

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Francine Attié de Castro

Enantiosseletividade na disposição cinética e no metabolismo da ciclofosfamida e ajuste de dose do bussulfano em pacientes submetidos a transplante de células tronco hematopoéticas

Ribeirão Preto

-2013-

RESUMO

DE CASTRO, F.A. **Enantioseletividade na disposição cinética e no metabolismo da ciclofosfamida e ajuste de dose do bussulfano em pacientes submetidos a transplante de células tronco hematopoéticas**. 2013. 174 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013

O bussulfano (BU) e a ciclofosfamida (CY) são fármacos utilizados nos regimes de condicionamento pré-transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH). O BU apresenta estreito intervalo terapêutico, alta variabilidade interindividual na farmacocinética e graves reações adversas. O presente estudo avaliou a administração de uma dose teste de BU oral para a individualização do regime de dosagem, definiu o melhor tempo de coletas esparsas para o monitoramento terapêutico do BU e validou um algoritmo baseado em modelo compartimental e farmacocinética populacional em pacientes submetidos ao TCTH. Trinta pacientes portadores de doenças hematológicas tiveram o tratamento com BU individualizado baseado em uma dose teste oral de 0,25 mg/Kg de BU. As doses foram baseadas no clearance aparente calculado na dose teste e as concentrações plasmáticas foram confirmadas após a quinta dose de tratamento. Os coeficientes de variação obtidos entre os valores de clearance avaliados na dose teste e na quinta dose foram $\leq 30\%$, exceto para 5 pacientes. Não foram observadas associação entre os parâmetros farmacocinéticos do BU e a evolução clínica dos pacientes. Com a finalidade de estimar os melhores tempos de coletas ideais para aplicação no monitoramento terapêutico do BU, um modelo farmacocinética populacional foi utilizado e um esquema de coletas esparsas com não mais de cinco amostras por paciente (t = 0,5; 2,25; 3; 4 e 5 horas após a dose) demonstrou ser suficiente para a caracterização da farmacocinética do BU. O presente estudo avaliou também a farmacocinética dos enantiômeros da ciclofosfamida (CY) e seus metabólitos (4-hidroxíciclofosfamida e carboxíciclofosfamida), em pacientes submetidos ao TCTH. Foram investigados pacientes portadores de esclerose sistêmica (n=10) e esclerose múltipla (n=10) em regime de condicionamento com 50 mg CY /kg/dia durante 4 dias. Dois ensaios específicos baseados na análise por LC-MS/MS foram desenvolvidos e validados para analisar os enantiômeros da CY e seus metabólito 4-hidroxíciclofosfamida (HCY) e carboxíciclofosfamida (CEPM) em plasma humano. Os parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros da CY e seus metabólitos foram calculados empregando o programa WinNonlin e mostraram acúmulo plasmático dos enantiômeros (S)-(-)-CY (AUC 215,0 vs 186,2 $\mu\text{g.h/mL}$ para os paciente EM e 219,1 vs 179,2 $\mu\text{g.h/mL}$ para os

paciente ES) e HCY (1), provavelmente o (R)-(+)-HCY (AUC 5,6 vs 3,7 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ para os paciente EM e 6,3 vs 5,6 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ para os paciente ES) em ambos os grupos de pacientes investigados. A disposição cinética do metabólito CEPM não mostrou enantiosseletividade. A farmacocinética da CY e seus metabólitos HCY e CEPM não diferiu entre os pacientes portadores de EM ou ES. Não foi observado correlação entre o metabolismo da CY e os genótipos avaliados (CYP2B6 e CYP2C9). Não foi possível correlacionar os valores de $\text{AUC}_{0-\infty}$ dos enantiômeros da CY e/ou dos metabólitos HCY e CEPM com a toxicidade ao uso de CY em virtude do pequeno número de pacientes investigados.

Palavras-Chave: Bussulfano; Ciclofosfamida; Metabolismo; Farmacocinética; Transplante de Células Tronco Hematopoéticas

INTRODUÇÃO

O Transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH) é uma modalidade terapêutica que envolve a transferência da célula primordial hematopoética pluripotencial, do doador para o receptor e que, sob a influência de um microambiente adequado, é capaz de regenerar todos os elementos celulares sanguíneos, normalmente derivados da medula óssea, além do sistema linfóide (COURI; DE OLIVEIRA; SIMÕES, 2012; LIU et al., 2010).

Os pacientes considerados para o TCTH devem ter uma doença, na qual as opções de terapêutica convencional resultem em sobrevida livre de doença nitidamente menor do que aquela esperada no transplante, consideradas as condições particulares do paciente (BOUZAS, 2000).

As principais etapas do TCTH consistem em: mobilização e coleta da medula óssea ou células tronco do doador; condicionamento do receptor com quimioterapia e/ou radioterapia; pega e recuperação medular no receptor. Quando um paciente é selecionado para fazer o TCTH, após a identificação do doador, o paciente é então, hospitalizado em isolamento e preparado ou condicionado para o transplante com quimioterapia em altas doses associada ou não à radioterapia (DELANEY; BALLEEN, 2013; PATON; COUTINHO; VOLTARELLI, 2000).

O regime de condicionamento clássico provoca mieloablação, o que permite criar espaço na cavidade da medula óssea, induz a imunossupressão e trata a doença residual. Deste modo, permite a enxertia das células tronco hematopoéticas transplantadas, que são responsáveis pela reconstituição da hematopoese, que começa a se revelar no sangue periférico de duas a quatro semanas após a infusão das células, período este caracterizado por intensa aplasia medular e pancitopenia periférica. Em doenças autoimunes e algumas deficiências imunológicas, apenas a imunossupressão é necessária para o sucesso do transplante (BOWEN et al., 2013; STRACIERI, 2000).

O TCTH é empregado clinicamente para a terapia de uma grande variedade de doenças congênitas e adquiridas, neoplásica e não neoplásicas, como, por exemplo, as incluídas na Tabela 1.

Tabela 1. Algumas doenças tratadas com TCTH

DOENÇAS NEOPLÁSICAS	DOENÇAS NÃO NEOPLÁSICAS
Leucemias	Falências medulares adquiridas
Leucemia mielóide aguda	Anemia aplástica grave
Leucemia linfóide aguda	Hemoglobinúria paroxística noturna
Leucemia mielóide crônica	
Leucemia linfóide crônica	Falências medulares hereditárias
Síndromes mielodisplásicas (SMD)	
Leucemias e SMD secundárias	Anemia de Fanconi
	Síndrome de Diamond-Blackfan
	Agranulocitose de Kostmann
Doenças linfoproliferativas	Histocitose eritrofagocítica familiar
Linfoma de Hodgkin	Disceratose congênita
Linfomas não-Hodgkin	Síndrome de Scwachman-Diamond
Mieloma Múltiplo	
	Hemoglobinopatias
	Talassemia maior
	Anemia falciforme
	Deficiências imunológicas
	Imunodeficiência combinada grave
	Síndrome de Wiskott-Aldrich
	Doença granulomatosa crônica infantil
	Doenças auto-imunes
	Artrite reumatóide
	Esclerose múltipla
	Esclerose sistêmica
	Lupus eritematoso sistêmico
	Doença de Crohn
	Diabetes mellitus
	Erros inatos do metabolismo
	Doença de Gaucher
	Síndrome de Hunter

Adaptado de PATON et. al., 2000

Diferentemente do TCTH para doenças onco-hematológicas, no tratamento de doenças autoimunes o TCTH autólogo (que utiliza células tronco periféricas retiradas do próprio paciente e que são reinfundidas após o regime de condicionamento) parte do princípio de que a doença possa ser corrigida pela regeneração de um novo sistema imune, a partir de células tronco hematopoéticas não comprometidas imunologicamente com o estímulo da doença desencadeante. Conceitualmente, a doença deve ter sido desencadeada pelo surgimento de uma resposta imune alterada frente a um agente ambiental que, muito provavelmente, não está mais presente. A regeneração de um sistema imunológico “virgem” e tolerante aos auto-antígenos faria com que a resposta anormal desaparecesse. O procedimento funcionaria como um novo início para o sistema imunológico. O papel das células tronco hematopoéticas é o de reconstituir o sistema linfo-hematopoético, destruído pelos quimioterápicos. Com essa abordagem, as células do sistema imune são regeneradas a partir de células tronco hematopoéticas autólogas, não havendo risco de desenvolvimento da doença do enxerto contra o hospedeiro (BURT et al., 2004; HOMSI, 2006)

De modo geral, durante os regimes de condicionamento pré-TCTH, seja para o tratamento de doenças onco-hematológicas ou para o tratamento de doenças autoimunes, os pacientes são submetidos à administração de altas doses de agentes quimioterápicos. Dentre os agentes utilizados no regime de condicionamento pré TCTH alogênico, destaca-se o bussulfano e a ciclofosfamida, focos deste estudo.

CAPÍTULO I

**Validação de dose teste oral do
bussulfano empregando
farmacocinética individual e
populacional em pacientes
submetidos ao transplante de
células tronco hematopoéticas**

Resumo

O bussulfano (BU), agente mielossupressor presente nos regimes de condicionamento pré-transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH), apresenta estreito intervalo terapêutico, alta variabilidade interindividual na farmacocinética e graves reações adversas, dentre elas a síndrome obstrutiva sinusoidal. O regime de dosagem do BU associado com eficácia e minimização de reações adversas deve atingir concentrações plasmáticas médias no estado de equilíbrio (C^{ss}) de 600 a 900 ng/mL. O presente estudo avaliou a administração de uma dose teste de BU oral para a individualização do regime de dosagem, definiu o melhor tempo de coletas esparsas para o monitoramento terapêutico do BU e validou um algoritmo baseado em modelo compartimental e farmacocinética populacional em pacientes submetidos ao TCTH. Foram investigados 30 pacientes portadores de doenças hematológicas com idade de 3-58 anos. No dia anterior ao início do regime de condicionamento, após a administração de dose única oral de 0,25 mg/Kg de BU, foram coletadas amostras seriadas de sangue no período de 0-6h. O BU foi quantificado nas amostras de plasma empregando LC-MS/MS. A resposta do detector foi linear no intervalo de concentrações plasmáticas de 5-2500 ng/mL ($r > 0,99$), com corridas cromatográficas de 3 min. Para a confirmação da C^{ss} , foram realizadas coletas seriadas de sangue no intervalo entre a 5ª e 6ª doses administradas (~1mg/Kg a cada 6 h, durante 4 dias). A análise farmacocinética foi realizada com auxílio do programa WinNonlin. O emprego da dose teste de BU em 30 pacientes resultou em valores de *clearance* variando de 3,2-29,9 L/h. Os valores de *clearance* observados entre a 5ª e 6ª doses variaram de 2,9-18,6 L/h. Os coeficientes de variação obtidos entre os valores de *clearance* avaliados na dose teste e na quinta dose foram $\leq 30\%$, exceto para 5 pacientes. Ressalta-se, alta variabilidade nos valores de *clearance* entre os pacientes tanto durante o uso da dose teste (CV 42,1%) quanto no intervalo entre a 5ª e 6ª doses (CV 33,0%). Dentre os 21 pacientes que receberam a dose de BU de acordo com a dose baseada no *clearance* calculado na dose teste, 67% apresentaram concentrações no estado de equilíbrio (entre a 5ª e 6ª doses) dentro do intervalo de concentrações alvo de 600-900 ng/mL e 33% dos pacientes apresentaram concentrações pouco acima do intervalo terapêutico. Em relação aos 9 pacientes que não receberam as doses de BU de acordo com os valores de *clearance* calculados na dose teste, apenas 33% deles mostraram valores de C^{ss} dentro do intervalo de concentrações alvo de 600-900 ng/mL, 55% deles apresentaram concentrações acima de 900 ng/mL e apenas 1 paciente apresentou concentração abaixo de 600 ng/mL. Não foram observadas associação entre os parâmetros farmacocinéticos do BU e a evolução clínica dos pacientes.

A otimização do esquema de coletas de amostras de sangue e o desenvolvimento do algoritmo para o ajuste de dosagem do BU foram realizados com base em um modelo previamente publicado considerando farmacocinética de primeira ordem e modelo monocompartimental. Os procedimentos de validação interna e externa do modelo farmacocinético populacional foram realizados usando o programa computacional PopED (*Population Experimental Design*) versão 2.1. com o critério ED (*ED-optimality*) para a otimização do desenho experimental. O *clearance* aparente e o volume de distribuição aparente foram considerados como parâmetros de interesse. O esquema de coletas esparsas para o monitoramento terapêutico do BU e o algoritmo baseado em farmacocinética populacional foram selecionados com base nos desvios dos valores de área sob a curva concentração plasmática do BU vs tempo no intervalo de dose (AUC^{0-6}) previstos à partir de cenários de simulações. O esquema de coletas esparsas com não mais de cinco amostras por paciente ($t = 0,5; 2,25; 3; 4$ e 5 horas após a dose) demonstrou ser suficiente para a caracterização da farmacocinética do BU. A exposição ao BU oral foi descrita com precisão empregando o modelo monocompartimental com as covariáveis peso ideal ajustado e valores séricos de alanina transferase. Os resultados mostram uma correlação linear entre a eliminação do fármaco traduzida pelos valores de *clearance* aparente com o peso ideal ajustado do paciente e a função hepática. O uso do algoritmo baseado em modelo paramétrico de dosagem contribui para a melhoria considerável do perfil de segurança e eficácia dos pacientes submetidos ao tratamento com BU para o TCTH.

1. Introdução

O bussulfano (BU) é um agente alquilante bifuncional, muito utilizado nos regimes de condicionamento para o transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH), no tratamento de leucemias, mieloma múltiplo, linfomas não-Hodgkin, entre outras doenças (GALAUP; PACI, 2013).

Nos regimes de condicionamento para o TCTH, o tratamento preconizado com BU consiste em 16 doses de 1 mg/Kg, administradas oralmente ou, 0,8 mg/Kg na forma endovenosa, de 6 em 6 horas, durante 4 dias ou em dose única diária endovenosa de 3,2 mg/kg durante 4 dias (ANDERSSON et al., 2002; MALÄR et al., 2011; MCCUNE; GIBBS; SLATTERY, 2000; RUSSELL et al., 2002; TRAME et al., 2011).

Estudos da farmacocinética do BU oral (doses de 1 mg/Kg) em pacientes com doenças onco-hematológicas mostram que a concentração plasmática máxima (C_{max}) varia de 609 ± 225 a 1730 ± 845 ng/mL e que o tempo para a observação do C_{max} (t_{max}) ocorre em aproximadamente 1,5 a 2,5 horas. A meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) do BU é de 2,3 a 2,8 horas. O BU atravessa a barreira hematoencefálica e se distribui no fluido cérebro-espinhal, com aproximadamente a mesma concentração presente no plasma, o que talvez explique as crises convulsivas dos pacientes (CIUREA; ANDERSSON, 2009; MCCUNE; GIBBS; SLATTERY, 2000).

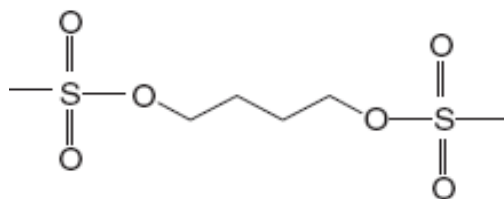


Figura 1. Estrutura química do bussulfano (CHOW et al., 1997)

O BU é metabolizado pela conjugação com a glutatona mediada pela glutatona-S-transferase (GST) seguida por oxidação pelo CYP3A4 (BERI et al., 2010; JOHNSON-DAVIS et al., 2010; MCCUNE; GIBBS; SLATTERY, 2000; NATH; SHAW, 2007; NATH et al., 2008). Os principais metabólitos do BU são o 3-hidroxi sulfolano e o 1-óxido de tetra hidrotiofeno, os quais não contribuem significativamente na eficácia ou na toxicidade do fármaco (MCCUNE; GIBBS; SLATTERY, 2000). Em humanos, a isoforma GSTA1 é a principal responsável pela conjugação da glutatona com o BU (80-90%), embora outras isoformas (GSTM1-1, GSTP1-1, GSTA1-2 e GSTA2-2) também sejam capazes, ainda que em menor extensão de catalisar esta reação (CZERWINSKI; GIBBS; SLATTERY, 1996). Autores sugerem que os polimorfismos nos genes GSTA1, GSTM1 ou GSTP1, que são genes

que codificam as GST α , GST μ e GST ρ , respectivamente, poderiam também influenciar a farmacocinética do BU (JOHNSON et al., 2008; KIM et al., 2011; NATH et al., 2008).

A farmacocinética do BU apresenta grande variabilidade interpacientes. A absorção intestinal do BU pode ocorrer de forma errática e sua alta concentração plasmática pode ser tóxica e causar graves alterações no organismo dos pacientes em regime de condicionamento, além de aumentar o índice de mortalidade. Porém, sua baixa concentração plasmática pode levar à recidiva da doença e rejeição do enxerto (GEDDES et al., 2008; TAKAMATSU et al., 2005).

Na tentativa de reduzir a variabilidade da exposição ao BU, foram desenvolvidas formulações endovenosas, as quais foram disponibilizadas no Brasil a partir de março de 2012. Geddes et al. (2008) observaram redução na variabilidade na farmacocinética do BU endovenoso quando comparada ao BU oral. Porém, Nath et al. (2008) relatam que a variação na farmacocinética do BU oral é comparável com a do BU endovenoso. Mais recentemente, alguns autores relatam que considerável variabilidade inter-individual na farmacocinética do BU endovenoso persiste em adultos e, em um grau ainda maior, em crianças, reforçando a necessidade do monitoramento terapêutico do BU mesmo durante a utilização de sua formulação endovenosa (BARTELINK et al., 2009, 2012).

O BU é um fármaco de estreito intervalo terapêutico, 600 a 900 ng/mL, concentrações plasmáticas que resultam no sucesso do transplante em 74 a 96% dos pacientes (GEDDES et al., 2008; MCCUNE; GIBBS; SLATTERY, 2000). A alta exposição ao BU está relacionada à síndrome obstrutiva sinusoidal (SOS), enquanto a sua baixa exposição está atribuída à recaída da doença e rejeição do enxerto (GALAUP; PACI, 2013; GEDDES et al., 2008; KIM et al., 2009; NATH et al., 2008; REZVANI et al., 2013; TAKAMATSU et al., 2005). A relação entre a concentração plasmática média no estado de equilíbrio (C^{ss}) do BU e a manifestação da SOS mostra maiores valores de C^{ss} nos pacientes que desenvolvem SOS, quando comparados aos pacientes que não apresentam esta reação adversa (MCCUNE; GIBBS; SLATTERY, 2000; TRAME et al., 2011). Dentre as possíveis complicações inerentes aos altos valores de C^{ss} do BU, além da SOS, podem-se destacar as alterações gastrointestinais, crises convulsivas, cardiotoxicidade, lesões pulmonares, cutâneas e hepáticas (PERKINS et al., 2012).

A confirmação da associação entre a C^{ss} do BU e a resposta clínica dos pacientes submetidos ao TCTH incentivou a utilização da monitorização terapêutica (CIUREA; ANDERSSON, 2009; MCCUNE et al., 2012).

Devido a necessidade de rápidas determinações das concentrações plasmáticas do BU, além das dificuldades em estimar seu *clearance* durante o monitoramento terapêutico, na tentativa de controlar a variabilidade da farmacocinética do BU e sua toxicidade, Bleyzac et al. (2001) instituíram um esquema de utilização de uma dose teste de BU (0,5 mg/Kg) com a finalidade de ajustar as doses do condicionamento com base nos valores de *clearance* obtidos a partir da dose teste. Os autores observaram correlação entre os valores esperados e observados de AUC do BU e, portanto, a viabilidade do uso de doses testes como individualização terapêutica. Lindley et al. (2004) relatam que a individualização do regime de dosagem do BU com base nos valores de *clearance* avaliados na dose teste de 0,25 mg/kg ou durante a primeira dose do tratamento (1 mg/kg) resulta em melhores estimativas do que o estabelecimento do regime de dosagem apenas com base no peso corporal. No entanto, os autores ressaltam que a ampla variabilidade intraindividual na farmacocinética do BU administrado por via oral exige a monitorização terapêutica durante todo o tratamento.

Com o desenvolvimento da formulação endovenosa, Kletzel; Jacobsohn; Duerst (2006) propuseram o uso da dose teste de BU endovenoso e o tratamento com dose única diária durante 4 dias. Em um estudo também com BU endovenoso, Beri et al. (2010) observaram significativa correlação entre a AUC do BU obtida na primeira dose e nas subseqüentes dosagens, em pacientes que haviam recebido dose teste de BU.

O uso da dose teste de BU está bem descrito quando administrada como BU endovenoso, porém dados com o BU oral são escassos e de extrema importância considerando a baixa acessibilidade do Brasil à sua formulação endovenosa, devido ao alto custo do medicamento.

Além disso, o monitoramento terapêutico convencional para quimioterápicos está limitado pela variabilidade inter e intraindividual (MCCUNE; HOLMBERG, 2009). Dessa forma, atualmente, muitos centros utilizam modelos de farmacocinética populacional (popPK). Estes modelos de popPK apresentam muitas vantagens em relação aos métodos tradicionais, pois apresentam potencial para individualização e simulação de regimes de dosagem de fármacos sob diferentes condições, como por exemplo, em estados de doenças, na combinação de medicamentos, entre outros fatores. Os modelos de popPK quantificam a variabilidade inter e intraindividual, processo crucial para se obter uma descrição precisa de um paciente dentro de uma população (JOERGER, 2012).

Já existem modelos de popPK para o BU oral e endovenoso descritos na literatura (NGUYEN, 2008; SANDSTRÖM et al., 2001; TRAME et al., 2011) porém, os tempos de coleta de amostras de sangue necessárias para o monitoramento terapêutico, até os dias atuais, não estão definidos (MCCUNE et al., 2012). Dessa forma, o presente trabalho avaliou a

viabilidade e segurança da utilização da dose teste de BU oral como forma de individualização terapêutica e propôs a definição de um esquema de coletas ideal para amostragem farmacocinética e monitoramento terapêutico, além do desenvolvimento de um algoritmo de dosagem baseado em modelo para BU oral em pacientes submetidos ao TCTH.

6. Conclusões

1. O método de análise de BU em plasma foi desenvolvido e validado empregando LC-MS/MS e seus limites de confiança são concordantes com a aplicação em monitoramento terapêutico;

2. A farmacocinética do BU exibiu alta variabilidade intra e interindividual, a qual deve estar relacionada a diversos fatores, dentre eles as interações medicamentosas;

3. Não foram observadas significâncias estatísticas nos testes de associação entre os parâmetros farmacocinéticos do BU e os polimorfismos da GSTA1, GSTP1 e GSTM1. Também não foram observadas significâncias estatísticas nos testes de associação entre os valores de C^{ss} do BU e a evolução clínica;

4. Considerando a alta variabilidade intra e interindividual no *clearance* aparente do BU, o uso da dose teste de BU oral como forma de individualização terapêutica auxilia no tratamento, porém não é suficiente para substituir a monitorização terapêutica durante o condicionamento pré-TCTH;

5. O uso do método de coletas esparsas associado a utilização do modelo de farmacocinética populacional e cálculos de farmacocinética compartimental, contribui para viabilizar a monitorização terapêutica do BU nos centros de TCTH, tornando-o um exame de rotina, facilitando o tratamento, reduzindo o índice de mortalidade e favorecendo a evolução clínica dos pacientes.

CAPÍTULO II

**Enantiosseletividade na disposição
cinética e no metabolismo da
ciclofosfamida em pacientes
portadores de esclerose múltipla ou
esclerose sistêmica submetidos a
transplante de células tronco
hematopoéticas**

Resumo

Considerando a relevância clínica da utilização da ciclofosfamida (CY) no condicionamento pré-transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH), o presente estudo avaliou a farmacocinética da CY e seus principais metabólitos (4-hidroxíciclofosfamida e carboxíciclofosfamida) em pacientes portadores de doenças inflamatórias, esclerose sistêmica (n=10) ou esclerose múltipla (EM), submetidos ao TCTH em regime de condicionamento com 50 mg CY /kg/dia durante 4 dias. Foram coletadas amostras seriadas de sangue até 24 horas após a administração da última dose de CY. Os pacientes foram genotipados para as variantes alélicas do CYP2C9*2 e CYP2C9*3 e do polimorfismo G516T do CYP2B6. Dois ensaios específicos baseados na análise por LC-MS/MS foram desenvolvidos e validados para analisar os enantiômeros da CY e seus metabólito 4-hidroxíciclofosfamida (HCY) e carboxíciclofosfamida (CEPM) em plasma humano. A resposta do detector foi linear no intervalo de concentrações plasmáticas 5-2500 ng de cada enantiômero de HCY/mL plasma ($r > 0,99$), com corridas cromatográficas de 15 minutos. A linearidade para as análises dos enantiômeros da CY foi de 50 ng a 25µg de cada enantiômero/mL de plasma e para as análises dos enantiômeros do CEPM foi de 25 a 2500 ng de cada enantiômero /mL de plasma. Os parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros da CY e seus metabólitos foram calculados empregando o programa *WinNonlin* e mostraram acúmulo plasmático dos enantiômeros (S)-(-)-CY (AUC 215,0 vs 186,2 µg.h/mL para os paciente EM e 219,1 vs 179,2 µg.h/mL para os paciente ES) e HCY (1), provavelmente o (R)-(+)-HCY (AUC 5,6 vs 3,7 µg.h/mL para os paciente EM e 6,3 vs 5,6 µg.h/mL para os paciente ES) em ambos os grupos de pacientes investigados. A disposição cinética do metabólito CEPM não mostrou enantiosseletividade. A farmacocinética da CY e seus metabólitos HCY e CEPM não diferiu entre os pacientes portadores de EM ou ES. Não foi observado correlação entre o metabolismo da CY e os genótipos avaliados (CYP2B6 e CYP2C9). Não foi possível correlacionar os valores de $AUC^{0-\infty}$ dos enantiômeros da CY e/ou dos metabólitos HCY e CEPM com a toxicidade ao uso de CY em virtude do pequeno número de pacientes investigados.

1. Introdução

A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória crônica e desmielinizante do sistema nervoso central (SNC). A EM é uma doença autoimune mediada por células T que infiltram no SNC através de pequenos vasos e provocam a cascata imunológica, que por sua vez, induz eventos inflamatórios e imunes. É tipicamente caracterizada por episódios recorrentes de disfunção neurológica que refletem as alterações imunológicas. A estes períodos de surtos da doença intercalam-se períodos de graus variáveis de remissão clínica. Os sintomas neurológicos na apresentação clínica da doença são manifestações das reações inflamatórias e, em última análise, o reflexo da agressão degenerativa das áreas desmielinizadas em sistemas neurológicos funcionais variados. O tratamento da EM inclui imunomoduladores, corticóide e imunossupressores. Entretanto, alguns pacientes não respondem ao tratamento e necessitam de práticas terapêuticas alternativas. Há estudos publicados desde 1990 apresentando modelos animais e considerações teóricas sobre o TCTH para prevenção e tratamento da EM. Alguns dados clínicos sugerem que altas doses de quimioterapia seguidas de resgate de células tronco hematopoéticas poderiam *resetar* o distúrbio imunológico. Desde o primeiro transplante relatado por Fassas et al., em 1997, mais de 300 TCTHs foram realizados em pacientes com EM no mundo todo (HAMERSCHALK et al., 2010; NOSEWORTHY, 2000; POSER, 1983).

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença multissistêmica crônica, autoimune e caracterizada pela fibrose progressiva da pele e dos órgãos internos. A ES exibe três características fundamentais: inflamação e autoimunidade, vasculopatia e excessiva produção e depósito de matriz extracelular. Na ES, as manifestações cutâneas e dos órgãos, são em geral lentamente progressivas e cronicamente incapacitantes. Entretanto, em alguns pacientes, pode ser rapidamente progressiva e fatal, devido ao envolvimento de órgãos, e ocorrência de pneumonia intersticial, arritmia e insuficiência renal. O TCTH tem sido indicado para pacientes com doenças autoimunes, resultando em grande sucesso, particularmente em portadores de ES (BOHGAKI et al., 2009).

A ciclofosfamida (CY) é um agente alquilante da classe das oxazafosforinas, amplamente utilizada no tratamento de múltiplas formas de câncer e de doenças autoimunes em adultos e crianças (BODDY, 2000). Os agentes alquilantes representam uma classe de moléculas citotóxicas, que possuem em comum a habilidade de se tornarem compostos eletrofilicos fortes, que formam ligações covalentes com os grupos do DNA (GERMANAS, J & PANDYA, 2002).

A CY muito utilizada em altas doses nos regimes de condicionamento pré TCTH, causa considerável toxicidade, particularmente ao sistema hepático: destruição de células

endoteliais, deposição de matriz extracelular nos sinusóides e necrose dos hepatócitos (síndrome obstrutiva sinusoidal). As conseqüências clínicas desta lesão hepática incluem icterícia, hepatomegalia, hipertensão portal, ascite, retenção renal de sódio e lesão renal aguda (MCCUNE et al., 2009).

A cistite hemorrágica é uma reação adversa também bastante conhecida e a mais frequente em pacientes que fazem uso de CY. Esta desordem é caracterizada pela inflamação da parede da bexiga com subsequente hemorragia, o que talvez seja devido à presença do metabólito acroleína, o qual interage com as células uroepiteliais. Outros efeitos tóxicos também muito conhecidos são pneumonite intersticial e insuficiência da excreção líquida, além de possuir potencial carcinogênico e teratogênico (DE JONGE; HUITEMA; TUKKER; et al., 2005; GERMANAS, J & PANDYA, 2002).

A CY é um pró-fármaco metabolizado a produtos ativos e inativos. Aproximadamente 70-80% da dose de CY é ativada para 4-hidroxíciclofosfamida, a qual se encontra em equilíbrio com seu tautômero aldofosfamida. A bioativação da CY depende principalmente do CYP2B6 (aproximadamente 45%), CYP3A4 (aproximadamente 25%) e do CYP2C9 (aproximadamente 12%) e em menor extensão do CYP2A6, CYP2C8 e CYP2C19. A 4-hidroxíciclofosfamida (HCY) e aldofosfamida (normalmente não distinguidas nas análises usuais) difundem para dentro das células e espontaneamente são decompostas em mustarda de fosforamida, o metabólito citotóxico ativo, e acroleína, a qual é tóxica para a maioria das células. Considerando que a HCY funciona como uma molécula de transporte do metabólito citotóxico para dentro das células, a concentração sistêmica de HCY reflete o estado de ativação intracelular da CY. Alternativamente, a HCY e a aldofosfamida podem ser inativadas com formação, respectivamente, de 4-cetociclofosfamida e carboxifosfamida (CEPM). A formação de CEPM é dependente da atividade da aldeído desidrogenase citossólica ALDH1. Outra via de inativação da CY envolve a oxidação da cadeia lateral pelo CYP3A4 e CYP3A5 com formação de N-descloroetilciclofosfamida e cloroacetaldeído, uma via que representa menos que 5% da eliminação total de ciclofosfamida (DE JONGE; HUITEMA; TUKKER; et al., 2005; ZHANG et al., 2006).

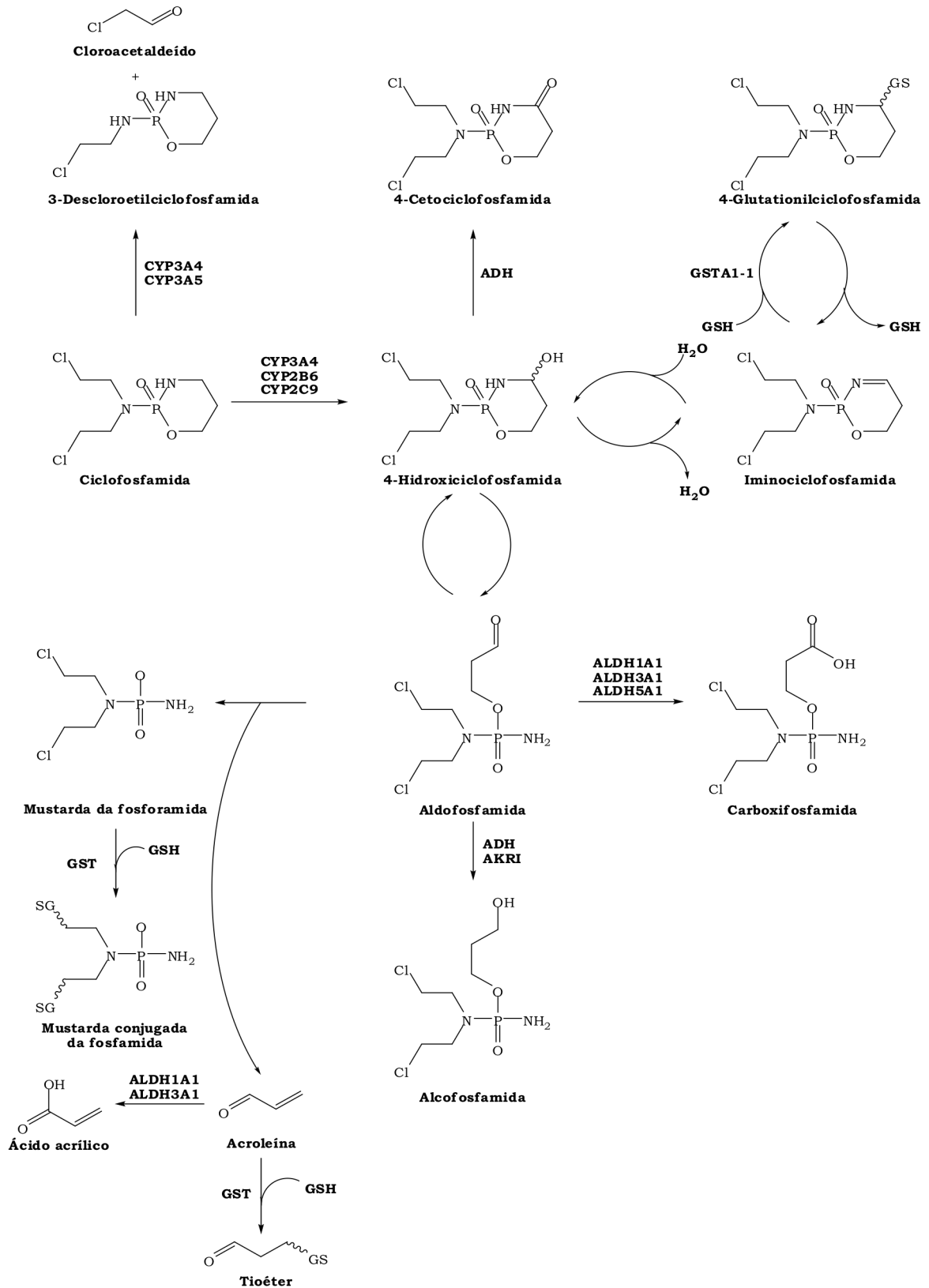


Figura 22. Metabolismo da ciclofosfamida (adaptado de ZHANG et al., 2006)

O metabolismo da CY exibe alta variabilidade entre os pacientes com observações de alterações no equilíbrio entre as reações de ativação e inativação. As enzimas envolvidas nas reações de ativação (CYP) e inativação (ALDH e GST) da CY exibem polimorfismo genético e são pelo menos parcialmente responsáveis pela alta variabilidade interindividual nos efeitos clínicos (PINTO et al., 2009).

O impacto das variantes alélicas do CYP2B6 no metabolismo da CY foi investigado em 29 pacientes caucasianos com doenças hematológicas (XIE et al., 2006). Os pacientes com a mutação CYP2B6 G516T (n=8) mostraram capacidade de 4-hidroxilação da CY duas vezes maior do que nos pacientes com os alelos selvagens CYP2B6. Todas as variantes alélicas CYP2B6*6, CYP2B6*7, CYP2B6*9, CYP2B6*19, CYP2B6*29 apresentam a mutação G516T. Em pacientes com glomerulonefrite tratados com CY, Joy et al. (2012) relatam a influência do polimorfismo CYP2B6*9 na farmacocinética da CY e do HCY, onde os pacientes com a variante alélica apresentaram aumento da constante de velocidade de eliminação e menores valores de C_{max} da CY quando comparados com os alelos selvagens. Por lado, Helsby et al. (2010) reportam baixa capacidade de ativação da CY em pacientes com nefrite lúpica genotipados como CYP2C19*2, CYP2C19*3 ou CYP2B6*5.

A formação do metabólito HCY avaliada em 51 crianças por Raccor et al. (2012) não mostrou associação entre o genótipo CYP2B6 e o *clearance* da CY ou a razão metabólica HCY/CY, atribuindo esses resultados devido principalmente a participação das isoformas CYP3A4/5 no metabolismo da CY.

A CY é um potente indutor das enzimas microsossomais, além de induzir seu próprio metabolismo depois de repetidas administrações, dentro de um período de diversos dias consecutivos. A auto-indução é detectável dentro de 24 horas após o início do tratamento e resulta em aproximadamente numa diminuição de 2 vezes no valor da $t_{1/2}$ da CY (DE JONGE; HUITEMA; VAN DAM; et al., 2005). A associação de fármacos como glucocorticóides, ondansetrona, rifampicina, fenobarbital, também podem alterar o metabolismo da CY (JOY et al., 2012).

Vários estudos demonstram a existência de correlações entre a exposição aos metabólitos da CY, particularmente a CEPM e a HCY, com a manifestação de eficácia ou toxicidade (MCCUNE et al., 2009; MCDONALD et al., 2003, 2005).

Um estudo avaliando 147 pacientes tratados com CY (120 mg/kg) e irradiação corporal total como condicionamento pré-TCTH relatam que a exposição ao metabólito inativo CEPM, avaliada pela AUC, mostra correlação com a toxicidade hepática e com a sobrevida, com aumento de 5,9 vezes na taxa de mortalidade para os pacientes com maiores

valores de exposição ao metabólito. No entanto, não foram observadas correlações entre a exposição ao metabólito CEPM e a pega do enxerto ou recaída da doença em pacientes com doenças onco-hematológicas. No referido estudo, a AUC do metabólito CEPM variou 16 vezes entre os 147 pacientes investigados (MCDONALD et al., 2003). Em outro estudo posterior, o mesmo grupo de pesquisadores relata que o ajuste de dose da CY para uma exposição alvo de CEPM de 325 $\mu\text{mol/L.h}$ (avaliação da exposição de CEPM na primeira dose de CY de 45 mg/kg e ajuste a partir da segunda dose de CY) resulta em variação na exposição ao metabólito de apenas 1,7 vezes. Os autores relatam que doses de CY de 54-156 mg/kg foram necessárias para atingir a exposição alvo do metabólito CEPM de 325 $\mu\text{mol/L.h}$ e que doses menores que a dose padrão de 120 mg/kg não alteram a pega do enxerto, mas previnem a toxicidade hepática (MCDONALD et al., 2009).

De Jonge et al. (2006) reportam que de 59 pacientes tratados com altas doses de CY (1-1,5 g/m²/dia), 4 manifestaram a síndrome obstrutiva sinusoidal e que a AUC da HCY avaliada no primeiro pulso de CY pode ser considerada como um marcador indicativo da manifestação da doença hepática após múltiplos pulsos de CY. Logo, a dose de CY ajustada para uma concentração alvo de HCY poderia ser útil na prevenção da toxicidade hepática.

A eficácia e segurança do ajuste de dose da CY foram avaliadas em 50 pacientes em tratamento com CY e irradiação corporal total. Os pacientes foram tratados com a primeira dose de CY de 45 mg/kg e ajuste a partir da segunda dose com base na exposição aos metabólitos CEPM e HCY avaliada na administração da primeira dose de CY. O ajuste de dose foi realizado considerando a exposição alvo (AUC) de 325 \pm 25 $\mu\text{mol/L.h}$ para o metabólito CEPM e 50 $\mu\text{mol/L.h}$ para o metabólito HCY. Os autores relatam que o ajuste de dose de CY, com base na exposição aos metabólitos e empregando farmacocinética Bayesiana, reduz de maneira significativa os níveis de bilirrubina pós-condicionamento e reduz em 38% a frequência de toxicidade renal (MCCUNE et al., 2009).

A CY está disponível na clínica como mistura racêmica dos enantiômeros (S)-(-) e (R)-(+). Particular atenção tem sido prestada à influência da quiralidade na 4-hidroxilação e nos produtos de desintoxicação da CY. A seletividade da CY para células cancerosas é decorrente da estabilidade da HCY, a qual é transportada para os sítios alvos, e ao nível relativamente baixo da aldeído desidrogenase em células cancerosas comparado com células normais (GERMANAS, J & PANDYA, 2002). Se esta hipótese é verdadeira, então diferenças entre os enantiômeros quanto ao rendimento relativo dos seus metabólitos, podem resultar em diferenças na eficácia terapêutica (JARMAN et al., 1979). Contudo, os dados sobre a enantioseletividade no metabolismo da CY em humanos são insuficientes para sustentar a

hipótese de que um dos dois enantiômeros seria superior ao seu antípoda ou ao racemato na quimioterapia do câncer (JARMAN et al., 1979).

Dados pré-clínicos demonstram diferenças na eficácia e toxicidade dos enantiômeros da CY, com o (S)-(-) exibindo maior efeito anti-tumor e maior índice terapêutico quando comparado ao enantiômero (R)-(+) (KUSNIERCZYK et al., 1986; PAPROCKA et al., 1986). As propriedades farmacológicas da CY racêmica e de seus enantiômeros foram estudadas por Kleinrok et al. (1986) que observaram que o (R)-(+) é mais tóxico que o enantiômero (S)-(-), enquanto que o (S)-(-) é mais tóxico quando comparado com o racemato.

Embora os enantiômeros (R)-(+) e (S)-(-) possam diferir na resposta terapêutica e nos efeitos tóxicos, as conseqüências clínicas dessas diferenças ainda não estão adequadamente determinadas. Os estudos clínicos relativos a enantiosseletividade na disposição cinética e no metabolismo da CY ainda são inconclusivos e abrangem pequeno número de pacientes portadores de diferentes estados de doenças e em tratamento com diferentes fármacos associados (FERNANDES et al., 2011; DE MIRANDA SILVA et al., 2009; WILLIAMS et al., 1999; WILLIAMS et al., 1999b; CORLETT & CHRYSTYN, 1996; HOLM et al., 1990; JARMAN et al., 1979). A farmacocinética da CY administrada por infusão a pacientes com vários tipos de câncer tem sido descrita como não enantiosseletiva (CORLETT & CHRYSTYN, 1996; HOLM et al., 1990; JARMAN et al., 1979), embora hajam relatos de enantiosseletividade no *clearance* de formação do metabólito descloroetilciclofosfamida (WILLIAMS et al., 1999). No entanto, em pacientes portadores de câncer de mama e pacientes portadores de nefrite lúpica foram observados acúmulo plasmático do enantiômero (S)-(-) considerado de maior atividade anti-tumor (DE MIRANDA SILVA et al., 2009; FERNANDES et al., 2011)

A farmacocinética da CY e dos metabólitos HCY e CEPM como mistura enantiomérica encontra-se bem definida na administração intravascular a pacientes portadores de câncer. Ressalta-se, no entanto, a ausência de dados relativos a enantiosseletividade e a disposição cinética e metabolismo da CY em pacientes com doenças inflamatórias como a EM e a ES.

As respostas inflamatórias são complexas e ocorrem em resposta a uma série de doenças, incluindo as doenças autoimunes como EM e ES. Os estímulos inflamatórios podem causar mudanças nas atividades e níveis de expressão de várias isoformas CYP no fígado, bem como em tecidos extra-hepáticos, tais como rins e cérebro (MORGAN, 2001).

O processo inflamatório afeta o metabolismo, a distribuição e a eliminação de certos fármacos em uso na clínica (RENTON et al., 2005). Esses efeitos são resultantes da expressão

alterada do CYP e transportadores que sofrem *down-regulation* durante o mecanismo de defesa do hospedeiro. Quando a resposta inflamatória está confinada ao cérebro há perda de CYP e glicoproteína- P, não apenas no cérebro, mas também em tecidos periféricos. Essa perda, provavelmente, envolve o trânsito rápido de com :cérebro para a circulação periférica (ABDULLA et al., 2006).

As doenças inflamatórias estimulam a liberação de citocinas dos monócitos, macrófagos e células do estroma, resultando na modulação da atividade dos fatores de transcrição no fígado. Essas mudanças, em última análise levam a *down-regulation* da maioria dos genes do CYP. A produção de citocinas também ativa a óxido nítrico-sintase 2 (NOS2) para formar o óxido nítrico (NO), que inibe a atividade de isoformas do CYP diretamente e/ou leva a *down-regulation* das proteínas CYP via desestabilização (MORGAN et al., 2008).

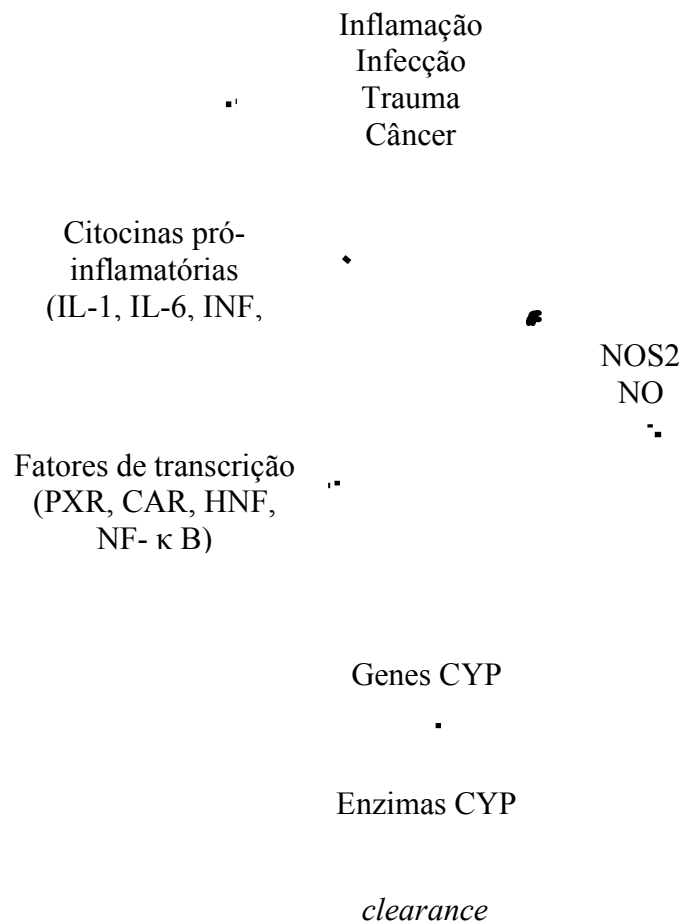


Figura 23. Mecanismo de inibição do CYP e de transportadores durante a inflamação. HNF-fator nuclear de hepatócitos; NF- fator nuclear (adaptado de MORGAN et al., 2008).

Pacientes portadores de EM exibem maiores concentrações no plasma de IFN- γ , IL-17, IL-12, IL-10, TNF- α , IL-2, IL-8, IL-4 e TGB- β (MIKULKOVA et al., 2011), enquanto

pacientes portadores de ES expressam maiores concentrações no plasma de TNF- α , IL-6 e IFN- γ e menores concentrações de IL-17 e IL-23 (GOURH et al., 2009). Machavaram et al. (2013) mostram correlação entre as concentrações plasmáticas da IL-6 em pacientes com artrite reumatoide e em pacientes submetidos ao TCTH e supressão do CYP3A mostrada em função do aumento dos valores de AUC da ciclosporina e sinvastatina.

Considerando a importância do tratamento com CY no regime de condicionamento pré TCTH, o presente estudo visa avaliar a enantioseletividade da CY e seus metabólitos em pacientes portadores de EM e ES. A investigação dos pacientes portadores de EM e ES está sendo proposta considerando que tais pacientes são tratados com o mesmo regime de dosagem de CY e com os mesmos fármacos associados, e considerando que tais doenças são inflamatórias podendo resultar em *down-regulation* das isoformas do CYP associadas com o metabolismo da CY. Ressalta-se ainda os relatos de seletividade quanto a citocina induzida em função da doença inflamatória (ES e EM) assim como quanto a seletividade da isoforma do CYP que sofre *down-regulation* em função da citocina induzida (MORGAN et al., 2008; RENTON, 2004).

6. Conclusões

1. O micrométodo de análise dos enantiômeros da CY e seu metabólito CEPM em plasma humano, empregando coluna quiral acoplada ao sistema LC-MS/MS, apresenta limites de confiança compatíveis com a aplicação em estudo clínico de disposição cinética da CY.
2. O micrométodo de análise dos enantiômeros da HCY em plasma humano, empregando coluna quiral acoplada ao sistema LC-MS/MS, apresenta limites de confiança compatíveis com a aplicação em estudo clínico de disposição cinética da CY.
3. A disposição cinética da CY é enantiosseletiva em pacientes portadores de ES ou EM com acúmulo plasmático do enantiômero (S)-(-)-CY em função da formação preferencial de um dos enantiômeros do metabólito HCY.
4. A disposição cinética do metabólito CEPM não é enantiosseletiva em pacientes portadores de ES ou EM.
5. A disposição cinética dos enantiômeros da CY e seus metabólitos HCY e CEPM não difere entre os pacientes portadores de EM ou ES.
6. Os parâmetros farmacocinéticos da CY e seu metabólito HCY não mostram associação com os polimorfismos CYP2B6*9, CYP2C9*2 e CYP2C9*3.

Referências Bibliográficas

ABBASI, N. et al. Pharmacogenetics of intravenous and oral busulfan in hematopoietic cell transplant recipients. **Journal of clinical pharmacology**, v. 51, n. 10, p. 1429–38, 2011.

ABDULLA, D.; GORALSKI, K.B.; RENTON, K.W. The regulation of cytochrome P4502E1 during LPS-induced inflammation in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.216, n.1, p. 1-10, 2006.

ANDERSSON, B. S. et al. Busulfan systemic exposure relative to regimen-related toxicity and acute graft-versus-host disease: defining a therapeutic window for i.v. BuCy2 in chronic myelogenous leukemia. **Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation**, v. 8, n. 9, p. 477–85, 2002.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003 e Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012**. Disponíveis em <http://www.anvisa.gov.br>

ANSARI, M. et al. A simplified method for busulfan monitoring using dried blood spot in combination with liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry : RCM**, v. 26, n. 12, p. 1437–46, 2012.

BAUMANN, F. et al. Determination of cyclophosphamide and its metabolites in human plasma high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 729, p. 297-305, 1999.

BARTELINK, I. H. et al. Association between busulfan exposure and outcome in children receiving intravenous busulfan before hematologic stem cell transplantation. **Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation**, v. 15, n. 2, p. 231–41, 2009.

BARTELINK, I. H. et al. Body weight-dependent pharmacokinetics of busulfan in paediatric haematopoietic stem cell transplantation patients: towards individualized dosing. **Clinical pharmacokinetics**, v. 51, n. 5, p. 331–45, 2012.

BERI, R. et al. Reliability of a pretransplant i.v. BU test dose performed 2 weeks before myeloablative FluBu conditioning regimen. **Bone marrow transplantation**, v. 45, n. 2, p. 249–53, 2010.

BLEYZAC, N. et al. Improved clinical outcome of paediatric bone marrow recipients using a test dose and Bayesian pharmacokinetic individualization of busulfan dosage regimens. **Bone marrow transplantation**, v. 28, n. 8, p. 743–51, 2001.

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**, v. 742, n. 2, p. 427–32, 2000.

BODDY, A.V.; YULE, S.M. Metabolism and Pharmacokinetics of Oxazaphosphorines. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 38, n. 4, p. 291-304, 2000.

- BOHGAKI, T. et al. Immunological reconstitution after autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with systemic sclerosis: relationship between clinical benefits and intensity of immunosuppression. **The Journal of rheumatology**, v. 36, n. 6, p. 1240–8, 2009.
- BOUZAS, L. F. S. Transplante de medula óssea em pediatria e transplante de cordão umbilical. **Revista Medicina, Ribeirão Preto**, v.33, p. 241–263, 2000.
- BOWEN, J. D. et al. sclerosis : long-term results. v. 47, n. 7, p. 946–951, 2013.
- BULLOCK, J. M. et al. Development of a pharmacokinetic and Bayesian optimal sampling model for individualization of oral busulfan in hematopoietic stem cell transplantation. **Therapeutic drug monitoring**, v. 28, n. 1, p. 62–6, 2006.
- BURT, R. K. et al. Non-myeloablative stem cell transplantation for autoimmune diseases. **Springer seminars in immunopathology**, v. 26, n. 1-2, p. 57–69, 2004.
- CHOE, S. et al. A simple dosing scheme for intravenous busulfan based on retrospective population pharmacokinetic analysis in korean patients. **The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology**, v. 16, n. 4, p. 273–80, 2012.
- CHOW, D. S. et al. Stability-indicating high-performance liquid chromatographic assay of busulfan in aqueous and plasma samples. **Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications**, v. 704, n. 1-2, p. 277–88, 1997.
- CIUREA, S. O.; ANDERSSON, B. S. Busulfan in hematopoietic stem cell transplantation. **Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation**, v. 15, n. 5, p. 523–36, 2009.
- CORLETT, S.A. & CHRYSTYN, H. High-performance liquid chromatographic determination of the enantiomers of cyclophosphamide in serum. **Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications**, v. 682, p. 337-342, 1996.
- COURI, C. E. B.; DE OLIVEIRA, M. C.; SIMÕES, B. P. Risks, benefits, and therapeutic potential of hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diabetes. **Current diabetes reports**, v. 12, n. 5, p. 604–11, 2012.
- CZERWINSKI, M.; GIBBS, P.; SLATTERY, T. Busulfan conjugation. **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, v. 24, n. 9, p. 1015–1019, 1996.
- DAVAALKHAM, J. et al. Allele and genotype frequencies of cytochrome P450 2B6 gene in a Mongolian population. **Drug Metabolism Disposition**, v.37, n.10, p.1991-1993, 2009.
- DE JONGE, M. E. et al. Accuracy, feasibility, and clinical impact of prospective Bayesian pharmacokinetically guided dosing of cyclophosphamide, thiotepa, and carboplatin in high-dose chemotherapy. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 11, n. 1, p. 273–83, 2005.
- DE JONGE, M. E. et al. Significant induction of cyclophosphamide and thiotepa metabolism by phenytoin. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 55, n. 5, p. 507–10, 2005.

DE MIRANDA SILVA, C. et al. Influence of glomerular filtration rate on the pharmacokinetics of cyclophosphamide enantiomers in patients with lupus nephritis. **Journal of clinical pharmacology**, v. 49, n. 8, p. 965–72, 2009.

DELANEY, M.; BALLEEN, K. K. Umbilical Cord Blood Transplantation: Review of Factors Affecting the Hospitalized Patient. **Journal of intensive care medicine**, 2013.

ETTE, E. I.; WILLIAMS, P. J.; LANE, J. R. Population pharmacokinetics III: design, analysis, and application of population pharmacokinetic Studies. **The Annals of pharmacotherapy**, v. 38, n. 12, p. 2136–44, 2004.

EKHART, C. et al. Simultaneous quantification of cyclophosphamide and its active metabolite 4-hydroxycyclophosphamide in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 854, p. 345-9, 2007.

EKHART, C. et al. Relations between polymorphisms in drug-metabolising enzymes and toxicity of chemotherapy with cyclophosphamide, thiotepa and carboplatin. **Pharmacogenetic Genomics**, v. 18, n. 11, p. 1009-15, 2008.

FASSAS, A. et al. Peripheral blood stem cell transplantation in the treatment of progressive multiple sclerosis: first results of a pilot study. **Bone Marrow Transplantation**, v.20, n.8, p. 631-638, 1997.

FERNANDES, B. J. D. et al. Pharmacokinetics of cyclophosphamide enantiomers in patients with breast cancer. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 68, n. 4, p. 897–904, 2011.

GALAUP, A.; PACI, A. Pharmacology of dimethanesulfonate alkylating agents: busulfan and treosulfan. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 9, n. 3, p. 333–47, 2013.

GEDDES, M. et al. High busulfan exposure is associated with worse outcomes in a daily i.v. busulfan and fludarabine allogeneic transplant regimen. **Biology of blood and marrow transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation**, v. 14, n. 2, p. 220–8, 2008.

GERMANAS, J & PANDYA, A. Alkylating agents. **Dermatologic Therapy**, v. 15, p. 317–324, 2002.

GILBERT, C. J. et al. Pharmacokinetic interaction between ondansetron and cyclophosphamide during high-dose chemotherapy for breast cancer. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 42, n. 6, p. 497–503, 1998.

GOURH, P. et al. Plasma cytokine profiles in systemic sclerosis: associations with autoantibody subsets and clinical manifestations. **Arthritis research & therapy**, v. 11, n. 5, p. 147, 2009.

GRISKEVICIUS, L.; MEURLING, L. HASSAN, M. Simple method based on fluorescent detection for the determination of 4-hydroxycyclophosphamide in plasma. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 24, p. 405-9, 2002.

HAMERSCHLAK, N. et al. Brazilian experience with two conditioning regimens in patients with multiple sclerosis: BEAM/horse ATG and CY/rabbit ATG. **Bone marrow transplantation**, v. 45, n.2, p. 239-48, 2010.

HELSEBY, N. et al. The combined impact of CYP2C19 and CYP2B6 pharmacogenetics on cyclophosphamide bioactivation. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.70, n.6, p. 844-53, 2010.

HOLLOMAN, J. P. et al. The development of hematopoietic and mesenchymal stem cell transplantation as an effective treatment for multiple sclerosis. **American journal of stem cells**, v. 2, n. 2, p. 95–107, 2013.

HOLM, K.A. et al. Stereoselective pharmacokinetics and metabolism of the enantiomers of cyclophosphamide. Preliminary results in humans and rabbits. **Biochemical Pharmacology**, v. 39, p. 1375-1384, 1990.

HOMSI, C. M. Complicações precoces do transplante autogênico de células tronco hematopóicas. **Prática Hospitalar**, v. 48, n. 4, p. 29–33, 2006.

JACOB, R. et al. Identification of CYP2B6 sequence variants by use of multiplex PCR with allele-specific genotyping. **Clinical Chemistry**, v. 50, n.8, p. 1372-1377, 2004.

JARMAN, M. et al. Comparative metabolism of 2-[Bis(2-chloroethyl) amino] tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorine-2-oxide (Cyclophosphamide) and its enantiomers in humans. **Cancer Research**, v. 39, p. 2762–2767, 1979.

JOERGER, M. Covariate pharmacokinetic model building in oncology and its potential clinical relevance. **The AAPS journal**, v. 14, n. 1, p. 119–32, 2012.

JOHNSON, L. et al. Glutathione S-transferase A1 genetic variants reduce busulfan clearance in children undergoing hematopoietic cell transplantation. **Journal of clinical pharmacology**, v. 48, n. 9, p. 1052–62, 2008.

JOHNSON-DAVIS, K. L. et al. Which dose of busulfan is best? **Clinical chemistry**, v. 56, n. 7, p. 1061–4, 2010.

JOY, M. S. et al. Cyclophosphamide and 4-hydroxycyclophosphamide pharmacokinetics in patients with glomerulonephritis secondary to lupus and small vessel vasculitis. **British journal of clinical pharmacology**, v. 74, n. 3, p. 445–55, 2012.

KALHORN, et al. Rapid quantitation of cyclophosphamide metabolites in plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v.835, p. 105-13, 2006.

KIM, A. H. et al. Evaluating pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous busulfan in pediatric patients receiving bone marrow transplantation. **Pediatric transplantation**, v. 13, n. 8, p. 971–6, 2009.

KIM, S.-D. et al. Influence of GST gene polymorphisms on the clearance of intravenous busulfan in adult patients undergoing hematopoietic cell transplantation. **Biology of blood**

and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation, v. 17, n. 8, p. 1222–30, 2011.

KLEIN, K. et al. Genetic variability of CYP2B6 in populations of African and Asian origin: allele frequencies, novel functional variants, and possible implications for anti-HIV therapy with efavirenz. **Pharmacogenetics and Genomics**, v.15, n.12, p. 861-73, 2005.

KLEINROK, Z. et al. Comparison of pharmacological properties of cyclophosphamide and its enantiomers. **Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis**, v. 34, n. 3, p. 263-273, 1986.

KLETZEL, M.; JACOBSON, D.; DUERST, R. Pharmacokinetics of a test dose of intravenous busulfan guide dose modifications to achieve an optimal area under the curve of a single daily dose of intravenous busulfan in children undergoing a reduced-intensity conditioning regimen with hematopoietic s. **Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation**, v. 12, n. 4, p. 472–9, 2006.

KRIVOY, N. et al. Pharmacokinetic and pharmacogenetic analysis of oral busulfan in stem cell transplantation: prediction of poor drug metabolism to prevent drug toxicity. **Current drug safety**, v. 7, n. 3, p. 211–7, 2012.

KUSNIERCZYK, H. et al. Antitumor activity of optical isomers of cyclophosphamide, isofosfamide and trofosfamide as compared to clinically used racemates. **International Journal of Immunopharmacology**, v.8, n.4, p. 455-80, 1986.

LEE, J. W. et al. Highly variable pharmacokinetics of once-daily intravenous busulfan when combined with fludarabine in pediatric patients: phase I clinical study for determination of optimal once-daily busulfan dose using pharmacokinetic modeling. **Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation**, v. 18, n. 6, p. 944–50, 2012.

LINDBOM, L. et al. PsN-Toolkit--a collection of computer intensive statistical methods for non-linear mixed effect modeling using NONMEM. **Computer methods and programs in biomedicine**, v. 79, n. 3, p. 241–57, 2005.

LINDLEY, C. et al. Intraindividual variability in busulfan pharmacokinetics in patients undergoing a bone marrow transplant : assessment of a test dose and first dose strategy. p. 453–459, 2004.

LIU, Q.-F et al. Peripheral blood stem cell transplantation compared with bone marrow transplantation from unrelated donors in patients with leukemia: a single institutional experience. **Blood cells, molecules & diseases**, v. 45, n. 1, p. 75–81, 2010.

MACHAVARAM, K.K. et al. A Physiologically based pharmacokinetic modeling approach to predict disease-drug interactions: suppression of CYP3A by IL-6. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**. doi:10.1038/clpt.2013.79

MALÄR, R. et al. Therapeutic drug monitoring is essential for intravenous busulfan therapy in pediatric hematopoietic stem cell recipients. **Pediatric transplantation**, v. 15, n. 6, p. 580–8, 2011.

- MCCUNE, J. S. et al. Personalized dosing of cyclophosphamide in the total body irradiation-cyclophosphamide conditioning regimen: a phase II trial in patients with hematologic malignancy. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 85, n. 6, p. 615–22, 2009.
- MCCUNE, J. S. et al. Variation in Prescribing Patterns and Therapeutic Drug Monitoring of Intravenous Busulfan in Pediatric Hematopoietic Cell Transplant Recipients. **Journal of clinical pharmacology**, 2012.
- MCCUNE, J. S.; GIBBS, J. P.; SLATTERY, J. T. of Busulfan Does It Improve Clinical Outcome ? **Clinical Pharmacokinetic** v. 39, n. 2, p. 155–165, 2000.
- MCCUNE, J. S.; HOLMBERG, L. A. Busulfan in hematopoietic stem cell transplant setting. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 5, n. 8, p. 957–69, 2009.
- MCDONALD, G. B. et al. Cyclophosphamide metabolism , liver toxicity , and mortality following hematopoietic stem cell transplantation. v. 101, n. 5, p. 2043–2048, 2003.
- MCDONALD, G. B. et al. Metabolism-based cyclophosphamide dosing for hematopoietic cell transplant. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 78, n. 3, p. 298–308, 2005.
- MIKULKOVA, Z. et al. Imbalance in T-cell and cytokine profiles in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. **Journal of the neurological sciences**, v. 300, n. 1-2, p. 135–41, 2011.
- MORGAN, E. T. Regulation of cytochrome p450 by inflammatory mediators: why and how? **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, v. 29, n. 3, p. 207–12, 2001.
- MORGAN, E. T. et al. Regulation of Drug-Metabolizing Enzymes and Transporters in Infection , Inflammation , and Cancer. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 36, n. 2, p. 205–216, 2008.
- MORGAN, E. T. Impact of infectious and inflammatory disease on cytochrome P450-mediated drug metabolism and pharmacokinetics. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 85, n. 4, p. 434–8, 2009.
- NATH, C. E. et al. Variability in the pharmacokinetics of intravenous busulphan given as a single daily dose to paediatric blood or marrow transplant recipients. **British journal of clinical pharmacology**, v. 66, n. 1, p. 50–9, 2008.
- NATH, C. E.; SHAW, P. J. Busulphan in blood and marrow transplantation: dose, route, frequency and role of therapeutic drug monitoring. **Current clinical pharmacology**, v. 2, n. 1, p. 75–91, 2007.
- NGUYEN, L. Integration of modelling and simulation into the development of intravenous busulfan in paediatrics: an industrial experience. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 22, n. 6, p. 599–604, 2008.
- NOSEWORTHY, J.H. et al. Multiple Sclerosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 13, p. 938-952, 2000.

OLSON, M. T.; LOMBARDI, L.; CLARKE, W. Clinical consequences of analytical variance and calculation strategy in oral busulfan pharmacokinetics. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 412, n. 23-24, p. 2316–21, 2011.

PAPROCKA, M. et al. Comparative studies on biological activity of /+R and /-S enantiomers of cyclophosphamide and ifosfamide. I. Antitumour effect of cyclophosphamide and ifosfamide enantiomers. **Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis**, v. 34, n. 3, p. 275-284, 1986.

PARKE, J.; HOLFORD, N. H.; CHARLES, B. G. A procedure for generating bootstrap samples for the validation of nonlinear mixed-effects population models. **Computer methods and programs in biomedicine**, v. 59, n. 1, p. 19–29, 1999.

PATON, E. J. A.; COUTINHO, M. A.; VOLTARELLI, J. C. AGUDAS DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS. **Revista Medicina, Ribeirao Preto**, v. 33, p. 264–277, 2000.

PERKINS, J. B. et al. Maximally tolerated busulfan systemic exposure in combination with fludarabine as conditioning before allogeneic hematopoietic cell transplantation. **Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation**, v. 18, n. 7, p. 1099–107, 2012.

PINTO, N.; LUDEMAN, S.M.; DOLAN, M.E. Pharmacogenetic studies related to cyclophosphamide-based therapy. **Pharmacogenomics**, v.10, n. 12, p. 1897-903, 2009.

POSER, C.M. et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. **Annals of Neurology**, v. 13, n. 3, p. 227-31, 1983.

QIU, R.; KALHORN, T. F.; SLATTERY, J. T. ABCC2-Mediated Biliary Transport of 4-Glutathionylcyclophosphamide and Its Contribution to Elimination of 4-Hydroxycyclophosphamide in Rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 308, n. 3, p. 1204–1212, 2004.

QIU, R. et al. Disminishing the risk of nonrelapse mortality in hematopoietic stem cell transplantation: prediction of exposure to the cyclophosphamide metabolite carboxyethylphosphamide mustard. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 76, n. 3, p. 270-280, 2004.

RACCOR B.S. et al. Potential contribution of cytochrome P450 2B6 to hepatic 4-hydroxycyclophosphamide formation in vitro and in vivo. **Drug Metabolism Disposition**, v. 40, n. 1, p. 54-63, 2012.

REN, S. et al. Pharmacokinetics of cyclophosphamide and its metabolites in bone marrow transplantation patients. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 64, n. 3, p.289-301, 1998.

RENTON, K. W. Alteration of drug biotransformation and elimination during infection and inflammation. **Pharmacology & therapeutics**, v. 92, n. 2-3, p. 147–63, 2001.

RENTON, K.W. Cytochrome P450 Regulation and Drug Biotransformation during Inflammations and Infection. **Current Drug Metabolism**, v. 5, p. 235-43, 2004.

RENTON, K.W. Regulation of drug metabolism and disposition during inflammation and infection. **Expert Opin Drug Metab Toxicol.**, v.1, n.4, p.629-640, 2005.

REZVANI, A. R. et al. Cyclophosphamide Followed by Intravenous Targeted Busulfan for Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Pharmacokinetics and Clinical Outcomes. **Biology of blood and marrow transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation**, v. 19, n. 7, p. 1033–1039, 2013.

RUSSELL, J. A et al. Once-daily intravenous busulfan given with fludarabine as conditioning for allogeneic stem cell transplantation: study of pharmacokinetics and early clinical outcomes. **Biology of blood and marrow transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation**, v. 8, n. 9, p. 468–76, 2002.

SANDSTRÖM, M. et al. Population pharmacokinetic analysis resulting in a tool for dose individualization of busulphan in bone marrow transplantation recipients. **Bone marrow transplantation**, v. 28, n. 7, p. 657–64, 2001.

SLATTERY, J.T. et al. Conditioning regimen-dependent disposition of cyclophosphamide and hydroxycyclophosphamide in human marrow transplantation patients. **Journal of Clinical Oncology** v.14, n.5, p. 1484-94, 1996.

STRACIERI, A. B. P. L. ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DOS TRANSPLANTES DE. **Revista Medicina, Ribeirao Preto**, v. 33, p. 443–462, 2000.

TAKAMATSU, Y. et al. An evaluation of busulfan pharmacokinetics in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. **Japanese journal of clinical oncology**, v. 35, n. 7, p. 400–3, 2005.

TAKAMATSU, Y. et al. Individual dose adjustment of oral busulfan using a test dose in hematopoietic stem cell transplantation. **International journal of hematology**, v. 86, n. 3, p. 261–8, 2007.

TEN BRINK, M. H. et al. Effect of genetic polymorphisms in genes encoding GST isoenzymes on BU pharmacokinetics in adult patients undergoing hematopoietic SCT. **Bone marrow transplantation**, v. 47, n. 2, p. 190–5, 2012.

TRAME, M. N. et al. Population pharmacokinetics of busulfan in children: increased evidence for body surface area and allometric body weight dosing of busulfan in children. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 17, n. 21, p. 6867–77, 2011.

VAN LAAR, J. M. et al. Autologous HSCT for systemic sclerosis. **Lancet**, v. 381, n. 9883, p. 2079–80, 2013.

VIANNA-JORGE R., et al. CYP2C9 genotypes and the pharmacokinetics of tenoxicam in Brazilians. **Clin Pharmacol Ther.** St. Louis, v. 76, n. 1, p.18-26, 2004

WILLIAMS M.L. et al. Enantioselective induction of cyclophosphamide metabolism by phenytoin. **Chirality**, v. 11, p. 569-574, 1999.

WILLIAMS, M.L. et al Pharmacokinetics of (R) and (S)- cyclophosphamide and their dechloroethylated metabolites in cancer patients. **Chirality**, v.11, p. 301-308, 1999b.

XIE, H. et al. Pharmacogenetics of cyclophosphamide in patients with hematological malignancies. **European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 1, p. 54–61, 2006.

ZHANG, J. et al. Reversal of resistance to oxazaphosphorines. **Current cancer drug targets**, v. 6, n. 5, p. 385–407, 2006.