carlos Cunha**

Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas, Faculdade de
Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Unidade II, NEPET-UFG, Av.
Universitária nº 1166, Fundos, Praça Universitária, 74605-220 Goiânia – GO,
Brasil

Adriano de Moraes Arantes

Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital Araújo Jorge, Rua 239,
nº 206, Setor Universitário, 74605-070 Goiânia – GO, Brasil

OPTIMIZATION OF ANALYTICAL METHOD IN HPLC/PDA FOR THERAPEUTIC MONITORING OF ORAL BUSULFAN IN PATIENTS UNDERGOING HLA-IDENTICAL ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION. Busulfan, used in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation, presents variable pharmacokinetics and at high systemic concentrations causes toxicity. We used: HPLC/PDA Shimadzu, column C18 (150 mm x 4 mm); methanol/water/acetonitrile (65:20:15, v/v/v), flow rate of 1 mL min⁻¹; 1,6-bis-(metanosulfoniloxi)hexane; UV λ = 276 nm; analysis time 17 min; derivatization with sodium diethylcarbamate; extraction with ethyl acetate; linear calibration curve over the range of 200–5000 ng mL⁻¹. Intra-run precision, inter-run precision, and accuracy ranging from 1.25% to 11.25%, 2.17% to 10.71%, and 89.61% to 102.18%, respectively, corresponding to values required for validation; recovery of 89%. Availability of method may help decrease busulfan toxicity.

Keywords: busulfan; HPLC; validation.

INTRODUÇÃO

O bussulfano, ou 1,4-dimetanosulfoniloxibutano, é um éster derivado do ácido sulfônico e agente alquilante utilizado na prática clínica desde 1950, com potente atividade antitumoral e intensa propriedade de suprimir a proliferação de células mieloides.¹

Embora o bussulfano tenha sido bastante utilizado como tratamento paliativo da leucemia mieloide crônica e de leucemias granulocíticas, com o advento do mesilato de imatinibe, suas utilizações clínicas ficaram bastante restritas. Atualmente, porém, ainda apresenta importante aplicação para o regime de condicionamento em pacientes submetidos a transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH). Para essa finalidade, é utilizado em altas doses (1 mg kg⁻¹ a cada 6 h por 16 doses), em associação com ciclofosfamida, nos chamados esquemas de condicionamento antes da infusão de células-tronco.^{1,2,3,4} As funções do bussulfano e da ciclofosfamida são complementares, com o primeiro realizando a ablação da medula e a segunda destruindo os linfócitos maduros, suprimindo o organismo receptor e habilitando-o a receber o transplante.⁵

A associação bussulfano/ciclofosfamida tem sido utilizada como alternativa à irradiação corporal total (ICT),^{2,4} pois possui eficácia semelhante à ICT, é mais bem tolerada e tem sido associada a diminuição da toxicidade relacionada ao tratamento, maior sobrevida, menor possibilidade de recaídas e,

possivelmente, menor risco de desenvolver a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH).^{6,7,8}

A monitoração das concentrações plasmáticas no estado de equilíbrio ($\overline{C}_{ss}$) e da área sob a curva (ASC) *versus* tempo do bussulfano tem sido utilizada para testar a associação com a incidência de toxicidade hepática e de mortalidade relacionada ao transplante, além da recaída da doença primária e da rejeição do enxerto.⁹

Pacientes que recebem bussulfano oral apresentam ampla variação nas taxas de absorção e de biodisponibilidade.^{6,10} Já foi demonstrado que a área sob a curva total (ASC_T) e a $\overline{C}_{ss}$ variam extensamente (até 25 vezes) entre pacientes após uma dose oral e que esta variação pode ter grande impacto no desfecho do transplante.⁸ A extrema variação na biodisponibilidade e na farmacocinética do bussulfano oral levaram à descoberta da relação entre farmacocinética e desfechos clínicos, como rejeição de enxertia e toxicidade.¹

A doença veno-oclusiva hepática (DVOH) ou síndrome de obstrução sinusoidal (SOS) é a mais séria manifestação de toxicidade dose-limitante ao tratamento com bussulfano, embora a mucosite seja a mais comum. É uma síndrome clínica caracterizada por retenção de fluidos, dor, hepatomegalia, icterícia, ascite e/ou ganho de peso inexplicáveis, podendo levar à falência de múltiplos órgãos e morte.⁵ Valores de $\overline{C}_{ss}$ maiores do que 900 ng mL⁻¹ aumentam o risco de SOS, enquanto concentrações menores do que 600 ng mL⁻¹ aumentam o risco de rejeição do enxerto. Baixos valores de ASC_T também

estão associados a maiores riscos de recaídas em pacientes com leucemia mieloide crônica. A individualização da dose e a monitoração terapêutica podem ser utilizadas como estratégias clínicas para manter a $\overline{C}_{ss}$ do bussulfano entre 600 ng mL⁻¹ e 900 ng mL⁻¹ e melhorar o desfecho dos transplantes.^{10,11,12}

Outras manifestações de reações adversas que podem ocorrer envolvem mucosite grave, irritação gastrointestinal, neurotoxicidade, cardiotoxicidade, cistite hemorrágica e pneumonia intersticial.^{2,13}

Visando desenvolver atividades de monitoração terapêutica de bussulfano oral em pacientes com doenças mieloproliferativas e síndromes mielodisplásicas submetidos a transplante alogênico mieloablativo no estado de Goiás, desenvolveu-se uma técnica analítica em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE/DAD), que foi validada para a identificação e a dosagem plasmática do bussulfano, para posterior aplicação a pacientes.

PARTE EXPERIMENTAL

O protocolo para este estudo, incluindo a utilização de amostras biológicas com a finalidade de quantificação do bussulfano oral, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Araújo Jorge da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG) (Protocolo CEPACCG nº 007/09).

Reagentes e materiais

Neste estudo, foram utilizados: acetato de etila, acetonitrila e metanol grau CLAE (Tedia Brazil, Rio de Janeiro, RJ, Brasil); dietilditiocarbamato de sódio (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha); bussulfano (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha); 1,6-bis(metanesulfoniloxy)hexano (padrão interno – PI), sintetizado e doado pela aluna de doutorado Francine Attié de Castro, sob a orientação da Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote, do Laboratório de Farmacocinética e Metabolismo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; água ultrapura, obtida diariamente utilizando-se o sistema Milli-Q (Millipore Corporation, Chicago, IL, Estados Unidos).

Os seguintes fármacos, também usados neste trabalho, foram gentilmente cedidos para a avaliação do ensaio de especificidade: aciclovir, albendazol, dipirona, fluconazol, omeprazol, sulfametoxazol + trimetropina e vancomicina (Genix, Anápolis, GO, Brasil), anfotericina B, ondansetrona (Cristália, Itapira, SP, Brasil), cefalotina, meropenem (Cellofarm, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), dimenidrinato (Nycomed, Jaguariúna, SP, Brasil), cefepime (Biochimico, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e tramadol (Hipolabor, Sabará, MG, Brasil).

Instrumentação e condições cromatográficas de análise

As análises quantitativas de bussulfano em plasma humano foram realizadas por meio de cromatógrafo líquido de alta eficiência LC-20AT (Shimadzu, Quioto, Japão), equipado com DAD (SPD-M20A) e detector de fluorescência (RF-10AXL), acoplado a um amostrador automático SIL-20A (Prominence Autosampler) e forno de colunas CTO-20A (Prominence Column Oven), controlados por módulo de comunicação CBM-20A.

As análises foram realizadas com coluna ACE[®] 5 C18 (150 mm x 4 mm), tamanho da partícula 5 µm, acoplada à pré-coluna ACE[®] 5 C18, tamanho da partícula 5 µm. A fase móvel utilizada foi metanol:água:acetonitrila (65:20:15, v/v/v), desgaseificada com o auxílio de banho de ultrassom antes de ser colocada no sistema, sob fluxo de 1 mL min⁻¹, padrão interno 1,6-bis-(metanosulfonilo)hexano, utilizando detector DAD e $\lambda = 276$ nm.

As corridas analíticas foram monitoradas em registrador e integrador Shimadzu acoplados a microcomputador com software LC Solution para registro, integração, gerenciamento e tratamento dos dados analíticos.

Equipamentos

Balança analítica de precisão (Celtac, Curitiba, PR, Brasil), agitador de tubos tipo vortex AP 56 (Phoenix, Curitiba, PR, Brasil), concentrador de

amostras TE-019 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil), lavadora ultrassônica UltraClear (Unique, Indaiatuba, SP, Brasil), centrífuga Excelsa (Fanem, Guarulhos, SP, Brasil) e microcentrífuga CM-610 (Biosystems, Curitiba, PR, Brasil).

Preparação de solução padrão e reagentes

O bussulfano (10 mg) foi pesado e, posteriormente, dissolvido e homogeneizado em acetato de etila grau CLAE em balão volumétrico de 100 mL. Foram feitas diluições seriadas de 50000, 40000, 32000, 21500, 16000, 8000, 4000, 3000 e 2000 ng mL⁻¹, para uso como soluções de trabalho de bussulfano – padrão (STD). De modo semelhante, uma solução de 1,6-bis(metanossulfonilo)hexano (25 µg mL⁻¹) foi preparada em acetato de etila grau CLAE para uso como PI, sendo tais soluções utilizadas para diluição em plasma. Todas as soluções (STD e PI) assim obtidas foram estocadas à temperatura de -20°C. A solução de derivatizante foi preparada diariamente dissolvendo-se 0,82 g de dietilditiocarbamato de sódio (DDTC) em 10 mL de água ultrapura.¹⁴

Derivatização e extração do plasma

Durante a validação da metodologia analítica, foram utilizadas bolsas de plasma doadas pelo Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (UFG) e do Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia (INGOH).

As amostras da curva de calibração (200, 400, 800, 1600, 3200 e 5000 ng mL⁻¹) foram injetadas em duplicata imediatamente antes das amostras de limite inferior de quantificação (LIQ), de 200 ng mL⁻¹; as amostras dos controles de qualidade baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA), de 300 ng mL⁻¹, 2150 ng mL⁻¹ e 4000 ng mL⁻¹, respectivamente, foram preparadas em sextuplicata em tubos tipo Eppendorf de 2 mL. Foram adicionados 50 µL das STD e PI ao plasma (500 µL), acrescentando-se 100 µL da solução de DDTC e submetendo-se a agitação no vórtex por 10 s; em seguida, foi feita adição de 500 µL de acetonitrila, submetendo-se a mais 60 s de agitação em vórtex e 5 min de centrifugação a 6000 rpm. O sobrenadante foi transferido para tubos de vidro limpos (12 cm x 1,1 cm), sendo, em seguida, adicionados 2 mL de acetato de etila e submetendo-se a agitação por 60 s no vórtex. As amostras foram centrifugadas por 10 min a 3500 rpm; a fase orgânica (2 mL) foi transferida para tubos de vidro limpos (7,5 cm x 0,8 cm), os quais foram colocados para evaporação até secura sob fluxo de oxigênio a 50°C. A amostra seca foi dissolvida com 100 µL da fase móvel, submetida a agitação por 60 s no vórtex e

transferida para tubos (vials) em estante e acondicionados no amostrador automático do CLAE para injeção de 30 µL de cada amostra.

As curvas de calibração no plasma consistiram em branco (com derivatizante), branco (com PI), mais as seis concentrações citadas, em duplicata, e os controles em sextuplicata, por três dias, para avaliação de linearidade, precisão e exatidão.

Procedimentos de validação

Para a validação do método, foram utilizados como parâmetro os testes recomendados na Resolução – RE nº 899, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Brasil, os quais são descritos a seguir.¹⁵

a) Especificidade

Os testes de especificidade foram realizados com amostras de plasma livre de bussulfano de seis indivíduos, sendo quatro normais, uma amostra lipêmica e uma hemolisada. Adicionalmente, por se tratar de uma técnica para controle terapêutico, a especificidade foi testada contra os fármacos aciclovir, albendazol, anfotericina B, cefalotina, cefepime, dimenidrinato, dipirona, fluconazol, meropenem, omeprazol, ondansetrona, sulfametoxazol + trimetropina, tramadol e vancomicina, dentro de concentrações terapêuticas, nas mesmas condições utilizadas para a análise do bussulfano, com corrida de

30 min, para verificação de possível interferência no tempo de retenção e comprimento de onda do estudo.

b) Recuperação

Injetaram-se oito amostras extraídas e oito não extraídas (preparadas em fase móvel) das concentrações dos CQB, CQM e CQA, obtendo-se as áreas dos picos de bussulfano e PI. O resultado foi expresso em percentagem da quantidade obtida da comparação dos resultados analíticos de soluções padrão não extraídas, conforme a Equação 1:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Média áreas extraídas}}{\text{Média áreas não extraídas}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

O teste de recuperação absoluta ou efeito matriz foi realizado para observar o efeito do plasma (matriz) sobre o processo de extração. Para tanto, foram preparadas amostras brancas, realizando-se o processo de precipitação do plasma com acetonitrila e extração com acetato de etila e, a seguir, transferindo-se a fase orgânica para outro tubo e submetendo-a a secagem. Posteriormente, adicionaram-se o PI, o STD e o derivatizante e a amostra foi novamente seca, reconstituída com a fase móvel e injetada. As áreas dos picos assim obtidas foram comparadas com as áreas dos picos obtidas de soluções em fase móvel (não extraídas), conforme a Equação 1.

c) Linearidade e curva de calibração

A curva de calibração é a relação entre o dado obtido e a concentração conhecida do analito. Cada curva de calibração consistiu de seis concentrações de bussulfano (200, 400, 800, 1600, 3200 e 5000 ng mL⁻¹) e uma concentração fixa de PI (25 µg mL⁻¹) e cada uma delas foi extraída em duplicata.

d) Precisão

Foram avaliadas a repetibilidade (precisão intracorrída) e a precisão intermediária (precisão intercorrídas). A precisão intracorrída foi realizada em sextuplicatas de bussulfano em cada concentração (LIQ, CQB, CQM e CQA) obtidas no mesmo dia. Para a precisão intercorrídas, os valores das concentrações acima citadas foram obtidos em três diferentes dias. A precisão foi expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), que é a razão do desvio padrão (DP) pela concentração média determinada (CMD) multiplicada por 100, conforme a Equação 2:

$$\text{DPR(\%)} = \left(\frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Os valores de precisão admitidos foram de até 15% para os controles, exceto o LIQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20%.¹⁵

e) Exatidão

Foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente (CME) e a concentração teórica correspondente (CT), conforme a Equação 3:

$$\text{Exatidão(\%)} = \left(\frac{\text{CME}}{\text{CT}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

f) Estabilidade

Para verificação da estabilidade de curta duração (amostras extraídas), utilizaram-se três amostras das concentrações de CQB e CQA, determinadas na validação do método analítico. Cada uma delas permaneceu à temperatura ambiente (TA) por, no mínimo, 10 h e, a seguir, foram analisadas. Os resultados foram comparados com os obtidos de amostras recém-preparadas. O mesmo procedimento foi realizado para a exposição das amostras à TA por 6 h.

Para medir a estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento (amostras extraídas e soluções), utilizaram-se três amostras das concentrações CQB e CQA determinadas na validação do método analítico, nas seguintes condições: as amostras foram congeladas à temperatura de -20°C e assim mantidas por 24 h, sendo, então, submetidas ao descongelamento à TA. Quando completamente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas a -20°C por 12 h a 24 h, novamente descongeladas à TA e, assim, sucessivamente, até completar três ciclos, sendo

o fármaco quantificado após o terceiro ciclo. Os resultados foram comparados com os obtidos a partir de amostras recém-preparadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica aqui descrita foi desenvolvida a partir da modificação de outras, utilizadas em métodos cromatográficos previamente descritos para análise de bussulfano em CLAE.^{2,3,9,14} Inicialmente, envolve a eliminação dos interferentes endógenos a partir da precipitação de proteínas com acetonitrila.

A precipitação com acetonitrila foi considerada melhor do que com o uso de metanol, pois apresenta solvente mais limpo e sem interferência nos picos cromatográficos,² além do que, o metanol pode levar à hidrólise dos compostos derivatizados.³

Na Tabela 1, são mostrados os valores obtidos durante o desenvolvimento da técnica analítica no presente estudo, bem como os valores de referência encontrados na literatura para os parâmetros cromatográficos, que determinam fator de capacidade (k'), número de pratos teóricos, simetria do pico e resolução entre os picos.¹⁶

Na Figura 1, são apresentados um cromatograma branco, um cromatograma com os picos de interesse e dois cromatogramas sobrepostos ao branco. Pode-se observar a ausência de interferentes nos tempos de retenção dos picos.

As amostras de plasma lipêmico e hemolisado não interferiram na técnica analítica. Os fármacos testados – aciclovir, albendazol, anfotericina B, cefalotina, cefepime, dimenidrinato, dipirona, fluconazol, meropenem, omeprazol, ondansetrona, sulfametoxazol + trimetropina, tramadol e vancomicina – não foram detectados nos tempos de retenção e nos comprimentos de onda de interesse, tendo a técnica analítica demonstrado ser seletiva para os propósitos de controle terapêutico, assim como descrito por diversos outros autores.^{2,3,14,17}

Tabela 1. Condições cromatográficas encontradas durante o desenvolvimento do método analítico de análise do bussulfano oral

Parâmetro	BU	PI	ICH
Fator de capacidade (k')	5,1	8,5	> 2,0
Número de pratos teóricos	4659	4986	> 2000
Simetria do pico	1,5	1,2	≤ 2,0
Resolução entre os picos	4,0		> 2,0

BU = bussulfano; PI = padrão interno; ICH = recomendado pelo ICH 2005.¹⁶

A recuperação relativa média dos controles, obtida por intermédio da comparação dos resultados do analito extraído/analito não extraído, foi de 89%±0,04 (CQA = 86%; CQM = 87%; CQB = 93%), enquanto a recuperação do PI foi de 74%±0,47.

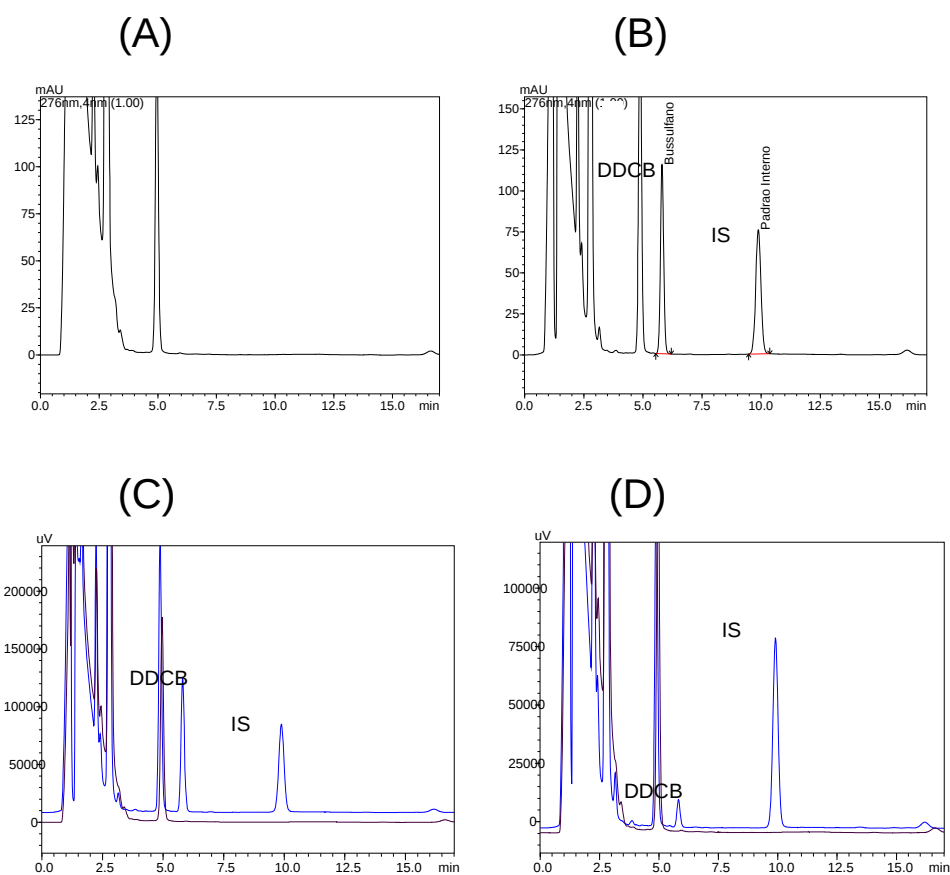


Figura 1. (A) Cromatograma branco. (B) Cromatograma do bussulfano derivatizado [(1,4- bis(dietilditiocarbamoil) butano] (DDCB) e padrão interno derivatizado (PI) em amostra extraída com acetonitrila e acetato de etila na concentração 2150 ng mL^{-1} . (C) Cromatograma branco sobreposto ao cromatograma do DDCB e PI em amostra extraída com acetonitrila e acetato de etila na concentração de 2150 ng mL^{-1} . (D) Cromatograma branco sobreposto ao cromatograma do DDCB e PI em amostra extraída com acetonitrila e acetato de etila na concentração de 200 ng mL^{-1}

A recuperação absoluta média dos controles, obtida pela comparação dos resultados do analito extraído/analito não extraído, foi de $114\% \pm 0,03$ (CQA = 111%; CQM = 118%; CQB = 113%), ao passo que a recuperação do PI foi de $102\% \pm 2,5$.

A recuperação média obtida ($89\% \pm 0,04$) foi superior à descrita por outros autores, de $70 \pm 5\%$ ¹⁸ e 78% .¹⁷

Os limites inferiores de quantificação e detecção obtidos neste estudo foram, respectivamente, de 200 ng mL^{-1} e 40 ng mL^{-1} . A linearidade foi analisada pela curva de calibração ($200\text{--}5000 \text{ ng mL}^{-1}$) ($r = 0,998$; $r = 0,994$; $r = 0,998$). O valor de sensibilidade obtido foi menor do que o descrito por Bleysac et al.³ (25 ng mL^{-1}), mas maior do que o registrado por Heggie et al.¹⁵ (60 ng mL^{-1}). Entretanto, isso não pode ser considerado como uma desvantagem do método, pois pelo descrito na literatura acerca da farmacocinética do bussulfano, a sensibilidade de 200 ng mL^{-1} é suficiente para detectar as concentrações terapêuticas, subterapêuticas e supratrapêuticas deste fármaco.

O coeficiente de variação foi avaliado em termos de repetibilidade (intracorrída), resultando em $1,25\%$ - $11,25\%$, e precisão intermediária (intercorrída), resultando em $2,17\%$ - $10,71\%$. A exatidão encontrada foi de $89,61\%$ - $102,18\%$ (Tabela 2). Os valores de exatidão e precisão encontrados na literatura^{2,3,14,18,19} assemelham-se aos dados obtidos no presente estudo.

Tabela 2. Valores médios de concentrações de bussulfano (BU) em amostras de plasma obtidos no limite inferior de quantificação (LIQ), controles de qualidade baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA) durante a validação do método analítico, e de precisão e exatidão intra e intercorridas

Nível	Conc	Lote	Média±DP (ng mL ⁻¹)	Intracorridas		Intercorridas	
				Precisão	Exatidão	Precisão	Exatidão
				(CV%)	(%)	(CV%)	(%)
LIQ	200	1 (n = 6)	188,05±21,14	11,25	94,02		
		2 (n = 6)	203,76±20,84	10,23	101,88	10,71	102,18
		3 (n = 6)	220,18±10,37	4,71	110,09		
CQB	300	1 (n = 6)	261,91±3,51	1,34	87,30		
		2 (n = 6)	276,57±3,46	1,25	92,19	3,18	89,61
		3 (n = 6)	267,85±9,85	3,68	89,28		
CQM	2150	1 (n = 6)	2.049,06±32,34	1,58	95,31		
		2 (n = 6)	2.038,09±31,87	1,56	94,79	3,40	97,03
		3 (n = 6)	2.133,12±65,69	3,08	99,21		
CQA	4000	1 (n = 6)	3.934,80±87,39	2,22	98,37		
		2 (n = 6)	3.896,78±86,14	2,21	97,42	2,17	98,05
		3 (n = 6)	3.934,27±92,16	2,34	98,36		

Os resultados do teste de estabilidade de curta duração de amostras extraídas e das soluções apresentaram-se dentro de valores aceitáveis, sendo

de 6,25% e 3,18% para CQB, 7,54% e 2,4% para CQA e 13,17% e 4,13% para PI, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Estabilidade de curta duração após processo de extração – 10 h e 6 h à temperatura ambiente, após três ciclos de congelamento e descongelamento do extraído e da solução, e estabilidade de longa duração. Valores expressos como razão de área±desvio padrão relativo e desvio padrão relativo (%)

Controle	Razão ¹	Razão ²	Razão ³	Razão ⁴	Razão ⁵
CQA	1,05±0,07	1,00±0,02	1,01±0,09	0,93±0,05	1,05±0,06
	(7,5%)	(2,40%)	(9,09%)	(5,65%)	(6,31%)
CQB	1,00±0,06	1,10±0,03	1,07±0,03	0,98±0,02	1,11±0,13
	(6,2%)	(3,18%)	(3,64%)	(2,53%)	(12,39%)
PI	1,06±0,14	1,01±0,04	1,06±0,10	0,95±0,04	1,00±0,09
	(13,1%)	(4,13%)	(10,32%)	(4,82%)	(9,59%)

¹(área após 10 h/área recém-extraído)±DP; ²(área após 6 h/área recém-extraído)±DP; ³(área após três ciclos/área recém-extraído)±DP; ⁴(área após três ciclos/área recém-preparado)±DP; ⁵(área após 4 meses congelado/área recém-extraído)±DP.

Os resultados do teste de estabilidade de ciclos de congelamento e descongelamento de amostras extraídas e das soluções também se encontram dentro de valores adequados, sendo de 3,64% e 2,53% para CQB, 9,09% e 5,65% para CQA e 10,32% e 4,82% para PI, respectivamente (Tabela 3).

Estudo sobre a estabilidade do bussulfano em amostras de plasma e sangue total mostrou que o fármaco é estável em plasma por mais de 3 meses a -20°C e que as amostras de sangue para análise deste composto podem ser centrifugadas até 3 h após a coleta. Comprovou-se, ainda, que o bussulfano é estável em sangue total por 24 h a 4°C e em plasma por até 2 anos a -80 °C.²⁰

O tempo total de corrida analítica para um paciente (quatro amostras, em duplicata), incluindo os procedimentos de extração e derivatização, bem como a injeção de controles (CQB, CQM e CQA) e de branco, é de cerca de 10 h. Esse tempo é suficiente para fazer intervenção na posologia do bussulfano durante os 4 dias de tratamento. Por outro lado, a realização do chamado pré-teste (uma dose de bussulfano antes do início do tratamento definitivo), faculta a obtenção de parâmetros farmacocinéticos que podem ser utilizados para prever a dose mais adequada para o tratamento.

CONCLUSÕES

Neste estudo, descreve-se uma técnica para determinação do bussulfano em plasma por CLAE/DAD, estabelecendo-se seus parâmetros de validação (curva de calibração, linearidade, exatidão, precisão, limite inferior de quantificação, estabilidade e seletividade).

A técnica descrita apresenta a vantagem de necessitar de curto tempo de análise (17 min), com cromatograma livre de interferentes, utiliza apenas 500 µL

de plasma e apresenta baixo custo, pois a extração é líquida-líquida e a preparação da amostra conta com apenas duas etapas, uma de precipitação de proteínas e outra de extração com acetato de etila.

Essa técnica pode ser aplicada a estudos farmacocinéticos e de monitoração terapêutica em pacientes submetidos a condicionamento com este fármaco para transplante de TCTH, em tempo hábil para que mudanças de posologia, se necessárias, possam ser implementadas ainda durante o tratamento.

REFERÊNCIAS

1. Ciurea, S. O.; Anderson, B. S.; *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2009**, *15*, 523.
2. Chow, D. S. L.; Bhagwatwar, H. P.; Phadungpojna, S.; Andersson, B. S.; *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **1997**, *704*, 277.
3. Bleyzac, N.; Barou, P.; Aulagner, G.; Rapid and sensitive high performance liquid chromatographic method for busulfan assay in plasma. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **2000**, *742*, 427.
4. Bullock, J. M.; Smith, P. F.; Booker, B. M.; Loughner, J.; Capozzi, D., McCarthy Jr, P. L.; Shaw, L. M.; *Ther. Drug Monit.* **2006**, *28*, 62.
5. Slattery, J. T.; Risler, L. J.; *Ther. Drug Monit.* **1998**, *20*, 543.

6. Slattery, J. T.; Clift, R. A.; Buckner, C. D.; Radich, J.; Storer, B.; Bensinger, W. I.; Soll, E.; Anasetti, C.; Bowden, R.; Bryant, E.; Chauncey, T.; Deeg, H. J.; Doney, K. C.; Flowers, M.; Gooley, T.; Hansen, J. A.; Martin, P. J.; McDonald, G. B.; Nash, R.; Petersdorf, E. W.; Sanders, J. E.; Schoch, G.; Stewart, P.; Storb, R.; Sullivan, K. M.; Thomas, E. D.; Witherspoon, R. P.; Appelbaum, F. R.; *Blood* **1997**, 89, 3055.
7. Bornhäuser, M.; Storer, B.; Slattery, J. T.; Appelbaum, F. R.; Deeg, J.; Hansen, J.; Martin, P. J.; McDonald, G. B.; Nichols, W. G.; Radich, J.; Woolfrey, A.; Jenke, A.; Schleyer, E.; Thiede, C.; Ehninger, G.; Anasetti, C.; *Blood* **2003**, 102, 820.
8. Takamatsu, Y.; Ogata, K.; Yamauchi, K.; Hara, S.; Kamimura, T.; Hayashi, S.; Suzumiya, J.; Tamura, K.; *Jpn. J. Clin. Oncol.* **2005**, 35, 400.
9. Tran, H. T.; Madden, T.; Petropoulos, D.; Worth, L. L.; Felix, E. A.; Sprigg-Saenz, H. A.; Choroszy, M.; Danielson, M.; Przepiorka, D.; Chan, K. W.; *Bone Marrow Transplant.* **2000**, 26, 463.
10. Tabak, A.; Hoffer, E.; Rowe, J. M.; Krivoy, N.; *Ther. Drug Monit.* **2001**, 23, 526.
11. Bullock, J. M.; Smith, P. F.; Booker, B. M.; Loughner, J.; Capozzi, D.; McCarthy Jr, P. L.; Shaw, L. M.; *Ther. Drug Monit.* **2006**, 28, 62.
12. Nath, C. E.; Shaw, P. J.; *Curr. Clin. Pharmacol.* **2007**, 2, 75.
13. Hassan, M.; Ljungman, P.; Ringdén, O.; Hassan, Z.; Öberg, G.; Nilsson, C.; Békassy, A.; Bielenstein, M.; Abdel-Rehim, M.; Georén, S.; Astner, L.; *Bone Marrow Transplant.* **2000**, 25, 915.

14. Heggie, J. R.; Wu, M.; Burns, R. B.; Ng, C. S.; Fung, H. C.; Knight, G.; Barnett, M. J.; Spinelli, J. J.; Embree, L.; *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **1997**, 692, 437.
15. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003, Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos, *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 2 jun. 2003.
16. ICH Harmonised Tripartite Guideline; *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, Geneva, Switzerland, 2005.
17. Quernin, M. H.; Poonkuzhali, B.; Médard, Y.; Dennison, D.; Srivastava, A.; Krishnamoorthy, R.; Chandy, M.; Jacqz-Aigrain, E.; *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **1999**, 721, 147.
18. Peris, J. E.; Latorre, J. A.; Castel, V.; Verdeguer, A.; Esteve, S.; Torres-Molina, F.; *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **1999**, 730, 33.
19. Hara, S.; Tsuchie, M.; Tsujioka, R.; Kimura, M.; Fuji, M.; Kuroda, T.; Ono, N.; *Anal. Sci.* **2000**, 16, 287.
20. Balasubramanian, P.; Srivastava, A.; Chandy, M.; *Clin. Chem.* **2001**, 47, 766.

Individualizing Oral Busulfan Dose after Using a Test Dose in Patients Undergoing Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Pharmacokinetic Characterization

*Cristiane Effting, MSc,^{§**} Adriano de Moraes Arantes, PhD,^{††} Luciana Vieira Queiroz Labre, Specialist,^{*} Wilsione José Carneiro, MSc,^{*} Jerônimo Raimundo de Oliveira Neto, MSc,^{*} César Bariani, Specialist,[‡] Luiz Carlos Cunha, PhD^{*}*

Supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG)

The authors declare no conflict of interest.

Correspondence: Cristiane Effting, MSc, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Unidade II, NEPET-UFG, Av. Universitária nº 1166, Fundos, Praça Universitária, 74605-220, Goiânia-GO, Brasil. Tel.: + 55 62 3209-6181. (e-mail: farm_cristiane@yahoo.com.br)

[§] Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil;

^{**} Universidade Estadual de Goiás;

^{††} Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital Araújo Jorge, Goiânia, GO, Brazil.

Background: Busulfan is an alkylating agent, used for conditioning patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation, with a narrow therapeutic range and highly variable pharmacokinetics. High concentrations induce toxicity, especially hepatic veno-occlusive disease (HVD), also referred to as sinusoidal obstruction syndrome (SOS). This study aimed to assess busulfan pharmacokinetic variability in pre-transplant conditioning regimens using an analytical method validated by HPLC/PDA.

Methods: Eight patients that used the test dose (TD) of 1 mg/kg busulfan 10 days before conditioning were included and 10 serial blood samples were collected to determine: elimination half-life ($t_{(1/2)}$), total area under the curve (AUC_T), total clearance (Cl_T/F), and plasma concentration at steady state ($\bar{C}_{ss}$), using a monocompartmental model and first order kinetics. HPLC/PDA Shimadzu, column ACE[®] C18 (150 mm x 4 mm); methanol/water/acetonitrile (65:20:15), eluent flow rate of 1 mL/min; 1,6-bis-(methanesulfonyloxy)hexane; UV λ = 276 nm; analysis time 17 min; derivatization with sodium diethylcarbamate. Following this profile, the dose was adjusted and four blood samples/day were collected at days 2, 3, and 4 of treatment for new plasma determinations.

Results: Four patients needed higher doses; mean dose administered was 1.02 ± 0.19 mg/kg. Mean results at TD: $t_{(1/2)} = 2.88 \pm 0.5$ h; $Cl_T/F = 0.18 \pm 0.03$ L/h/kg; $AUC_T = 5461.00 \pm 961.15$ ng/mL/h; $\bar{C}_{ss} = 911.3 \pm 159.8$ ng/mL. Mean

results of samples collected during conditioning: $t_{(1/2)} = 3.21 \pm 0.9$ h; $Cl_T/F = 0.13 \pm 0.02$ L/h/kg; $AUC_T = 7571 \pm 1705$ ng/mL/h; $\overline{C_{ss}} = 1262.0 \pm 284.3$ ng/mL.

Conclusions: High variability in assessed pharmacokinetic parameters was observed, with a 38% variation in $\overline{C_{ss}}$ between TD and conditioning regimen; Cl_T/F decreased by 30%, suggesting drug accumulation after multiple dose regimen. Although lower than reported in the literature, this variation may be associated with toxicity of proposed treatment, justifying patient monitoring and enhancing validity of previous pharmacokinetic evaluation using TD regimen.

Key Words: busulfan, pharmacokinetics, HPLC, test dose

INTRODUCTION

Busulfan is a bifunctional alkylating agent, which causes DNA damage and interrupts cell division. This compound was initially used in palliative treatment of chronic myeloid leukemia (CML) in the 1950s.¹⁻³

Since the 1990s, evidence has been collected that reinforce the use of busulfan instead of total body irradiation (TBI) in myeloablative conditioning regimens before hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). This is justified because TBI is frequently associated with post-transplant complications, such as intellectual and physical impairments in children, second neoplasias, cataracts, and endocrine dysfunctions. Furthermore, conditioning regimens that include busulfan are associated with efficacy equivalent to that of TBI, presenting less adverse effects.²⁻⁴

Busulfan presents high toxicity to bone marrow stem cells and their progenitor cells. It is a highly myelotoxic agent and has a broad spectrum of activity against a variety of malignancies. Nonetheless, this compound is not used isolatedly in conditioning regimens because it presents limited toxicity against mature lymphocytes. Its bone marrow toxicity is complemented with other agents that have higher toxicity against lymphocytes, such as nitrogen mustards or cyclophosphamide. Busulfan + cyclophosphamide conditioning regimen has been widely used in pre-HSCT conditioning regimen.^{1,5-7}

Also, busulfan presents narrow therapeutic range and high variability in absorption and bioavailability, both among patients and doses.⁸

Variations in systemic exposure to busulfan as well as in therapeutical responses to this drug can be expressed by total area under the curve (AUC_T) versus time, peak of plasma concentration, maximum plasma concentration (C_{max}), or dividing AUC_T by time between doses ($AUC_T/\Delta t$) to obtain the plasma concentration at steady state ($\overline{C_{ss}}$). Another interesting pharmacokinetic parameter is total clearance (Cl_T/F). Eventual physiological and biochemical alterations that change kinetic parameters may have a great impact on HSCT clinical outcomes.^{1,9}

Patients presenting low busulfan plasma concentration and, consequently, low systemic exposure to it ($\overline{C_{ss}} < 600$ ng/mL) have higher risk of primary disease relapse or graft rejection after HSCT. In contrast, high systemic concentrations ($\overline{C_{ss}} > 925$ -1025 ng/mL) have been correlated with an increased toxicity risk. Adverse reactions associated with busulfan + cyclophosphamide conditioning are well documented and include cardiotoxicity, hemorrhagic cystitis, mucositis, interstitial pneumonia, and hepatic veno-occlusive disease (HVD), also referred to as sinusoidal obstruction syndrome (SOS). Among these adverse or toxic reactions, the most clinically relevant one is SOS, a liver lesion that involves the obstruction of small intrahepatic venules and consequent damage around the centrilobular hepatocytes, which affect 20-40% of the children and adults that undergo HSCT with the use of busulfan.^{2,10-14}

Therapeutic drug monitoring (TDM) has been proposed because it is considered beneficial, since it allows individualization of busulfan therapy. TDM

and individual dose adjustment have been prescribed aiming to reduce both graft rejection and toxic effects of this drug, such SOS and seizures.^{8,9,11,12,14,15}

Using busulfan instead of TBI, particularly in combination with a defined target therapeutic range, applying TDM, results in decreased toxicity related to treatment and, possibly, less graft versus host disease (GVHD).¹⁶ Additionally, busulfan doses should be adjusted to $\overline{C}_{ss} = 900 \pm 100$ ng/mL to guarantee the success of stem cell transplants from human leukocyte antigen (HLA)-compatible related or unrelated donors.¹⁶

Monitoring patients treated with busulfan since the first dose presents some challenges. For starters, the drug is administered four times a day (every 6 h) for 4 days. Therefore, individualization of therapy is not feasible before the administration of the first dose, because it is necessary to collect and process the samples, a procedure that may take more than 24 h. Consequently, the adjustment of the dose may only take place on the last day of therapy.¹⁷

A test dose (TD) is the administration of a dose of the drug prior to the treatment itself to assess its pharmacokinetics. The usage of TD to determine the individual pharmacokinetic parameters before the conditioning regimen for HSCT has already been proposed for busulfan. The potential advantages of a TD evaluation include minimizing complications described for monitoring after the first dose and possibility to use individualized dose since the beginning of therapy. Moreover, by adopting this procedure, it is possible to determine the pharmacokinetics of the compound in the out-of-hospital environment.^{9,17}

In this study, patients who underwent hematopoietic stem cell transplantation were followed up, in a TD regimen, to obtain pharmacokinetic parameters and compare to kinetics observed during the conditioning regimen.

MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Araújo Jorge Hospital (Protocol CEPACCG no. 007/09). All the subjects participating in this research (or their legal representatives) agreed to participate and signed a written free and informed consent form.

Patients

The pharmacokinetic data of eight patients that underwent HSCT at Araújo Jorge Hospital, in Goiânia, GO, Brazil, were prospectively followed. They received an oral TD of 1 mg/kg busulfan 10 to 14 days before HSCT conditioning regimen, and 10 serial blood samples were collected (0.5 h, 1.0 h, 1.5 h, 2.0 h, 3.0 h, 4.0 h, 5.0 h, 6.0 h, 8.0h, and 10.0 h after drug administration) from each patient in tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).

Drug Analysis

The blood samples were centrifuged at 3500 rpm for plasma separation and frozen at -4°C for further analyses using high performance liquid chromatography coupled to diode array detector (HPLC/PDA).

Plasma analyses were performed using HPLC/PDA (Shimadzu) column ACE[®] C18 (150 mm x 4 mm), mobile phase consisting of methanol/water/acetonitrile (65:20:15, v/v/v), eluent flow rate of 1 mL/min, UV detection $\lambda = 276$ nm, after protein precipitation with acetonitrile, liquid-liquid extraction with ethyl acetate using 1,6-bis-(methanesulfonyloxy)hexane as internal standard (IS), and derivatization with sodium diethylcarbamate.

After obtaining busulfan concentrations at the respective times, these values were plotted in a concentration-decay curve versus time on a semi-log scale, and the pharmacokinetic parameters were calculated as follows.¹⁸

The elimination rate constant (k_{el}) was calculated from the concentration-decay line in mono-log paper according to Equation 1:

$$-k_{el} = \frac{\ln C_1 - \ln C_2}{t_2 - t_1} \quad \text{Equation 1}$$

where:

k_{el} = elimination rate constant

C_1 = concentration of busulfan in plasma at time 1

C_2 = concentration of busulfan in plasma at time 2

t_1 = time 1

t_2 = time 2

To calculate AUC_T , according to Equation 2, first we calculated the area under the curve (AUC) from 0 to 10 h (AUC_{0-10h}) by the trapezoidal rule and extrapolated to infinity ($AUC_{10-\infty}$).

$$AUC_T = AUC_{(0-10h)} + AUC_{(10-\infty)} \quad \text{Equation 2}$$

To perform the calculation of $t_{(1/2)}$ we used Equation 3:

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{kel} \quad \text{Equation 3}$$

Cl_T/F was calculated from the ratio of dose and AUC_T according to Equation 4:

$$Cl_{T/F} = \frac{Dose * F * S}{AUC_T} \quad \text{Equation 4}$$

where:

F = bioavailability (considered = 1)

S = salt factor (= 1)

The new dose of the drug to be administered was determined by multiplying Cl_T/F by the value of the target AUC (value estimated to adjust the dose).

Busulfan $\overline{C}_{ss}$ was determined from the ratio of AUC_T and time between doses (Δt) according to Equation 5:

$$\overline{C}_{ss} = \frac{AUC_T}{\Delta t} \quad \text{Equation 5}$$

The volume of distribution (V_d) was obtained from the ratio of Cl_T/F and kel (Equation 6).

$$V_d = \frac{Cl_{T/F}}{kel} \quad \text{Equation 6}$$

After determining busulfan pharmacokinetic profile for each patient, the dose was adjusted to the proposed therapeutic objective of 900 ng/mL.

Posteriorly, during the conditioning phase, the patients received 16 doses of oral busulfan, one every 6 h for 4 days, adjusted according to the pharmacokinetic profile, and blood samples were collected 0.5 h, 2 h, 4 h, and 6 h after the 5th, 9th, and 13th doses (morning doses at days 2, 3, and 4 of busulfan use – D2, D3, and D4, respectively) of the pre-HSCT conditioning regimen. All the pharmacokinetic parameters were once more estimated for analysis and comparison.

Statistical Procedure

Data were registered and prepared using Microsoft Excell software for Windows and the statistical analysis was performed using the Statistical

Package for the Social Sciences (SPSS), version 17.0, at 95% confidence level, i.e., differences with $p < 0.05$ were considered significant.

All the variables under study showed normal distribution, and therefore Student's t-test was applied to paired data to verify the existence of significant differences between the variables in relation to the period of data collection. Also the linear regression analysis was used to verify the existence of a correlation between $\overline{C_{ss}}$, $t_{(1/2)}$, and CL_T/F .

RESULTS AND DISCUSSION

Eight patients were included in this study, with mean age of 29.5 ± 9.42 years, six males (75%), and sex compatibility between donors and receptors was 37.5%. Two patients (25%) received the diagnosis of CML, whereas 75% were diagnosed with acute myeloid leukemia (AML). Only one patient did not present total compatibility of the HLA system. Regarding the conditioning regimen, 87.5% of the patients received busulfan + cyclophosphamide and only one (12.5%) received fludarabine + busulfan (Table 1).

The mean dose administered to patients was 1.02 ± 0.19 mg/kg (0.8-1.92 mg/kg) and the median was 0.98 mg/kg. Half of the patients had their doses decreased, while the other half had them increased, with a discreet increase for two of them. In their study, Takamatsu et al.⁹ reported a median dose adjusted after TD of 0.81 mg/kg, and 78% of the patients required dose decreases. Bornhäuser et al.¹⁶ monitored 25 patients, among which eight reached the

therapeutic objective with the standard dose, nine required dose decreases, and 18 dose increases. Scott et al.¹⁹ described dose adjustment for 37 patients, among which 15 required dose increases and 20 dose decreases. Although a high variation can be found in the literature, the results of the present study were similar to previously described data.

TABLE 1. Anthropometric, clinical, laboratory, and therapeutic characteristics of patients diagnosed with myeloid leukemia

Patient	Age	Sex		Weight (kg)	Disease	Cell	Graft	HLA comp	Dose	Cond
		Rec	Don							
1 JCS	46	M	M	55.6	AML	5.8×10^6	PB	6x6	1.04	BUCY
2 MFM	28	M	F	83.0	AML	3.3×10^6	PB	5x6	0.86	BUCY
3 VBO	32	M	F	86.0	AML	3.8×10^6	PB	6x6	1.2	BUCY
4 MFA	23	M	F	71.5	AML	3.3×10^6	PB	6x6	1.07	BUCY
5 HBV	18	M	F	70.0	CML	3.4×10^8	BM	6x6	0.88	BUCY
6 DVR	31	F	F	60.0	AML	2.2×10^8	BM	6x6	0.93	BUCY
7 RDS	40	F	F	74.0	AML	4.7×10^8	BM	6x6	0.80	FLUBU
8 CAA	22	M	F	68.0	CML	2.6×10^8	BM	6x6	1.38	BUCY

Rec = receptor; Don = donor; Ncell = number of transplanted cells; HLA comp = HLA compatibility; AdmD = administered dose; Cond = conditioning regimen; M = male; F = female; AML = acute myeloid leukemia; CML = chronic myeloid leukemia; PB = peripheral blood; BM = bone marrow; BUCY = busulfan + cyclophosphamide; FLUBU = fludarabine + busulfan.

At TD, busulfan presented mean $t_{(1/2)}$ of 2.88 ± 0.5 h. Takamatsu et al.⁹ also applied TD to 50 patients and found mean $t_{(1/2)}$ of 3.05 ± 0.83 h. In a previous study, Takamatsu et al.² had already used this method for monitoring patients and registered a median value of 3.2 h (2.1-6.0 h).

Median pharmacokinetic parameters obtained at TD in the present study were: $Cl_T/F = 0.18 \pm 0.03$ L/h/kg; $AUC_T = 5461.00 \pm 961.15$ ng/mL/h; $\overline{C_{ss}} = 911.3 \pm 159.8$ ng/mL; $C_{max} = 1140.8 \pm 342.8$ ng/mL (Table 2).

Figure 1 shows the variations in busulfan plasma concentration ($\overline{C_{ss}}$) versus time of serial blood sampling during TD. A great variation in concentration was observed during drug absorption (up to the 2nd hour), while the variation was less evident during the period of drug elimination, attributing a great variability to the phase of drug absorption.

In the samples collected during conditioning period, an increase in $t_{(1/2)}$ and a decrease in total clearance, with a consequent increase in AUC_T and $\overline{C_{ss}}$, were observed, indicating that the drug presents a different profile when administered in multiple doses during pre-HSCT conditioning regimen. The values obtained in this study were: $t_{(1/2)} = 3.21 \pm 0.9$ h; $Cl_T/F = 0.13 \pm 0.02$ L/h/kg; $AUC_T = 7571 \pm 1705$ ng/mL/h; $\overline{C_{ss}} = 1262.0 \pm 284.3$ ng/mL; $C_{max} = 1372.3 \pm 360.5$ ng/mL (Table 2).

TABLE 2. Pharmacokinetic parameters of oral busulfan in patients diagnosed with leukemia (n = 8) that underwent test dose and conditioning regimen before hematopoietic stem cell transplantation; values expressed as mean±SD

Period	AUC _T (µg/L)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	t _(1/2) (h)	kel (h ⁻¹)	Vd (L/kg)	Cl _T /F (L/h/kg)	$\overline{C}_{ss}$ (ng/mL)
TD	5461.0±961.2	1140.8±342.8	1.4±0.7	2.9±0.5	0.2484±0.0524	0.7869±0.1886	0.1893±0.0360	911.4±159.8
D2	7496.7±1643.5	1430.8±450.7	1.9±1.2	3.3±0.9	0.2236±0.0589	0.6525±0.1531	0.1394±0.0255	1249.4±273.9
D3	7437.1±1893.7	1292.5±341.8	1.4±0.7	3.4±1.1	0.2250±0.0689	0.6533±0.1032	0.1436±0.0353	1239.6±315.7
D4	7772.1±1781.4	1401.0±325.7	1.4±0.8	3.0±0.8	0.2436±0.0611	0.5694±0.1259	0.1337±0.0205	1295.3±296.9
Mean	7640.0±1568.5	1377.9±264.0	1.5±0.6	3.1±0.8	0.2299±0.0379	0.6215±0.0772	0.1378±0.0247	1273.4±261.4

AUC_T = total area under the curve; C_{max} = maximum concentration; T_{max} = maximum time; t_(1/2) = elimination half-life; kel = elimination rate constant; Vd = volume of distribution; Cl_T/F = total clearance; $\overline{C}_{ss}$ = plasma concentration at steady state; TD = test dose; D2 = values registered at conditioning day 2; D3 = values registered at conditioning day 3; D4 = values registered at conditioning day 4; Mean = mean of the values obtained at D2, D3, and D4.

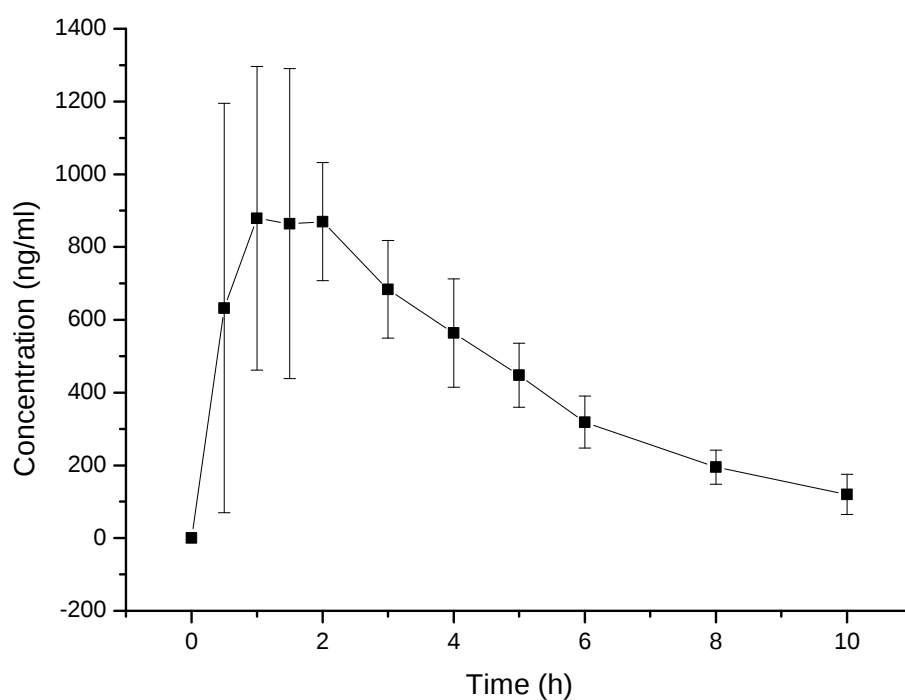


FIGURE 1. Pharmacokinetic profile of serial blood sampling during test dose in eight patients receiving a test dose of busulfan; values expressed as mean±SD.

Figure 2 shows the variations in busulfan plasma concentration ($\overline{C}_{ss}$) versus time of serial blood sampling during pre-HSCT conditioning regimen.

Correlation tests were applied between $t_{(1/2)}$ and $\overline{C}_{ss}$ at TD and days of treatment. A correlation between these variables was detected only at D3 and D4 ($r^2 = 0.6979$ and 0.6976 , respectively), and no correlation was observed for TD at D2 and the comparison with mean $\overline{C}_{ss}$ obtained at all days of treatment.

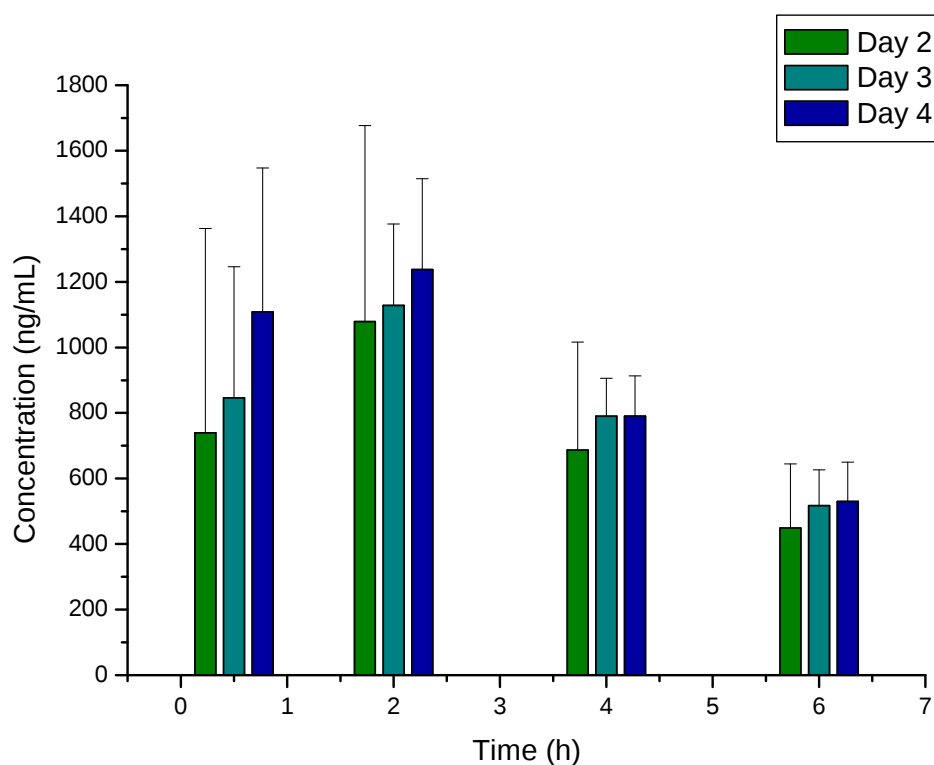


FIGURE 2. Pharmacokinetic profile of serial blood sampling during pre-conditioning regimen for hematopoietic stem cell transplantation in eight patients receiving multiple doses of busulfan; values expressed as mean $\pm$ SD.

Regarding Cl_T/F and $\bar{C}_{ss}$, a statistically significant correlation was detected for TD ($r^2 = 0.9804$), D3 ($r^2 = 0.6777$), and the comparison with mean $\bar{C}_{ss}$ ($r^2 = 0.4186$), but no correlation was found for D2 and D4.

In the comparative analysis between TD and doses at all days of treatment, a statistically significant difference was registered for: AUC_T between TD and D4; V_d between DT and D3, between DT and D4, and between DT and

the mean of the three days of treatment; CL_T/F between DT and D2, between DT and D3, between DT and D4, and between DT and the mean of the three days of treatment; $\overline{C_{ss}}$ between DT and D4, and between DT and the mean of the three days of treatment. No statistically significant differences were found between C_{max} , T_{max} , $t_{(1/2)}$, and k_{el} (Table 3).

These results suggest the possibility of interference of busulfan accumulation and its interaction with other compounds used during pre-HSCT conditioning regimen, since no differences were found in this drug performance at TD and D2, except for CL_T/F . The differences between TD and Vd started only from D3 and just at D4 the decrease in CL_T/F and Vd influenced AUC_T and $\overline{C_{ss}}$. During the study, CL_T/F decreased, contributing to busulfan accumulation in the patients' body, although no differences between elimination constants were found.

McCune et al.¹⁴ applied monitoring during transplantation, corrected the third daily dose, and found $\overline{C_{ss}}$ of 976 ± 171 ng/mL.

Kellogg et al.²⁰ reported variability of up to 10 times in AUC_T . Russell and Kangarloo⁴ concluded that busulfan gastrointestinal absorption is variable and unpredictable and that AUC_T and C_{max} present variability of up to 20 times among patients and over five times among doses in the same patient.

TABLE 3. Comparative analysis of variables at different periods of blood sampling to measure busulfan. Values expressed indicate p value obtained using the Student's t-test

Period	AUC _T (µg/L)	Cmax (ng/mL)	Tmax (h)	t _(1/2) (h)	kel (h ⁻¹)	Vd (L/kg)	Cl _T /F (L/h/kg)	$\bar{C}_{ss}$ (ng/mL)
DT x D2	0.076	0.337	0.643	0.210	0.296	0.231	0.019*	0.076
DT x D3	0.051	0.467	0.785	0.167	0.104	0.022*	0.018*	0.052
DT x D4	0.038*	0.223	1.000	0.727	0.873	0.009*	0.005*	0.038*
DT x Mean	0.055	0.264	0.827	0.348	0.182	0.021*	0.006*	0.032*
D2 x D3	0.692	0.490	0.535	0.919	0.799	0.973	0.360	0.694
D2 x D4	0.934	0.743	0.618	0.600	0.575	0.438	0.784	0.934
D2 x Mean	0.501	0.575	0.534	0.442	0.601	0.621	0.412	0.502
D3 x D4	0.646	0.395	0.882	0.519	0.581	0.165	0.373	0.646
D3 x Mean	0.723	0.365	0.632	0.364	0.733	0.239	0.326	0.612
D4 x Mean	0.385	0.750	0.812	0.723	0.540	0.234	0.443	0.693

AUC_T = total area under the curve; Cmax = maximum concentration; Tmax = maximum time; t_(1/2) = elimination half-life; kel = elimination rate constant; Vd = volume of distribution; Cl_T/F = total clearance; $\bar{C}_{ss}$ = plasma concentration at steady state; TD = test dose; D2 = values registered at conditioning day 2; D3 = values registered at conditioning day 3; D4 = values registered at conditioning day 4; Mean = mean of the values obtained at D2, D3, and D4; * p < 0.05: statistically significant difference.

CONCLUSIONS

To apply pharmacokinetic studies to drug therapeutic monitoring, it is necessary to use validated, exact, and precise methods in order to determine drug concentrations in the blood. In the present study, a validated method was applied using the parameters required by the local regulatory agency to quantify busulfan in plasma and adjust the dose according to the therapeutic objective.

A great variability was observed in the pharmacokinetic parameters evaluated, as follows: 38% for $\overline{C_{ss}}$ between TD and conditioning regimen, $t_{(1/2)}$ increased by 11%, Cl_T/F decreased by 30%, and C_{max} increased by 20%, suggesting accumulation of busulfan when the drug is administered in a multiple dose regimen. Although the variation found in the present study is lower than other results reported in the literature, it may be associated to toxicity or failure in the proposed treatment, which justifies monitoring treatment and enhances the validity of previous pharmacokinetic evaluations in a TD regimen.

REFERENCES

1. McCune J, Gibbs JP, Slattery JT. Plasma concentration monitoring of busulfan: does it improve clinical outcome? *Clin Pharmacokinet.* 2000 Aug;39:155–165.
2. Takamatsu Y, Ogata K, Yamauchi K, et al. An evaluation of busulfan pharmacokinetics in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Jpn J Clin Oncol.* 2005;35:400–403.

3. Ciurea SO, Andersson BS. Busulfan in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15:523–536.
4. Russell JA, Kangaroo SB. Therapeutic drug monitoring of busulfan in transplantation. *Curr Pharm Des*. 2008;14:1936–1949.
5. Hassan M. The role of busulfan in bone marrow transplantation. *Med Oncol*. 1999;16:166–176.
6. Schiltmeyer B, Klingebiel T, Schwab M, et al, Population pharmacokinetics of oral busulfan in children. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2003;52:209–216.
7. Nath CE, Shaw PJ. Busulfan in blood and marrow transplantation: dose, route, frequency, and role of therapeutic drug monitoring. *Curr Clin Pharmacol*. 2007;2:75–91.
8. Quernin MH, Poonkuzhali B, Montes C, et al. Quantification of busulfan in plasma by gas chromatography-mass following derivatization with tetrafluorothiophenol. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1998;709:47–56.
9. Takamatsu Y, Sasaki N, Eto T, et al. Individual dose adjustment of oral busulfan using a test dose in hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol*. 2007;86:261–268.
10. Hassan M, Ljungman P, Ringdén O, et al. The effect of busulphan on the pharmacokinetic of cyclophosphamide and its 4-hydroxy metabolite: time interval influence on therapeutic efficacy and therapy-related toxicity. *Bone Marrow Transplant*. 2000;25:915–924.

11. Tran HT, Madden T, Petropoulos D, et al. Individualizing high-dose oral busulfan: prospective dose adjustment in a pediatric population undergoing allogeneic stem cell transplantation for advanced hematologic malignancies. *Bone Marrow Transplant.* 2000;26:463–470.
12. Mürdter TE, Coller J, Claviez A, et al. Sensitive and rapid quantification of busulfan in small plasma volumes by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Clin Chem.* 2001;47:1437–1442.
13. Reis EO, Vianna-Jorge R, Suarez-Kurtz G, Lima ELS, Azevedo DA. Development of a rapid and specific assay for detection of busulfan in human plasma by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2005;19:1666–1674.
14. McCune J, Batchelder A, Deeg HJ, et al. Cyclophosphamide following targeted oral busulfan as conditioning for hematopoietic cell transplantation: pharmacokinetics, liver toxicity, and mortality. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007;13:853–862.
15. Rauh M, Stachel D, Kuhlen M, Gröschl M, Holter W, Rascher W. Quantification of busulfan in saliva and plasma in haematopoietic stem cell transplantation in children: validation of liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *Clin Pharmacokinet.* 2006;45:305–316.

16. Bornhäuser M, Storer B, Slattery JT, et al. Conditioning with fludarabine and targeted busulfan for transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells. *Blood*. 2003;102:820–826.
17. Burns RB, Heggie JR, Embree L. A gas-chromatographic assay method for busulfan with sensitivity for test dose therapeutic monitoring. *J Pharm Biomed Anal*. 1995;13:1073–1078.
18. Tozer TN, Rowland M. *Introdução à farmacocinética e à farmacodinâmica: as bases quantitativas da terapia farmacológica*. Porto Alegre: Artmed; 2009.
19. Scott B, Deeg HJ, Storer B, et al. Targeted busulfan and cyclophosphamide as compared to busulfan and TBI as preparative regimens for transplantation in patients with advanced MDS or transformation to AML. *Leuk Lymphoma*. 2004;45:2409–2417.
20. Kellogg MD, Law T, Sakamoto M, Rifai N. Tandem mass spectrometry method for the quantification of serum busulfan. *Ther Drug Monit*. 2005;27:625–629.

6 CONCLUSÕES

Os métodos disponíveis na literatura podem ser empregados para a monitoração terapêutica do bussulfano oral. A disponibilidade de equipamentos e a experiência do analista devem direcionar a escolha do método a ser utilizado. O HPLC é uma opção viável por seu menor custo de investimento e manutenção e pela facilidade de treinamento do analista.

Verificamos que a técnica analítica validada para a quantificação do bussulfano oral, que apresenta precisão, exatidão, linearidade, especificidade e estabilidade dentro dos limites recomendados pela ANVISA para métodos bioanalíticos, é aplicável à monitoração terapêutica do bussulfano oral.

A técnica analítica foi aplicada em DT e durante o condicionamento dos pacientes que receberam bussulfano oral pré-TCTH para obtenção de valores de concentração plasmática *versus* tempo.

A média da dose administrada após o ajuste foi de $1,02 \pm 0,19 \text{ mg kg}^{-1}$, semelhante ao padrão, que é de 1 mg kg^{-1} . Neste estudo, metade dos pacientes necessitou de aumento da dose e a outra metade, de redução.

Os parâmetros farmacocinéticos avaliados apresentaram diferenças de comportamento entre as etapas de DT e de condicionamento, tendo sido

observado aumento de ASC_T , da concentração plasmática no *steady-state* e da meia-vida de eliminação e diminuição do *clearance*, sugerindo acúmulo do fármaco e/ou saturação de seu mecanismo de detoxificação.

Também observamos grande variabilidade farmacocinética, especialmente no período da absorção, com CV% de 90% nos primeiros 30 min após a administração ($623,2 \pm 562,7 \text{ ng mL}^{-1}$).

Uma nova intervenção durante o condicionamento pode ser útil para a manutenção dos níveis plasmáticos dentro da faixa terapêutica.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para a execução deste trabalho, propôs-se o desenvolvimento, a validação e a aplicação de uma metodologia analítica visando a monitoração de bussulfano oral em pacientes submetidos a TCTH alogênico HLA-idêntico.

O desenvolvimento da metodologia apresentou muitas dificuldades, como o insucesso da reprodutibilidade de outras técnicas descritas anteriormente e a impossibilidade de se visualizar o bussulfano nos detectores comumente associados a CLAE (UV e FL). Assim, foi necessário introduzir a etapa de derivatização, que acrescenta mais um passo ao processo analítico e torna a evaporação da amostra mais lenta, em decorrência da água utilizada na diluição do derivatizante.

Realizamos testes de tempo de derivatização de 1 min a 60 min, sendo observado que, após 5 min da reação, não ocorreu aumento da área do pico do bussulfano e do PI.

Também foram testadas várias proporções de fase móvel, além de diversos tipos de extração, entre eles, a extração com diversas proporções de éter metil-terciário butílico (MTBE), diclorometano e acetato de etila, metanol, acetonitrila e acetato de etila, além de extrações em meio ácido e meio básico para obtenção de picos com fator de capacidade, resolução e número de pratos

teóricos de acordo com valores preconizados para, assim, chegar ao método com a reprodutibilidade, a exatidão e a precisão apresentadas neste trabalho. O método descrito é semelhante ao utilizado por Tran e outros (2000).

Este trabalho é uma primeira tentativa de individualização da dose do bussulfano em nosso centro de estudo. Utilizamos um esquema de DT na tentativa de compensar as dificuldades de obtenção, transporte, tempo de processamento e análise de amostras, assim como de obtenção dos parâmetros farmacocinéticos em um cenário de poucos recursos humanos e tecnológicos. A utilização da DT é descrita por vários autores como uma solução para essas dificuldades encontradas.

Por outro lado, é amplamente descrita a grande variabilidade individual dos parâmetros farmacocinéticos obtidos em pacientes submetidos a condicionamento com bussulfano oral antes do TCTH. Na literatura, são descritas variabilidade de absorção e de eliminação, particularmente, ocorrendo até cinco vezes entre as doses para o mesmo paciente e até 20 vezes entre pacientes.

No presente trabalho, também observamos essa variabilidade, ocorrendo em um mesmo paciente diferentes comportamentos do fármaco em relação à absorção e, especialmente, à eliminação com o acúmulo de doses administradas. Ficou mais evidente que, a partir do D3, os parâmetros já diferem da DT, em especial, o clearance, ao passo que, no D4, esta alteração já influencia a ASC_T e a $\overline{C_{ss}}$, sendo estas maiores do que as apresentadas na DT.

Deve-se levar em consideração que, na DT, as condições não são as mesmas do condicionamento. Durante a DT, apenas uma dose do medicamento é administrada, não havendo outras drogas utilizadas conjuntamente. No condicionamento, a droga é administrada em esquema de doses múltiplas e outras drogas, como antibacterianos, antifúngicos e antivirais de amplo espectro, analgésicos e antieméticos, são administradas juntamente com o bussulfano.

A DT facilita o início do tratamento com doses ajustadas para o perfil do paciente; entretanto, o acúmulo e a possível interação com outras drogas sugerem a possibilidade de melhora na obtenção dos desfechos clínicos com nova monitoração e intervenção na dose administrada no D3 de tratamento.

Outro fator que poderia minimizar as variações farmacocinéticas é a forma de administração. O bussulfano é comercializado em comprimidos de 2 mg, de modo que os pacientes recebem, em média, de 25 a 40 comprimidos. A quantidade de comprimidos administrada pode influenciar nos processos de dissolução e absorção. Assim, a apresentação em concentrações maiores diminuiria o número de comprimidos administrados e, possivelmente, haveria menos variação na absorção do fármaco. Outra opção seria a manipulação do fármaco por farmácia com o intuito de transformá-lo em solução.

Obtivemos uma amostra pequena, uma vez que temos apenas um centro de realização de TCTH no estado e este conta com limitações nos números de procedimentos relacionados a estado de origem do paciente, doadores

compatíveis, número de leitos e procedimentos administrativos, como importação de kits de transplante.

Iniciamos nossa coleta de dados após a validação do método analítico, em junho de 2010, e encerramos a coleta em função do tempo disponível em junho de 2011. Nesse período, incluímos oito pacientes. Os artigos consultados contam com mais tempo para inclusão de paciente e alguns têm período de coleta entre 5 e 10 anos ou utilizam mais de um centro de monitoração para aumentar o tamanho da amostra.

Este trabalho constitui uma proposta inicial para este tipo de pesquisa, pois apenas recentemente tem sido desenvolvido no Brasil, embora já haja resultados de outros países.

No início deste estudo, entramos em contato com outros dois centros nacionais que também apresentam pesquisas a fim de estruturar os trabalhos de monitoração do bussulfano em seus estados. Os centros são de Ribeirão Preto, no qual uma aluna de doutorado (Francine Attié de Castro) em Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP) desenvolve e aplica metodologia analítica por cromatografia líquida (CL)/EM-EM. Nesses contatos, realizamos troca de experiências sobre o desenvolvimento da metodologia analítica e o centro nos cedeu o PI utilizado neste trabalho, que foi sintetizado por eles.

O Hospital Israelita Albert Einstein também desenvolve trabalhos de MTF com o patrocínio do Instituto Israelita de Responsabilidade Social (ALBERT EINSTEIN, 2011), em parceria com o Ministério da Saúde. Em nosso contato,

houve troca de experiências relacionadas ao desenvolvimento da metodologia analítica e nossa equipe orientou a realização dos cálculos farmacocinéticos para ajuste da dose.

Foi proposto que esses dois centros e o nosso realizem análises estatísticas em conjunto acerca dos desfechos clínicos e de MTF, a fim de aumentar a amostra e obter representação estatística melhor para futuras publicações.

Segundo Slattery e Risler (1998), os custos diretos para a realização da monitoração terapêutica do bussulfano é menos do que 1% do custo do transplante. Assim, considerando que a exposição ao bussulfano é determinante para o sucesso do transplante, o aumento de 1% no custo do procedimento é fundamental para melhores desfechos.

REFERÊNCIAS

ALBERT EINSTEIN. Monitorização de níveis do quimioterápico bussulfano. São Paulo, 2011. Disponível em: <<http://www.einstein.br/Pesquisa/pesquisa-clinica/estudos-clinicos/hematologia/Paginas/monitorizacao-de-niveis-do-quimioterapico-bussulfano.aspx>>. Acesso em: 7 dez. 2011.

ALMEIDA, J. R. C. Principais medicamentos utilizados num serviço de terapia antineoplásica. In: ALMEIDA, J. R. C. *Farmacêuticos em oncologia: uma nova realidade*. São Paulo: Atheneu, 2010. p. 153–383.

APPELBAUM, F. R. Transplante de células hematopoiéticas. In: KASPER, D. L.; BRAUNWALD, E.; FAUCI, A. S.; HAUSER, S. L.; LONGO, D. L.; JAMESON, J. L.; HARRISON, T. R. *Harrison medicina interna*. 16. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. p. 701–707.

BLEYZAC, N.; BAROU, P.; AULAGNER, G. Rapid and sensitive high performance liquid chromatographic method for busulfan assay in plasma. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, Amsterdam, v. 742, no. 2, p. 427–432, 2000.

BORNHÄUSER, M.; STORER, B.; SLATTERY, J. T.; APPELBAUM, F. R.; DEEG, H. J.; HANSEN, J.; MARTIN, P. J.; McDONALD, G. B.; NICHOLS, W. G.; RADICH, J.; WOOLFREY, A.; JENKE, A.; SCHELEYER, E.; THIEDE, C.; EHNINGER, G.; ANASETTI, C. Conditioning with fludarabine and targeted busulfan for transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells. *Blood*, Washington, DC, v. 102, no. 3, p. 820–826, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 2 jun. 2003.

BULLOCK, J. M.; SMITH, P. F.; BOOKER, B. M.; LOUGHNER, J.; CAPOZZI, D.; MCCARTHY JUNIOR, P. L.; SHAW, L. M. Development of a pharmacokinetic and Bayesian optimal sampling model for individualization of oral busulfan in hematopoietic stem cell transplantation. *Therapeutic Drug Monitoring*, New York, v. 28, no. 1, p. 62–66, 2006.

BURNS, R. B.; HEGGIE, J. R.; EMBREE, L. A gas-chromatographic assay method for busulfan with sensitivity for test dose therapeutic monitoring. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Amsterdam, v. 13, no. 9, p. 1073–1078, 1995.

CHAUFFAILLE, M. L. L. F. Leucemia mieloide crônica. In: FIGUEIREDO, M. S.; KERBAUY, J.; LOURENÇO, D. M. *Hematologia*. Guia de medicina ambulatorial e hospitalar da UNIFESP-EPM. Barueri: Manole, 2011. p. 481–493.

CHAUFFAILLE, M. L. L. F.; PINHEIRO, R. F. Síndrome mielodisplásica. In: FIGUEIREDO, M. S.; KERBAUY, J.; LOURENÇO, D. M. *Hematologia*. Guia de medicina ambulatorial e hospitalar da UNIFESP-EPM. Barueri: Manole, 2011. p. 63–69.

CHOW, D. S. L.; BHAGWATWAR, H. P.; PHADUNGPOJNA, S.; ANDERSSON, B. S. Stability-indicating high-performance liquid chromatographic assay of busulfan in aqueous and plasma samples. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, Amsterdam, v. 704, no. 1–2, p. 277–288, 1997.

CIUREA, S. O.; ANDERSSON, B. S. Busulfan in hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, Arlington Heights, v. 15, p. 523–536, 2009.

DEEG, H. J.; STORER, B.; SLATTERY, J. T.; ANASETTI, C.; DONEY, K. C.; HANSEN, J. A.; KIEM, H. P.; MARTIN, P. J.; PETERSDORF, E.; RADICH, J. P.; SANDERS, J. E.; SHULMAN, H. M.; WARREN, E. H.; WITHERSPOON, R. P.; BRYANT, E. M.; CHAUNCEY, T. R.; GELZENDANER, L.; STORB, R.; APPELBAUM, F. R. Conditioning with targeted busulfan and cyclophosphamide for hemopoietic stem cell transplantation from related and unrelated donors in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood*, Washington, DC, v. 100, no. 4, p. 1201–1207, 2002.

DENNING, D.W.; RIBAUD, P.; MILPIED, N.; CAILLOT, D.; HERBRECHT, R.; THIEL, E.; HAAS, A.; RUHNKE, M.; LODE, H.. Efficacy and safety of voriconazole in the treatment of acute invasive aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases*, Chicago, v. 34, no. 5, p. 563–571, 2002.

FUNAKOSHI, K.; YAMASHITA, K.; CHAO, W.; YAMAGUCHI, M.; YASHIKI, T. High performance liquid chromatographic determination of busulfan in human serum with on-line derivatization, column switching and ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, Amsterdam, v. 660, no. 1, p. 200–204, 1994.

GROCHOW, L. B.; JONES, R. J.; BRUNDRETT, R. B.; BRAINE, H. G.; CHEN, T. L.; SARAL, R.; SANTOS, G. W.; COLVIN, O. M. Pharmacokinetics of busulfan: correlation with veno-occlusive disease in patients undergoing bone

marrow transplantation. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, Berlin, v. 25, no. 1, p. 55–61, 1989.

HARA, S.; TSUCHIE, M.; TSUJIOKA, R.; KIMURA, M.; FUJI, M.; KURODA, T.; ONO, N. High-performance liquid chromatographic quantification of busulfan in human serum after fluorescence derivatization by 2-naphthalenethiol. *Analytical Sciences*, Tokyo, v. 16, no. 3, p. 287–291, 2000.

HASSAN, M. The role of busulfan in bone marrow transplantation. *Medical Oncology*, London, v. 16, no. 3, p. 166–176, 1999.

HASSAN, M.; LJUNGMAN, P.; RINGDÉN, O.; HASSAN, Z.; ÖBERG, G.; NILSSON, C.; BÉKASSY, A.; BIELENSTEIN, M.; ABDEL-REHIM, M.; GEORÉN, S.; ASTNER, L. The effect of busulphan on the pharmacokinetics of cyclophosphamide and its 4-hydroxy metabolite: time interval influence on therapeutic efficacy and therapy-related toxicity. *Bone Marrow Transplantation*, Basingstoke, v. 25, no. 9, p. 915–924, 2000.

HEGGIE, J. R.; WU, M.; BURNS, R. B.; NG, C. S.; FUNG, H. C.; KNIGHT, G.; BARNETT, M. J.; SPINELLI, J. J.; EMBREE, L. Validation of a high-performance liquid chromatographic assay method for pharmacokinetic evaluation of busulfan. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, Amsterdam, v. 692, no. 2, p. 437–444, 1997.

JENKE, A.; RENNER, U.; SCHULER, U. S.; WAUER, S.; LEOPOLD, T.; SCHLEYER, E.; EHNINGER, G. Improved assay for determination of busulfan by liquid chromatography using postcolumn photolysis. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and life Sciences*, Amsterdam, v. 805, no. 1, p. 147–153, 2004.

JONES, R. J.; LEE, K. S. K.; BESCHORNER, W. E.; VOGEL, V. G.; GROCHOW, L. B.; BRAINE, H. G.; VOGELSANG, G. B.; SENSENBRENNER, L. L.; SANTOS, G. W.; SARAL, R. Venocclusive disease of the liver following bone marrow transplantation. *Transplantation*, Baltimore, v. 44, no. 6, p. 778–783, 1987.

KELLOGG, M. D.; LAW, T.; SAKAMOTO, M.; RIFAI, N. Tandem mass spectrometry method for the quantification of serum busulfan. *Therapeutic Drug Monitoring*, New York, v. 27, no. 5, p. 625–629, 2005.

LJUNGMAN, P.; DE BOCK, R.; CORDONNIER, C.; EINSELE, H.; ENGELHARD, D.; GRUNDY, J.; LOCASCIULLI, A.; REUSSER, P.; RIBAUD, P. Practices for cytomegalovirus diagnosis, prophylaxis and treatment in allogeneic bone marrow transplant recipients: a report from the Working Party for Infectious Diseases of the EBMT. *Bone Marrow Transplantation*, Basingstoke, v. 12, no. 4, p. 399–403, 1993.

LOSSOS, I. S. ; BREUER, R.; OR, R. ; STRAUSS, N. ; ELISHOOV, H.; NAPARSTEK, E.; AKER, M.; NAGLER, A.; MOSES, A. E.; SHAPIRO, M.; SLAVIN, S.; ENGELHARD, D. Bacterial pneumonia in recipients of bone marrow transplantation. A five-year prospective study. *Transplantation*, Baltimore, v. 60, no. 7, p. 672–678, 1995.

MCCUNE, J. S.; GIBBS, J. P.; SLATTERY, J. T. Plasma concentration monitoring of busulfan: does it improve clinical outcome? *Clinical Pharmacokinetics*, Auckland, v. 39, n. 2, ago, p. 155–165, 2000.

MCDONALD, G. B.; HINDS, M. S.; FISHER, L. D.; SCHOCH, H. G.; WOLFORD, J. L.; BANAJI, M.; HARDIN, B. J.; SHULMAN, H. M.; CLIFT, R. A. Veno-occlusive disease of the liver and multiorgan failure after bone marrow transplantation: a cohort study of 355 pacientes. *Annals of Internal Medicine*, Philadelphia, v. 118, no. 4, p. 255–267, 1993.

MÜRDTER, T. E.; COLLIER, J.; CLAVIEZ, A.; SCHÖNBERGER, F.; HOFMANN, U.; DREGER, P.; SCHWAB, M. Sensitive and rapid quantification of busulfan in small plasma volumes by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, Baltimore, v. 47, no. 8, p. 1437–1442, 2001.

NATH, C. E.; SHAW, P. J. Busulfan in blood and marrow transplantation: dose, route, frequency, and role of therapeutic drug monitoring. *Current Clinical Pharmacology*, v. 2, no. 1, p. 75–91, 2007.

OLIVEIRA, J. S. R. Transplante de medula óssea (TMO). In: FIGUEIREDO, M. S.; KERBAUY, J.; LOURENÇO, D. M. *Hematologia*. Guia de medicina ambulatorial e hospitalar da UNIFESP-EPM. Barueri: Manole, 2011. p. 197–214.

PAP, E.; ERDÉLYI-TÓTH, V.; KRALOVÁNSZKY, J. High performance liquid chromatographic determination of busulfan in plasma. *Chromatographia*, New York, v. 51, no. 1, p. S188–S192, 2000.

PASQUINI, R. Fundamentos e biologia do transplante de células hematopoéticas. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. *Hematologia: fundamentos e prática*. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 913–934.

PATON, E. J. A.; COUTINHO, M. A.; VOLTARELLI, J. C. Diagnóstico e tratamento de complicações agudas do transplante de células progenitoras hematopoéticas. *Medicina*, Ribeirão Preto, v. 33, p. 264–277, 2000. Disponível em: <<http://www.hemocentro.fmrp.usp.br/projeto/artigos/artigol68.pdf>>. Acesso em: 28 dez. 2011.

PELLOSO, L. A. F.; CHAUFFAILLE, M. L. L. F. Leucemia mieloide aguda. In: FIGUEIREDO, M. S.; KERBAUY, J.; LOURENÇO, D. M. *Hematologia*. Guia de medicina ambulatorial e hospitalar da UNIFESP-EPM. Barueri: Manole, 2011. p. 69–480.

PERIS, J. E.; LATORRE, J. A.; CASTEL, V.; VERDEGUER, A.; ESTEVE, S.; TORRES-MOLINA, F. Determination of busulfan in human plasma using high-performance liquid chromatography with pre-column derivatization and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, Amsterdam, v. 730, no. 1, p. 33–40, 1999.

QUERNIN, M. H.; DUVAL, M.; LITALIEN, C.; VILMER, E.; JACQZ-AIGRAIN, E. Quantification of busulfan in plasma by liquid chromatography-ion spray mass spectrometry: application to pharmacokinetic studies in children. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, Amsterdam, v. 763, no. 1–2, p. 61–69, 2001.

QUERNIN, M. H.; POONKUZHALI, B.; MÉDARD, Y.; DENNISON, D.; SRIVASTAVA, A.; KRISHNAMOORTHY, R.; CHANDY, M.; JACQZ-AIGRAIN, E. High-performance liquid chromatographic method for quantification of busulfan in plasma after derivatization by tetrafluorothiophenol. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, Amsterdam, v. 721, no. 1, p. 147–152, 1999.

QUERNIN, M. H.; POONKUZHALI, B.; MONTES, C.; KRISHNAMOORTHY, R.; DENNISON, D.; SRIVASTAVA, A.; VILMER, E.; CHANDY, M.; JACQZ-AIGRAIN, E. Quantification of busulfan in plasma by gas chromatography-mass spectrometry following derivatization with tetrafluorothiophenol. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, Amsterdam, v. 709 no. 1, p. 47–56, 1998.

RAUH, M.; STACHEL, D.; KUHLEN, M.; GRÖSCHL, M.; HOLTER, W.; RASCHER, W. Quantification of busulfan in saliva and plasma in haematopoietic stem cell transplantation in children: validation of liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *Clinical Pharmacokinetics*, Auckland, v. 45, no. 3, p. 305–316, 2006.

REIS, E. O.; VIANNA-JORGE, R.; SUAREZ-KURTZ, G.; LIMA, E. L. S.; AZEVEDO, D. A. Development of a rapid and specific assay for detection of busulfan in human plasma by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Chichester, v. 19, no. 12, p. 1666–1674, 2005.

RIFAI, N.; SAKAMOTO, M.; LAFI, M.; GUINAN, E. Measurement of plasma busulfan concentration by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Therapeutic Drug Monitoring*, New York, v. 19, no. 2, p. 169–174, 1997.

ROTEA JUNIOR, W. Toxicidade dos antineoplásicos. In: ALMEIDA, J. R. C. *Farmacêuticos em oncologia: uma nova realidade*. São Paulo: Atheneu, 2010. p. 137–151.

RUSSELL, J. A.; KANGARLOO, S. B. Therapeutic drug monitoring of busulfan in transplantation. *Current Pharmaceutical Design*, San Francisco, v. 14, no. 20, p. 1936–1949, 2008.

SANTOS, G. W.; TUTSCHKA, P. J.; BROOKMEYER, R.; SARAL, R.; BESCHORNER, W. E.; BIAS, W. B.; BRAINE, H. G.; BURNS, W. H.; ELFENBEIN, G. J.; KAIZER, H.; MELLITS, D.; SENSENBRENNER, L. L.; STUART, R. K.; YEAGER, A. M. Marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia after treatment with busulfan and cyclophosphamide. *New England Journal of Medicine*, Waltham, v. 309, no. 22, p. 1347–1353, 1983.

SHAW, P. J.; SCHARPING, C. E.; BRIAN, R. J.; EARL, J. W. Busulfan pharmacokinetics using a single daily high-dose regimen in children with acute leukemia. *Blood*, Washington, DC, v. 84, no. 7, p. 2357–2362, 1994.

SHULMAN, H. M.; SULLIVAN, K. M.; WEIDEN, P. L.; McDONALD, G. B.; STRIKER, G. E.; SALE, G. E.; HACKMAN, R.; TSOI, M. S.; STORB, R.; THOMAS, E. D. Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *American Journal of Medicine*, New York, v. 69, no. 2, p. 204–217, 1980.

SLATTERY, J. T.; CLIFT, R. A.; BUCKNER, C. D.; RADICH, J.; STORER, B.; BENSINGER, W. I.; SOLL, E.; ANASETTI, C.; BOWDEN, R.; BRYANT, E.; CHAUNCEY, T.; DEEG, H. J.; DONEY, K. C.; FLOWERS, M.; GOOLEY, T.; HANSEN, J. A.; MARTIN, P. J.; McDONALD, G. B.; NASH, R.; PETERSDORF, E. W.; SANDERS, J. E.; SCHOCH, G.; STEWART, P.; STORB, R.; SULLIVAN, K. M.; THOMAS, E. D.; WITHERSPOON, R. P.; APPELBAUM, F. R. Marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: the influence of plasma busulfan levels on the outcome of transplantation. *Blood*, Washington, DC, v. 89, no. 8, p. 3055–3060, 1997.

SLATTERY, J. T.; RISLER, L. J. Therapeutic monitoring of busulfan in hematopoietic stem cell transplantation. *Therapeutic Drug Monitoring*, New York, v. 20, no. 5, p. 543–549, 1998.

SOUZA, M. K.; OLIVEIRA, J. S. R. Comparação entre transplantes aparentados e não aparentados. In: FIGUEIREDO, M. S.; KERBAUY, J.; LOURENÇO, D. M. *Hematologia*. Guia de medicina ambulatorial e hospitalar da UNIFESP-EPM. Barueri: Manole, 2011. p. 215–220.

TABAK, A.; HOFFER, E.; ROWE, J. M.; KRIVROY, N. Monitoring of busulfan area under the curve: estimation by a single measurement. *Therapeutic Drug Monitoring*, New York, v. 23, no. 5, p. 526–528, 2001.

TAKAMATSU, Y.; OGATA, K.; YAMAUCHI, K.; HARA, S.; KAMIMURA, T.; HAYASHI, S.; SUZUMIYA, J.; TAMURA, K. An evaluation of busulfan pharmacokinetics in patients undergoing hematopoietic stem cell

transplantation. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, Tokyo, v. 35, no. 7, p. 400–403, 2005.

TAKAMATSU, Y.; SASAKI, N.; ETO, T.; NAGAFUJI, K.; ABE, Y.; CHOI, I.; OGATA, K.; HARA, S.; SUZUMIYA, J.; TAMURA, K. Individual dose adjustment of oral busulfan using a test dose in hematopoietic stem cell transplantation. *International Journal of Hematology*, Tokyo, v. 86, no. 3, p. 261–268, 2007.

TOZER, T. N.; ROWLAND, M. *Introdução à farmacocinética e à farmacodinâmica*. As bases quantitativas da terapia farmacológica. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TRAN, H.T.; MADDEN, T.; PETROPOULOS, D.; WORTH, L. L.; FELIX, E. A.; SPRIGG-SAENZ, H. A.; CHOROSZY, M.; DANIELSON, M.; PRZEPIORKA, D.; CHAN, K. W. Individualizing high-dose oral busulfan: prospective dose adjustment in a pediatric population undergoing allogeneic stem cell transplantation for advanced hematologic malignancies. *Bone Marrow Transplantation*, Basingstoke, v. 26, no. 5, p. 463–470, 2000.

TUTSCHKA, P. J.; COPELAN, E. A.; KLEIN, J. P. Bone marrow transplantation for leukemia following a new busulfan and cyclophosphamide regimen. *Blood*, Washington, DC, v. 70, no. 5, p. 1382–1388, 1987.

WETZLER, M.; BYRD, J. C.; BLOOMFIELD, C. D. Leucemia mielóide aguda e crônica. In: KASPER, D. L.; BRAUNWALD, E.; FAUCI, A. S.; HAUSER, S. L.; LONGO, D. L.; JAMESON, J. L.; HARRISON, T. R. *Harrison medicina interna*. 16. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. p. 663–673.