

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

**MODELO DE PERSONALIZAÇÃO DE DOSE DE
BUSSULFANO INTRAVENOSO BASEADO NO
GENÓTIPO DE *GSTA1* DURANTE REGIME DE
CONDICIONAMENTO DO TRANSPLANTE DE
CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS EM
CRIANÇAS**

TESE DE DOUTORADO

TIAGO RODRIGUES NAVA

PORTO ALEGRE, BRASIL
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

**MODELO DE PERSONALIZAÇÃO DE DOSE DE
BUSSULFANO INTRAVENOSO BASEADO NO
GENÓTIPO DE *GSTA1* DURANTE REGIME DE
CONDICIONAMENTO DO TRANSPLANTE DE
CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS EM
CRIANÇAS**

TIAGO RODRIGUES NAVA

A apresentação desta tese é exigência do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Liane Esteves Daudt
Coorientador: Henrique da Silva Neves Bittencourt

PORTO ALEGRE, BRASIL
2017

CIP - Catalogação na Publicação

Nava, Tiago

MODELO DE PERSONALIZAÇÃO DE DOSE DE BUSSULFANO
INTRAVENOSO BASEADO NO GENÓTIPO DE GSTA1 DURANTE
REGIME DE CONDICIONAMENTO DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS-
TRONCO HEMATOPOIÉTICAS EM CRIANÇAS / Tiago Nava. --
2017.

160 f.

Orientadora: Liane Daudt.

Coorientador: Henrique Bittencourt.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Porto
Alegre, BR-RS, 2017.

1. TCTH. 2. Bussulfano. 3. Farmacogenética. I.
Daudt, Liane, orient. II. Bittencourt, Henrique,
coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

ESTA TESE FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

09/06/2017

E FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof. Dr. Lauro José Gregianin

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Bibiana Verlindo de Araújo

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dra. Carmem Maria Sales Bonfim

Universidade Federal do Paraná

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho às mulheres da minha vida:
Mariana, Luisa e Alice.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Profa. Liane Daudt**, não só pelo estímulo para que eu me lançasse ao desafio do doutorado, mas, sobretudo, por ter-me apresentado às áreas da hematologia e da oncologia pediátrica.

Ao meu coorientador, **Prof. Henrique Bittencourt**, a quem devo a maior gratidão pelo incentivo, apoio e encorajamento, mas, principalmente pelo espírito sempre aberto à inovação. A ele, que aprendi a considerar como um amigo, devo a gratidão de ver reavivado em mim o impulso criativo e a excitação pela descoberta.

À minha amiga **Profa. Maja Krajinovic**, por ter-me incentivado a aceitar novos desafios, ainda que parecessem por vezes intransponíveis. Ouvinte atenta de minhas ideias e reflexões, sempre demonstrou confiar em meu potencial, expondo-me a projetos ambiciosos e compartilhando o fazer científico de igual para igual.

Ao meu amigo **Mouhamed Aziz Rezgui**, pelas informações, genotipagens, codificações de haplótipos, apresentações e revisões de artigos compartilhadas, assim como pela sua constante gentileza e disponibilidade.

À minha amiga **Nastya Kassir**, a qual, mesmo às voltas com as (a)venturas da maternidade – desde a gestação e as noites insones dos primeiros meses até os desafios da iniciação na *garderie* – e mesmo superatarefada com seus muitos encargos profissionais, conseguiu tempo e energia para me introduzir no mundo da modelização.

Ao Papai Noel. Sim ao Papai Noel, seja fantasiado de **Prof. Yves Théoret**, ou vice-versa, com quem tive produtivas discussões ao lado de suas folhas de perfis de farmacocinética do bussulfano e sua inseparável garrafa de Pepsi®, as quais terminavam invariavelmente com: *“Câlisse! Et alors, qu’est-ce qu’on fait avec ce frigo des brésiliens”*.

À **Dra. Caroline Laverdière**, a qual – para além de seu destacado papel de Diretora do Programa de Hematologia e Oncologia Pediátrica do CHU Sainte-Justine – foi uma grande apoiadora da minha carreira em clínica e em pesquisa. Por seu exemplo de conhecimento, firmeza e valorização da família, minha grata homenagem.

Ao meu grande mestre, **Dr. Georges-Étienne Rivard**, gentil-homem de incontáveis e insuspeitadas competências – não apenas como referência internacional em hemóstase, mas também como bioquímico, construtor de chalé, conhecedor da vida dos castores em sociedade e apreciador qualificado de sardinhas. Por todo apoio e pelos saberes que generosamente compartilhou em termos de ciência, de vida e de mundo, Mestre Rivard, minha eterna gratidão.

Aos **colaboradores do Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine** que aprendi a tanto apreciar, principalmente àqueles que fazem parte do Serviço de Farmacologia Clínica e do Serviço de Hematologia e Oncologia Pediátrica – minha gratidão e respeito.

À **CANSEARCH Foundation**, seus colaboradores e ao **Prof. Marc Ansari**, minha gratidão pelo apoio ao projeto que aqui se encerra e pela acolhida em seu grupo nesta etapa profissional que se inicia.

Aos meus amigos *co-fellows*, que suportaram com paciência ouvir-me repetir o vocábulo “*bussulfan*” tantas vezes, em conversas de corredor, em discussões sobre projetos na sala dos residentes, ou em apresentações mais formais.

Aos **meus pais**, pelo bem mais precioso que um filho pode receber: o de sempre deixá-lo guiar-se pelos próprios sonhos e ambições, mesmo em detrimento do conforto da proximidade cotidiana. Minha gratidão por não terem me imposto limites para sonhar.

À minha mulher, **Mariana**, com quem compartilho o resultado deste trabalho, mais uma etapa conquistada nesses dez anos juntos, sempre com muito amor, compreensão e suporte mútuo. Pela paciência dos últimos meses, pelo incentivo dos últimos anos e pela cumplicidade ao encarar novos desafios, sempre sob o mesmo mantra “Vamos lá!”, meu eterno obrigado.

Às minhas filhas, **Luisa e Alice**, pelas horas roubadas de brincadeira e de idas ao parque que terminaram por serem desviadas para escrever e “escrever de novo, papai” sobre o “remédio que mata as células ruins e faz cair o cabelo”.

Aos **avós das minhas filhas**, permanente fonte de amor que, mesmo a distância, as aproxima de sua terra natal – mesmo que permaneça uma certa confusão entre Brasil, Bauru e Porto Alegre. Principalmente à minha sogra. Sim, minha sogra, **Marisa**, por todo o seu apoio, seja logístico, seja como revisora de português, que nos tem sido de extrema valia nesta vida de expatriados.

Finalmente, mas com igual destaque, aos **pacientes e suas famílias**, que contribuíram para a construção deste trabalho.

O ontem é história, o amanhã um mistério, mas o hoje... o hoje é uma dádiva, e é por isso que se chama presente.

Mestre Oogway

RESUMO

O bussulfano (Bu) é um agente alquilante usado no condicionamento que precede o transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) em crianças. Sua farmacocinética (FC) apresenta uma grande variabilidade interindivíduo, que pode ser parcialmente explicada pelas variantes genéticas de *GSTA1*, gene da enzima glutathione S-transferase $\alpha 1$, crucial para o metabolismo do Bu. Vários métodos de predição da FC do Bu são usados para calcular sua dose, essencialmente com base na idade e peso do paciente. Até o momento, apenas um modelo adulto incorporou as variantes de *GSTA1* no cálculo da sua dose do Bu. No presente trabalho, avaliou-se, inicialmente, o desempenho de métodos atualmente disponíveis em pediatria, em função das variantes genéticas de *GSTA1*. Foram avaliados os parâmetros de FC da primeira dose de 101 crianças e adolescentes submetidos a TCTH alogênico no CHU Sainte-Justine, Montreal, Canadá, após regime de condicionamento que incluía Bu intravenoso (BuCR, do inglês *busulfan-containing regimen*). Os haplótipos *GSTA1* foram interpretados em pares (diplótipos) e depois classificados em três grupos com base nos seus diferentes potenciais de expressão enzimática. As AUCs (*area under the curve*) medidas e as AUCs calculadas a partir de doses de Bu previstas por 11 modelos diferentes foram classificadas de acordo com a sua capacidade para atingir a AUC-alvo (900 a 1.500 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$). Também foram calculados os erros de previsão do *clearance* do Bu. Após a primeira dose, as AUCs medidas atingiram a AUC-alvo em 38,7%. Os diplótipos de *GSTA1* relacionados ao metabolismo lento (G3) e regimes contendo fludarabina (FluCR, do inglês *fludarabine-containing regimen*) foram os únicos fatores associados à AUC no alvo (OR 4,7, IC 95%, 1,1 - 19,8, $p = 0,04$ e OR 9,9, IC 95%, 1,6 - 61,7, $p = 0,01$, respectivamente). Utilizando os outros métodos para o cálculo da dose, a percentagem de AUC no alvo variou de 16% a 74%. G3 e FluCR foram, em alguns modelos, associados à AUC no alvo ou na faixa tóxica, enquanto que os metabolizadores rápidos (G1) foram por vezes associados a AUCs subterapêuticas. Essas associações foram confirmadas na análise de predição do *clearance*, em que os diplótipos da *GSTA1* e o regime de condicionamento influenciaram significativamente a maioria dos erros de previsão dos métodos testados. Uma vez que *GSTA1* mostrou influenciar significativamente os algoritmos disponíveis, pretendeu-se desenvolver um modelo de FC de população que incluísse variantes genéticas de *GSTA1* como um fator no cálculo de dose do Bu. Para tanto, foram analisados os dados de concentração-tempo de 112 crianças e adolescentes que receberam um BuCR mieloablativo antes de 115 TCTH (autólogos e alogênicos), realizados também no CHU Sainte-Justine. Para a construção do modelo de FC de população, utilizou-se uma análise mista não linear. Sexo, doença de base (maligna vs. não maligna), idade pós-menstrual (PMA) ou idade cronológica, regime de condicionamento e diplótipos de *GSTA1* foram avaliados como fatores potenciais. Um modelo de um compartimento com eliminação de primeira ordem foi o que melhor descreveu os dados disponíveis. Um fator de maturação do metabolismo de Bu (Fmat) e o peso elevado a exponencial alométrico teórico foram incluídos no modelo de base. A análise dos fatores revelou PMA ($\Delta\text{OFV} = -26,7$, $p = 2,3 \times 10^{-7}$) e grupos de diplótipos de *GSTA1* ($\Delta\text{OFV} = -11,7$, $p = 0,003$) como fatores significativamente associados, respectivamente, ao volume e ao CL do Bu. Os CL dos metabolizadores rápidos (G1) foram preditos como sendo 7% mais elevados que os definidos como metabolizadores normais (G2), enquanto que os metabolizadores lentos (G3) foram descritos com CL 12% menor que os G2. Em conclusão, após se evidenciar que os métodos disponíveis para o cálculo de dose do Bu não são adequados para todos os grupos de diplótipos de *GSTA1*, propôs-se o primeiro algoritmo de cálculo de dose de Bu em pediatria baseado em farmacogenética. Seu uso pode contribuir para uma melhor previsibilidade da FC do

Bu e, desta forma, melhor predizer a exposição de crianças e adolescentes à droga, de acordo com a capacidade metabólica de cada indivíduo.

Palavras-chave: Transplante de células-tronco hematopoiéticas. TCTH. Bussulfano. Farmacocinética. Farmacogenética. Polimorfismos. *GSTA1*. Modelo de farmacocinética de população.

ABSTRACT

Busulfan (Bu) is an alkylating agent used in the conditioning before hematopoietic stem cells transplantation (HSCT) in children. Its pharmacokinetics (PK) presents a great inter-individual variability, which can be partially explained by *GSTA1* genetic variants, gene coding for the enzyme glutathione s-transferase $\alpha 1$, crucial for Bu metabolism. Several methods of predicting PK are available and are used to calculate the Bu dose, based essentially on patients' age and anthropometric characteristics. So far, a single adult model successfully incorporated this factor into the Bu dose calculation. In the present work, we initially evaluate the performance of the currently available guidelines across the different *GSTA1* genetic variants. The PK parameters from the Bu first doses from 101 children and adolescents who have undergone allogeneic SCT at the CHU Sainte-Justine, Montreal, Canada following a IV Bu-containing conditioning regimen (BuCR). *GSTA1* haplotypes were interpreted in pairs (diplotypes) and then classified in 3 groups based on different potentials of enzyme expression. Measured AUCs and AUCs calculated from Bu doses predicted by 11 different models were classified according to their ability to achieve the AUC target (900 and 1500 μ M.min). Clearance prediction errors were also calculated. After the first dose, measured AUCs achieved the target in 38.7%. *GSTA1* diplotypes groups related to poor Bu metabolism (G3) and fludarabine-containing regimens (FluCR) were the only factors associated with AUC within target (OR 4.7, 95% CI, 1.1 - 19.8, $p=0.04$ and OR 9.9, 95% CI, 1.6 - 61.7, $p=0.01$, respectively). Using other methods for dose calculation, percentage of AUCs within target varied from 16% to 74%. G3 and FluCR were, in some models, associated to AUC within the target and in the toxic range, whereas rapid-metabolizers (G1) were correlated with sub therapeutic AUCs. These associations were confirmed in clearance-prediction analysis, where *GSTA1* diplotypes groups and conditioning regimen consistently influenced methods' most prediction errors. Once *GSTA1* status was demonstrated to influence significantly the available Bu dosing algorithms, we aimed to develop a population PK (PPK) model which included *GSTA1* genetic variants as a covariate. For that, concentration-time data from 112 children and adolescents receiving IV Bu as a component of the conditioning regimen for 115 stem cell transplantations (autologous and allogeneic) performed at CHU Sainte-Justine were analyzed. Non-linear mixed effects analysis was used to build a PPK model. Sex, baseline disease (malignant vs. non-malignant), post-menstrual age (PMA) or chronological age, conditioning regimen and *GSTA1* diplotypes groups were evaluated as potential covariates. A one-compartment model with first-order elimination best described the data. A factor of Bu metabolism maturation (Fmat) and theoretical allometric scaling of weight were included in the base model. Covariate analysis revealed PMA (Δ OFV=-26.7, $p=2.3 \times 10^{-7}$) and *GSTA1* diplotypes groups (Δ OFV=-11.7, $p=0.003$), as significant factors on volume and clearance (CL), respectively. CL of rapid metabolizers (G1) were predicted as being 7% higher and that of poor ones (G3) 12% lower than CL of those defined as normal metabolizers (G2). In conclusion, after evidencing that available Bu dosing methods are not suitable for all *GSTA1* diplotypes groups, we have proposed the first pharmacogenomics-based dosing algorithm for Bu to be used in a pediatrics. Its use may contribute considerably to better predict Bu exposure in children and adolescents tailoring the dose according to individual metabolic capacity.

Keywords: Hematopoietic stem cell transplantation. HSCT. Busulfan. Pharmacokinetics. Pharmacogenetics. Polymorphisms. *GSTA1*. Population pharmacokinetic model.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura do Bu e seus sítios de interação com o ADN.	25
Figura 2. Metabolismo do Bu.....	27
Figura 3. Gráfico de Kaplan-Mayer da SLE segundo a AUC acumulada.....	40
Figura 4. Potencial de transcrição dos diferentes haplótipos de <i>GSTAI</i>	50
Figura 5. Composição dos grupos de haplótipos de <i>GSTAI</i>	50

ARTIGO I

Figure 1. Grouping composition based on <i>GSTAI</i> -diplotypes.	114
---	-----

ARTIGO II

Figure 1. Goodness-of-fit of the final model	150
Figure 2. Visual Prediction Check of final model.	151
Figure S1. Composition of groups based on <i>GSTAI</i> -diplotypes	152
Figure S2. Blood Bu concentration vs. time after first dose.....	154
Figure S3. Box plot of random effects on CL and V.....	155
Figure S4. Models' performance in G1 and G3 patients	156

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios diagnósticos de SOS em adultos.....	30
Tabela 2. Resumo dos resultados dos estudos abordando CL/F do Bu VO.	34
Tabela 3. Polimorfismos mais frequentes dos genes <i>GSTP1</i> , <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i>	43
Tabela 4. SNVs que compõem os haplótipos do gene <i>GSTAI</i>	44
Tabela 5. Sumário dos achados clínicos e de FC associados a SNVs dos genes das GSTs.....	46
Tabela 6. Resumo dos modelos de FC de população do Bu disponíveis em pediatria.	53
Tabela 7. Equações para cálculos de erros de predição.....	64
Tabela 8. Equações utilizadas para a obtenção dos valores de F_{mat} e F_{size}	71

ARTIGO I

Table 1. Models' characteristics.....	115
Table 2. Patients' characteristics.	116
Table 3. PK parameters according conditioning regimen.....	117
Table 4. Guidelines' performance across the <i>GSTAI</i> -based groups.	118
Table 5. Mean of prediction mean error across <i>GSTAI</i> -based groups.	120
Table S1. Haplotypes composition based on SNVs of <i>GSTAI</i>	121
Table S2. Equations used in predicted AUC and CL of Bu.....	121
Table S3. Nomograms and equations used to obtain IV Bu doses according to each method...	122

ARTIGO II

Table 1. Patients' demographic and clinical characteristics	147
--	-----

Table 2. Model’s pharmacokinetic parameters estimates and bootstrap results.....	148
Table 3. Frequency of achievement of target AUC	149
Table S1. Haplotype composition based on single nucleotides variants of <i>GSTA1</i>	152
Table S2. Equations used in McCune’s models.....	153
Table S3. Available PopPK models in paediatric population.....	157
Table S4. GSTs SNVs and clinical and/or PK outcomes	159

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AE%	Erro absoluto de predição
ANVISA	Agência de Vigilância Sanitária
ASC	Área de superfície corporal
AUC	Área sob a curva, em inglês
AUC _{24h}	Área sob a curva de doses a cada 24 horas
AUC _{6h}	Área sob a curva de doses a cada 6 horas
BFU-E	<i>Burst Forming Unit – Erythroid</i>
Bu	Bussulfano
CES	Células endoteliais sinusoidais
CFU-GM	<i>Colony Forming Units – Granulocytes and Macrophages</i>
CL	Depuração ou <i>clearance</i>
CL/F	Depuração ou <i>clearance</i> aparente
C _{max}	Concentração máxima
C _{min}	Concentração mínima
C _{ss}	Concentração de equilíbrio ou de <i>steady-state</i>
CV	Coefficiente de variação
Cy	Ciclofosfamida
Cy2	Ciclofosfamida 60mg/Kg/dia em dois dias consecutivos

Cy4	Ciclofosfamida 50mg/Kg/dia em quatro dias consecutivos
DECHa	Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FC	Farmacocinética
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FFM	<i>Free fat mass</i>
F _{mat}	Fator de maturação do metabolismo do bussulfano
FOE	Estimação de primeira ordem, em inglês
F _{size}	Fator “tamanho”
GI	Gastrointestinal
GSH	Glutationa
GST	Glutationa S-transferase
HLA	Antígeno de histocompatibilidade leucocitário, em inglês
HR	Razão de risco ou <i>Hazard ratio</i> , em inglês
ICT	Irradiação corporal total
IPM	Idade pós-menstrual
IV	Intravenoso(a)
k _{mat}	Constante de maturação do metabolismo do bussulfano
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LMA	Leucemia mieloblástica aguda
LMC	Leucemia mieloide crônica

MAF	Frequência de alelo menor, em inglês
Mag _{mat}	Magnitude de maturação do metabolismo do bussulfano
MDT	Monitorização de dose terapêutica
ME%	Média do erro absoluto de predição
MNR	Mortalidade não relacionada à recaída
NFM	<i>Normal fat mass</i>
NONMEM ou NLME	Modelos não lineares de efeitos mistos, em inglês
OFV	Valor de função objetiva, em inglês
OR	Razão de chances ou <i>odds ratio</i> , em inglês
PCT	Peso corporal total
PEG	Polietilenoglicol
PG	Farmacogenética, em inglês
PGx	Farmacogenômica, em inglês
PI	Pneumonite idiopática
Q	Depuração ou <i>clearance</i> intercompartimental
q24h	Refere-se às doses a cada 24 horas
q6h	Refere-se às doses a cada 6 horas
RR	Risco relativo
SG	Sobrevida global
SLE	Sobrevida livre de evento
SNV	Variante de nucleotídeo único
SOS	Síndrome Obstrutiva Sinusoidal

TCTH	Transplante de células-tronco hematopoiéticas
THT	Tetraidrotofeno
TM50	Idade pós-menstrual na qual a capacidade de metabolização do bussulfano atinge 50% dos níveis adultos
V ou V1	Volume de distribuição central
V2	Volume de distribuição no segundo compartimento
VEO	Variabilidade entreocasiões
VES	Variabilidade entressujeitos
VO	Via oral
VPC	Verificação preditiva visual, em inglês

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DA LITERATURA	23
	2.1 TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS	23
	2.2 BUSSULFANO	24
	2.3 TOXICIDADES	27
	2.4 FARMACOCINÉTICA DO BUSSULFANO.....	32
	2.5 ÍNDICE TERAPÊUTICO DO BUSSULFANO	36
	2.7 VARIANTES GENÉTICAS DE GSTs.....	43
	2.8 MODELOS DE PREDIÇÃO DE DOSE.....	51
3	JUSTIFICATIVA	58
4	OBJETIVOS	59
	4.1 OBJETIVO GERAL.....	59
	4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	59
5	MATERIAIS E MÉTODOS	60
	5.1 ESTUDO I.....	60
	5.1.1 Delineamento	60
	5.1.2 População em estudo.....	60
	5.1.3 Regime de tratamento	61
	5.1.4 Variáveis em estudo	61
	5.1.5 Detecção das variáveis em estudo.....	62
	5.2 ESTUDO II.....	66
	5.2.1 Delineamento	66
	5.2.2 População em estudo.....	66
	5.2.3 Regime de tratamento	67
	5.2.4 Variáveis em estudo	67
	5.2.5 Detecção das variáveis em estudo.....	68
	5.3 ASPECTOS ÉTICOS	73
	REFERÊNCIAS	74
	ARTIGO I.	89

ARTIGO II.....	124
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	162
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	164

1 INTRODUÇÃO

O transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) é uma modalidade terapêutica curativa para algumas formas de doenças malignas e benignas. Diferentemente do que ocorre no transplante de órgãos sólidos, o paciente que recebe um TCTH necessita, além do tratamento de imunossupressão após o transplante, de uma preparação prévia, comumente chamada de condicionamento. Este é composto de agentes quimioterápicos (associados ou não à radioterapia) que, em conjunto, propiciam a pega do enxerto e o controle (ou erradicação) da doença de base.

O regime de condicionamento causa a eliminação da hematopoiese do receptor (paciente), ocasionando um período de pancitopenia prolongado, durante o qual transfusões de eritrócitos e plaquetas são necessárias. Além disso, a leuco/neutropenia predispõe o paciente a infecções causadas por agentes oportunistas endógenos e exógenos. A par dessas complicações infecciosas, o regime de condicionamento, composto por agentes citotóxicos dependentes ou não do ciclo celular, associa-se a diversas toxicidades em outros sistemas para além do hematopoiético, tais como o gastrointestinal (GI), o hepático, o reprodutivo, o pulmonar, o cardíaco e o cutâneo, por exemplo.

Bussulfano (Bu) é um agente alquilante utilizado largamente como parte integrante dos regimes de condicionamento antes do TCTH alogênico e autólogo. Apesar de sua vasta utilização, Bu é conhecido por ter um índice terapêutico estreito. Recaída de doenças malignas e rejeição são associadas a exposições insuficientes à droga, enquanto toxicidades como síndrome obstrutiva sinusoidal (SOS), doença aguda do enxerto contra o hospedeiro (DECHa) e mucosite grave são associadas a exposições acima dos níveis recomendados. Ademais, estudos de farmacocinética (FC) demonstram que Bu apresenta uma variabilidade interindividual importante, o que faz da

monitorização de dose terapêutica (MDT) uma ferramenta essencial, principalmente em crianças, onde esta variabilidade é mais evidente.

Com o intuito de diminuir grandes ajustes de dose no decorrer no condicionamento, em consequência dos resultados da MDT, diversas tentativas de predição dos parâmetros de FC segundo as características antropométricas foram sugeridas. Na prática clínica, são conhecidos atualmente 12 diferentes métodos de cálculo de dose de Bu em pediatria, a maioria baseada em modelos de FC de população. Estes modelos utilizam exclusivamente dados como peso e/ou idade como fatores de correção da dose.

Recentemente, fatores genéticos associados à variabilidade da FC do Bu foram descritos. Variações de genes como o *GSTA1* (glutathione S-transferase $\alpha 1$), uma importante enzima na via da eliminação do Bu, têm sido associadas a diferenças significativas na FC e na incidência de toxicidades relacionadas à droga. Partindo desses achados, um estudo que avalie a incorporação do resultado genético dos diferentes polimorfismos da *GSTA1* no cálculo da dose de Bu parece necessário para melhorar a personalização da dose e, conseqüentemente, evitar tanto uma exposição insuficiente quanto excessiva ao Bu em crianças e adolescentes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS

A primeira infusão de células da medula óssea em humanos foi realizada em 1939 na tentativa de melhorar as contagens de plaquetas e leucócitos em uma paciente com aplasia medular dependente de transfusões diárias de concentrado de hemácias (HENIG; ZUCKERMAN, 2014; OSGOOD; RIDDLE; MATHEWS, 1939). Após a Segunda Guerra Mundial, pesquisadores passaram a buscar uma forma de recuperar a aplasia medular secundária à irradiação em pacientes expostos às bombas atômicas. Os primeiros resultados em modelo murino de transplante alogênico de células-tronco foram publicados em 1956 por Barnes *et al.* (BARNES *et al.*, 1956). De acordo com este estudo, todas as cobaias infundidas inicialmente com células de leucemia linfoblástica aguda (LLA) e na sequência tratadas com radioterapia de 950 rad seguida de transplante singênico recaíram, enquanto o grupo que recebeu dose maior de radioterapia (1.500 rad) não apresentou nenhuma recaída, demonstrando já a importância de um condicionamento adequado no TCTH. Após diversas tentativas sem sucesso em humanos relatadas no final dos anos 1950 (THOMAS *et al.*, 1957), mais de 10 anos foram necessários para que estudos de compatibilidade de HLA (Antígeno de Histocompatibilidade Leucocitário) se tornassem disponíveis (HENIG; ZUCKERMAN, 2014). Esses estudos viabilizaram os primeiros transplantes alogênicos, cujos doadores foram escolhidos pela compatibilidade HLA com os receptores reportados por dois grupos diferentes no mesmo número da revista *Lancet* em 1968 (BACH *et al.*, 1968; GATTI *et al.*, 1968). A primeira grande série prospectiva de TCTH foi publicada em 1977; com 100 pacientes com LMA ou LLA, os resultados evidenciaram sobrevida livre de evento (SLE) de 13% entre 1 e 4,5 anos pós-transplante (THOMAS *et al.*, 1977). Desde então, diferentes combinações de

quimioterapia associada ou não a modalidades variadas de radioterapia são empregadas no que passou a se identificar como regime de condicionamento. Este desempenha importantes funções no processo do TCTH: 1) eliminar as células neoplásicas nos casos de doenças malignas; 2) criar espaço no microambiente da medula óssea do receptor a fim de favorecer a pega do enxerto; e 3) suprimir a imunidade do receptor a fim de diminuir o risco de rejeição do enxerto. Tudo isso tentando limitar os efeitos tóxicos para os tecidos normais do hospedeiro (SADEGHI et al., 2008).

2.2 BUSSULFANO

Bussulfano (Bu, 1,4-butanodiol dimetanosulfonato, $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{O}[\text{CH}_2]_4\text{OSO}_2\text{CH}_3$, Figura 1A), um éster de ácido sulfônico, é um agente alquilante bifuncional de ação independente do ciclo celular, capaz de ligar-se a duas bases purínicas na mesma fita de ADN, entre o nitrogênio (N) 7 de uma guanina e o N3 de uma adenina (5'-GA-3') ou entre duas guaninas (5'-GG-3') (Figura 1B), causando o que é chamado de “*intrastrand crosslink*” (IWAMOTO et al., 2004). Este *crosslink* é interpretado pela célula como um *mismatch* que, após repetidas tentativas frustradas de incorporação da base complementar através de mecanismos de reparo do ADN, leva a uma quebra da dupla fita, o que, por sua vez, acaba por induzir a apoptose celular (FINK; AEBI; HOWELL, 1998). Sua dependência da ativação dos mecanismos de reparação do ADN pode explicar, em parte, a existência de dois picos de citotoxicidade do Bu, a 30 e a 50 horas após a administração, apesar de esta característica não ser ainda suficientemente entendida (MORALES-RAMIREZ et al., 2004).

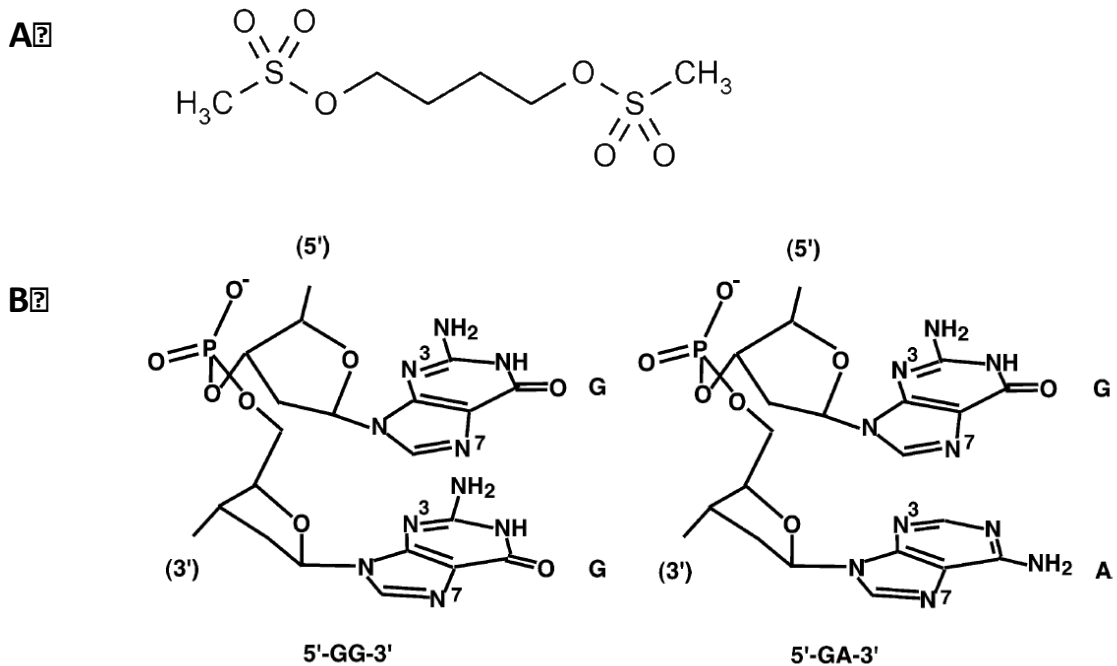


Figura 1. Estrutura do Bu e seus sítios de interação com o ADN. Representação da molécula de Bu (A) e representação de duas fitas de ADN com duas purinas em sequência (GG) à esquerda e (GA) à direita e a indicação dos respectivos átomos de nitrogênio frequentemente implicados na ligação com o Bu (B).

Bu surgiu nos anos 1950 como a principal opção terapêutica contra a leucemia mieloide crônica (LMC) (GALTON; TILL; WILTSHAW, 1958). Seu potencial mielotóxico foi rapidamente reconhecido após a ocorrência de casos de aplasia medular grave durante tratamento de LMC, ocasionalmente irreversíveis, associado ao seu uso em doses mais altas (HASSAN et al., 1994). Este efeito inicialmente indesejado foi logo explorado e Bu em altas doses passou a ser incorporado em condicionamentos pré-TCTH (ELFENBEIN et al., 1978). Atualmente, Bu é amplamente usado; em crianças, aparece como alternativa à irradiação corporal total (ICT), com sobrevida livre de evento (SLE) comparável em pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA) (SISLER et al., 2009) e, com menor impacto cognitivo e no crescimento em sobreviventes a longo prazo (BERNARD et al., 2014; SHI-XIA et al., 2010). Bu também é utilizado nos condicionamentos para TCTH alogênico em LLA e também em

doenças não malignas, como imunodeficiências (GUNGOR et al., 2014; PAI, S. Y. et al., 2014). Além disso, Bu integra regimes de condicionamento usados em TCTH autólogo para neuroblastoma de alto risco (MA et al., 2012; MOLINA et al., 2011; SONI et al., 2014) e linfoma de Hodgkin/não-Hodgkin recaído ou refratário (NIETO et al., 2012).

Bu tem moderada ligação às proteínas plasmáticas (30-50%) e seu metabolismo é basicamente hepático; embora apenas 2% da droga original seja eliminada pela urina, seus metabólitos inativos são 98% excretados por esta via (HASSAN; EHRSSON, 1987; MCCUNE; GIBBS; SLATTERY, 2000). Sua principal via de metabolização é sua conjugação à glutationa (GSH), reação catalisada no citosol dos hepatócitos pelas enzimas glutationa S-transferases (GSTs). A isoenzima α (GSTA), mais precisamente GSTA1, é a mais frequente e mais eficaz enzima nessa reação quando em sua forma de homodímero (GSTA1-1) (CZERWINSKI; GIBBS; SLATTERY, 1996; GIBBS; CZERWINSKI; SLATTERY, 1996). As outras isoformas, μ , π e θ (respectivamente GSTM, GSTP e GSTT), também apresentam essa atividade, mas são menos eficazes. A partir do conjugado GSH-Bu, tetraidrotiofenol (THT, C_4H_8S) é formado por β -eliminação (SCIAN; ATKINS, 2015). THT é excretado pela bile, na qual, quatro horas após a infusão, quase 40% do equivalente da dose de Bu podem ser encontrados antes de serem reabsorvidos em nível intestinal (HASSAN; EHRSSON, 1987). Oxidações sequenciais dão origem ao 1-óxido de THT (C_4H_8SO) e ao sulfolano ($C_4H_8SO_2$), ambos sem atividade citotóxica (CZERWINSKI et al., 1996). Devido ao estado hidrofóbico do sulfolano, uma hidroxilação suplementar é necessária para facilitar sua excreção, dando origem ao 3-hidroxi-sulfolano ($C_4H_7SO_2(OH)$) que representa o principal metabólito urinário do Bu (38% da excreção urinária) (HASSAN; EHRSSON, 1987; HUEZO-DIAZ et al., 2014). Vide Figura 2.

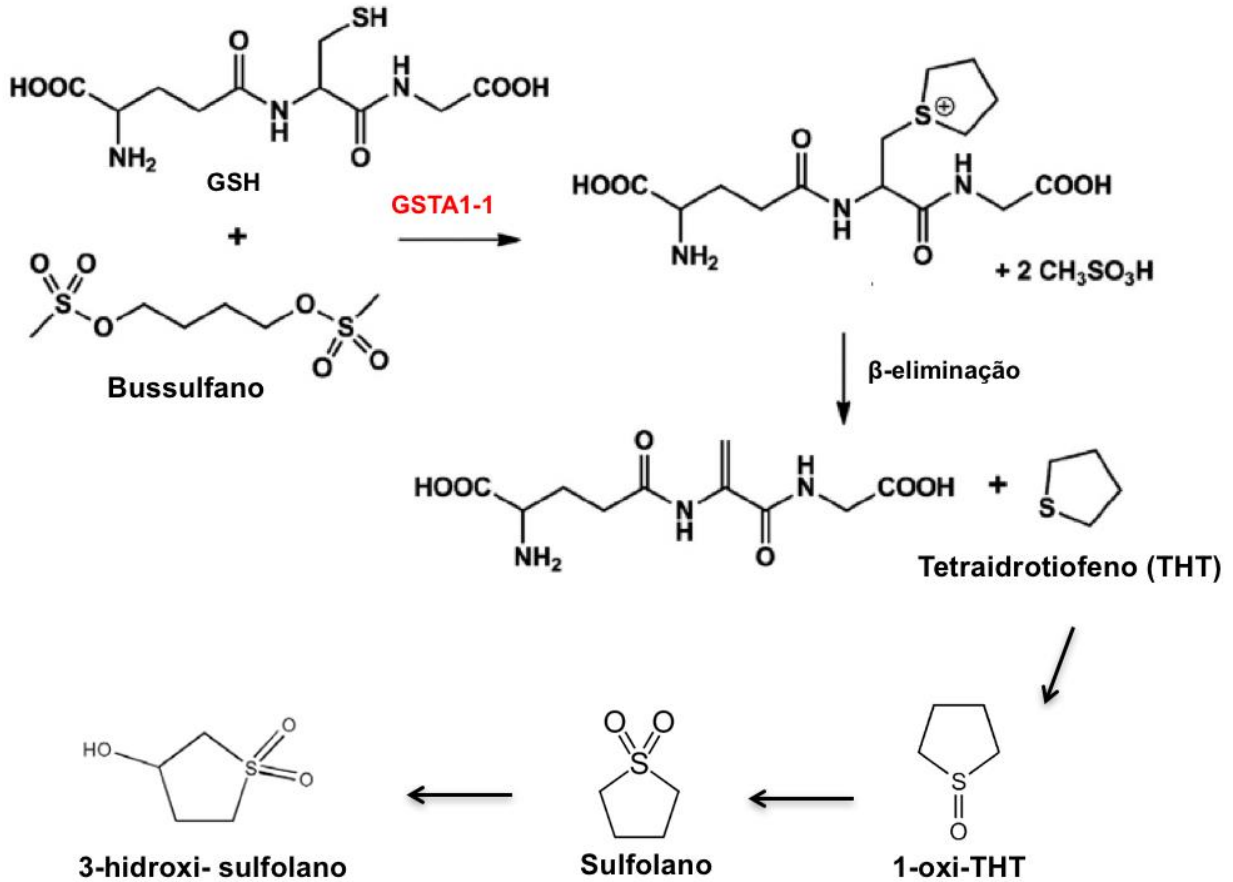


Figura 2. Metabolismo do Bu. Via da metabolização do Bu pela conjugação à GSH, catalisada principalmente pela enzima GSTA1-1.

2.3 TOXICIDADES

Bu apresenta diferentes padrões de toxicidade dependendo da dose utilizada. Quando utilizado em baixas doses por longo período, como ocorria no tratamento de LMC (2-6 mg/dia), fibrose pulmonar e aplasia medular de instalação e recuperação tardia aparecem como toxicidades mais importantes. Descrita inicialmente em 1961 (OLINER et al., 1961), a fibrose pulmonar, uma toxicidade grave e rara, foi de tal forma ligada ao Bu que a denominação de “pulmão de bussulfano”

foi utilizada para descrevê-la. Um quadro de fibrose pulmonar progressiva e potencialmente irreversível manifesta-se clinicamente por dispneia e tosse associadas a febre, fraqueza e perda de peso em pacientes em uso crônico de Bu. No início dos anos 1980, 14 casos (incluindo duas crianças) haviam sido descritos. Pacientes relatavam em média 50 meses de uso da droga (entre 10 meses e 10 anos) antes do diagnóstico (OAKHILL et al., 1981). Atualmente sua ocorrência é extremamente rara, desde que o uso de Bu para LMC foi abandonado em favor da hidroxiuréia (HEHLMANN et al., 1993) e do interferon- γ (HEHLMANN et al., 1994; SILVER et al., 1999). No cenário de TCTH, a exposição prévia ao Bu é um fator de risco para o desenvolvimento de pneumonite idiopática (PI), caracterizada por insuficiência respiratória rapidamente progressiva, associada a lesão pulmonar aguda, difusa e não infecciosa. PI é descrita em até 8% das crianças submetidas a TCTH (SAKAGUCHI et al., 2012).

O efeito medular do Bu depende, também, da dose utilizada. Em doses baixas, esse efeito faz-se principalmente pela diminuição das unidades formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) (GUEST; UETRECHT, 2000); já em doses altas, maior sensibilidade dos progenitores eritrocitários (BFU-E, *Burst Forming Unit – Erythroid*) é observada (KUBOTA et al., 1983). O resultado do uso de altas doses é invariavelmente uma supressão medular profunda e irreversível (FRIED; KEDO; BARONE, 1977). Apesar de ser um agente com potencial mieloablativo, Bu não possui propriedades imunossupressoras suficientes para ser usado isoladamente em regimes de condicionamento para TCTH. Assim, ele é comumente associado a outros agentes com potencial imunossupressivo, como a ciclofosfamida (Cy), outro agente alquilante, ou, mais recentemente, a fludarabina (BARTELINK et al., 2014; SADEGHI et al., 2008).

Bu em altas doses, em associação com Cy, também apresenta uma toxicidade direta contra o endotélio. Progenitores de células endoteliais são encontrados com mais frequência na circulação

de ratos expostos à combinação BuCy, em comparação a controles, sugerindo um esforço regenerativo após o insulto citotóxico. Em nível histológico, sinais de sofrimento celular como escassez de citoplasma e ausência de organelas são evidentes nas células endoteliais (ZENG et al., 2010). Compativelmente, no fígado, as células endoteliais sinusoidais (CES), pobres em GSTA1 (VASSORD et al., 2008), apresentam os mesmos sinais de estresse das demais células endoteliais, além de uma evidente quebra na continuidade da parede sinusoidal, associada a um infiltrado de células inflamatórias (QIAO et al., 2015; ZENG et al., 2010). No contexto de TCTH, de 15% a 70% dos pacientes expostos a Bu (dependendo da associação de drogas utilizadas) apresentarão a liberação de diferentes citocinas e o recrutamento de macrófagos e neutrófilos nas regiões perivasculares hepáticas, gerando um distúrbio na microcirculação local, com ativação da coagulação e consequente congestão dos sinusoides. Esses fatores, em conjunto, podem levar à necrose do parênquima hepático (COPPELL et al., 2010; OANCEA et al., 2013; YANNAM et al., 2014). Este quadro é conhecido como doença veno-oclusiva, mais corretamente denominada de síndrome obstrutiva sinusoidal (SOS) (DELEVE; SHULMAN; MCDONALD, 2002).

SOS é uma endoflebite obliterante das veias centrolobulares hepáticas (FAN; CRAWFORD, 2014) que se manifesta clinicamente com aumento de peso, ascite, colestase e hepatomegalia dolorosa (Tabela 1). Insultos hepáticos como irradiação e certas toxinas, além de agentes quimioterápicos estão associados com seu aparecimento (MOHTY et al., 2016).

Tabela 1. Critérios diagnósticos de SOS em adultos.

SOS clássica ≤ 21 dias depois do TCTH	SOS de início tardio > 21 dias depois do TCTH
Bilirrubina ≥ 2 mg/dL E dois dos seguintes critérios: Hepatomegalia dolorosa Ganho de peso >5% Ascite	Critérios de SOS clássica ocorrendo >21 dias depois do TCTH OU Prova histológica de SOS OU Dois dos seguintes critérios: Bilirrubina ≥ 2mg/dL Hepatomegalia dolorosa Ganho de peso >5% Ascite E Evidência hemodinâmica ou ultrassonográfica de SOS

Critérios segundo a Sociedade Europeia de Transplante de Medula Óssea (EBMT, em inglês). Ressalta-se que até 30% das crianças podem não apresentar aumento da bilirrubina e que esses critérios devem ser utilizados com cautela. Adaptado de Mothy *et al.* (MOHTY *et al.*, 2016). SOS: síndrome obstrutiva sinusoidal; TCTH: transplante de células-tronco hematopoiéticas.

SOS foi descrita por Willmot *et al.*, em 1920, como uma condição letal marcada por dor abdominal importante e ascite, surgidas após ingestão de pão feito com trigo coletado em campos contaminados com uma planta chamada *Senecio ilicifolius* ou *burchelli*. Curiosamente, os indivíduos atingidos por SOS, neste caso, eram europeus pobres vivendo na África do Sul, para os quais, no início do século XX, o pão era parte fundamental da dieta (WILLMOT FC, 1920). SOS tem sido descrita após quimioterapia em associação com outros agentes, como os derivados de platina (ROBINSON *et al.*, 2013) e ozogamicina (TALLMAN *et al.*, 2013); no entanto, os regimes de condicionamento usados em preparação para TCTH que contêm Bu representam, atualmente, a causa mais importante de SOS (COPPELL *et al.*, 2010). Após o condicionamento, SOS é

geralmente diagnosticada nas primeiras três semanas após a infusão do enxerto (MOHTY et al., 2016). Em casos mais graves, a mortalidade pode chegar a 60-80% (COPPELL et al., 2010). Embora frequentemente autolimitada, SOS é responsável por comorbidades importantes, como trombocitopenia grave, muitas vezes refratária à transfusão de concentrado de plaquetas; sangramentos; dor hepática de difícil controle; ascite massiva, à restrição respiratória (com necessidade de suporte ventilatório) e, por vezes, à instalação de dreno peritoneal para alívio da pressão abdominal, o que aumenta os riscos de complicações cirúrgicas e infecciosas (COPPELL et al., 2010). Essas condições acarretam aumento no sofrimento do paciente e de sua família, atrasos no plano de tratamento e um aumento importante de custos.

A mucosite grave também figura entre as toxicidades frequentemente observadas após utilização de condicionamentos que incluem Bu (47 a 97%), incidência comparável a outros regimes mieloablativos (BEN-BAROUCHE et al., 2016; CHAUDHRY et al., 2016). Bu ultrapassa facilmente a barreira hematoencefálica e atinge altos níveis no líquido cefalorraquidiano (HASSAN et al., 1989). Assim, apresenta efeito neurotóxico, clinicamente manifestado por convulsões generalizadas em até 7,5% quando administrado em doses mais elevadas (1,7% em crianças que receberam doses totais < 16 mg/Kg contra 15,4% naqueles que receberam doses maiores) (VASSAL et al., 1990). Por essa razão, o uso de anticonvulsivante profilático tornou-se prática durante os dias de infusão de Bu, o que reduziu os casos de convulsão atribuíveis ao Bu a 0,5% em crianças. (CASELLI et al., 2014).

Insuficiência gonadal ocorre, a médio e longo prazo, em 30-70% dos pacientes submetidos a TCTH após uso de agentes alquilantes em geral (OVERBEEK et al., 2017), principalmente em meninas. Sua frequência tende a ser maior com Bu (TEINTURIER et al., 1998). Impacto no crescimento e desenvolvimento intelectual são também complicações relatadas após o seu uso, apesar de menos frequentes em comparação ao uso de ICT (BERNARD et al., 2014). Ademais, as

complicações mais frequentes não decorrem especificamente da droga e estão mais associadas às consequências de aplasia prolongada, como sangramentos e infecções graves.

O perfil de toxicidade do Bu está claramente ligado à dose (como será abordado na seção 2.5), mas também aos outros agentes utilizados em associação durante o condicionamento. Os chamados condicionamentos de toxicidade reduzida – dentre os quais a associação com Fludarabina (BuFlu) aparece como o mais frequentemente utilizado – apresentam toxicidade menor que a associação com um segundo agente alquilante, como a ciclofosfamida (BuCy), implicando resultados promissores no tratamento tanto de doenças malignas como benignas (BARTELINK et al., 2014). Por outro lado, a associação de dois agentes alquilantes ao Bu foi relacionada a um aumento significativo da sua toxicidade (BARTELINK et al., 2016).

2.4 FARMACOCINÉTICA DO BUSSULFANO

Bu foi inicialmente empregado em TCTH na forma oral (VO), a única disponível para o uso em pacientes com LMC (ELFENBEIN et al., 1978). Bu VO apresenta concentração máxima da droga (C_{max}) em média de 1,5 a 2,5 horas após sua administração (MCCUNE et al., 2000). Sua biodisponibilidade foi inicialmente verificada em estudo composto por oito adultos e oito crianças sujeitos a extensivo estudo de FC após doses VO. Entre os adultos, a biodisponibilidade mostrou-se mais estável, variando entre 71 e 103%, com apenas uma paciente com valor inferior a 50%. No entanto, em crianças (1,4 a 6 anos), a biodisponibilidade foi claramente mais errática, variando entre 22 e 120% (HASSAN et al., 1994). Este achado foi posteriormente explicado pelo aumento da conjugação do Bu com a GSH nos enterócitos, cerca de 77% maior em menores de 3 anos quando comparado a crianças mais velhas e adolescentes (GIBBS et al., 1999). Esses resultados

foram demonstrados através de biópsias retiradas da terceira parte do duodeno de indivíduos saudáveis de 1 a 3 anos (n=6) e de 9 a 17 anos (n=9), que efetuaram endoscopia digestiva para investigação de esofagite secundária a refluxo gastresofágico (GIBBS et al., 1999).

Não obstante, existe uma variabilidade interindivíduo considerável na eliminação do Bu. Tanto em adultos quanto em crianças, o coeficiente de variação (CV) do *clearance* aparente (CL/F) do Bu chega a mais de 50%, como mostra a Tabela 2 (MCCUNE et al., 2000). Em crianças, além de uma biodisponibilidade menor, a eliminação do Bu relevou-se mais acelerada. Em estudo comparando doses equivalentes IV e VO, o *clearance* do Bu (CL do Bu) controlado pelo peso foi 45% mais elevado em crianças quando comparado a adultos, independentemente da via de administração (HASSAN et al., 1994). Gibbs *et al.* (GIBBS et al., 1997) demonstrou resultado semelhante em análise comparando 14 crianças abaixo de 4 anos com 11 adultos e adolescentes acima de 12 anos. Neste estudo, além de o CL do Bu se mostrar duas vezes mais elevado em crianças que em adultos (média $0,44 \pm 0,22$ contra $0,19 \pm 0,05$ L/h/Kg, $p=0.0012$), também apresentou variabilidade maior naquela faixa etária. A evidência de maior concentração sérica do metabólito THT demonstra uma maior conjugação do Bu com a GSH, sugerindo uma atividade aumentada de GST nas crianças em comparação aos adultos (relação $(AUC_{THT+}/AUC_{Bu})_{0-6}$ após a primeira dose: 0,06 contra 0,04, respectivamente, $p=0,01$). A capacidade de eliminação, entretanto, não se apresenta constante ao longo de toda a infância. Em estudo com 135 crianças entre 0 e 16 anos, o CL/F foi maior entre 0 e 4 anos ($0,41 \pm 1,16$ L/h/Kg), sendo 14% menor entre 5 e 8 anos ($p=0,001$) e 49% menor entre 9 e 16 ($p<0,001$) (GIBBS et al., 1999). O declínio da eliminação do Bu conforme avança a idade independe de o CL ser expresso em relação ao peso total ou à área de superfície corporal, o que sugere que esse declínio não pode ser explicado somente pela diminuição da relação entre o tamanho do fígado e o do corpo total dos indivíduos, reforçando a teoria de haver diminuição da capacidade de metabolização do Bu com o aumento da idade (MCCUNE et al.,

2000). Esta imprevisibilidade associada à administração enteral faz da formulação IV a mais apropriada para o uso do Bu em TCTH pediátrico, principalmente em crianças mais jovens.

Tabela 2. Resumo dos resultados dos estudos abordando CL/F do Bu VO.

N	Intervalo de idade (anos)	CL/F (L/h) por Kg	CV %	Referência
14	1-3,6	0,5 ± 0,26	52,0	(GROCHOW et al., 1990)
25	Adultos	0,15 ± 0,08	53,3	
8	1,8 - 6	0,31 ± 0,13	41,9	(HASSAN et al., 1994)
8	13 - 60	0,22 ± 0,08	36,4	
10	0,5 - 3	0,62 ± 0,24	38,7	(VASSAL et al., 1989)
6	7,2 - 19,1	0,4 ± 0,1	25,0	
11	0,3 - 4	0,57 ± 0,39	68,4	(SLATTERY et al., 1995)
19	13 - 56	0,2 ± 0,08	40,0	
3	4 - 4	6,6 ± 0,6*	9,1	(REGAZZI et al., 1993)
9	5 - 14	7,3 ± 4*	54,8	
15	1,9 - 4	0,29 ±	24,1	(VASSAL et al., 1992)
10	4,2 - 14	0,26 ±	38,5	

CV: coeficiente de variação. CL/F: *clearance* aparente por quilo de peso. * Em Regazzi *et al.* (REGAZZI et al., 1993), CL/F foi dividido pela área de superfície corporal em m². Adaptado de McCune *et al.* (MCCUNE et al., 2000).

Altamente hidrofóbico e suscetível à hidrólise em contato com solventes à base de água, o Bu teve seu uso IV possível após associação de cossolventes como polietilenoglicol (PEG) 400 e N,N-dimetilacetamida (DMA), a qual passou a garantir suas solubilidade e estabilidade (http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Scientific_Discussion/human/000472/WC500052062.pdf). Em 1999, Bu IV foi autorizado para uso em TCTH pela *Food and Drug Administration* (FDA), órgão regulador dos EUA, como Busulfex® (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2015/020954s014lbl.pdf). Atualmente, é utilizado no Canadá e, desde 2003 teve seu uso liberado pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) (<http://www.ema>.

europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Product_Information/human/000472/WC500052066.pdf) sob o nome comercial de Bulsivex®, produto atualmente autorizado para uso no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=12279822016&pIdAnexo=3085832) desde 2011. No entanto, mesmo com a diminuição da variação devido à biodisponibilidade com sua utilização IV, a FC do Bu mostra-se ainda associada a grande variabilidade interindivíduos. Em estudo realizado durante os primeiros anos após a entrada no mercado do Bu IV, seu CL expresso segundo o peso variou mais de três vezes (0,14-0,45 L/h/Kg, mediana 0,22 L/h/Kg) em 20 pacientes entre 0,8 e 14,9 anos (mediana 5,5 anos) e mostrou a mesma evidência de um CL maior em crianças mais jovens, como previamente observado com Bu VO ($0,27 \pm 0,04$ L/h/Kg em menores de 6 anos de idade contra $0,2 \pm 0,04$ L/h/Kg em crianças maiores, $p=0.03$) (TRAN et al., 2004). Atualmente, esta variabilidade entre sujeitos (VES) é preferencialmente abordada por meio de modelos de FC populacional em que concentrações de Bu ao longo do tempo são escrutinadas mediante análise não linear mista, e covariáveis como idade e peso são testadas como fatores de melhora da predição dos parâmetros individuais de FC. Dessa forma, a idade como fator de maturação do metabolismo do Bu parece associar-se ao CL da droga em alguns modelos (MCCUNE et al., 2014; SAVIC et al., 2013), enquanto outros parecem melhor explicar essa associação exclusivamente por meio de representação alométrica do peso total ou área de superfície corporal dos pacientes (BARTELINK et al., 2012; BOOTH et al., 2007; BUFFERY et al., 2014; LONG-BOYLE et al., 2015; NGUYEN et al., 2004; PACI et al., 2012; TRAME et al., 2011; VEAL et al., 2012) (vide seção 2.8).

2.5 ÍNDICE TERAPÊUTICO DO BUSSULFANO

A capacidade de prever a variabilidade do Bu passou a ser crucial quando o grau de exposição à droga mostrou associação importante com sua toxicidade. No caso de outras drogas também usadas em oncologia, como a doxorubicina, essa exposição é determinada pela dose acumulada, tendo os pacientes que receberam doses acima de 300 mg/m^2 um risco significativamente mais alto de desenvolver miocardiopatia sintomática (RR 11,8, CI95% 1,6 – 59,5) quando comparados àqueles que receberam doses menores (KREMER et al., 2001). A FC do Bu, no entanto, apresenta variabilidade importante entre diferentes indivíduos tratados com doses equivalentes, que podem apresentar diferentes níveis de exposição à droga (MCCUNE et al., 2000) e, conseqüentemente, riscos diferentes de complicação. Mediante estudo da FC individual, obtêm-se parâmetros mais confiáveis de expressão da exposição ao Bu, como a concentração de *steady-state* (C_{ss}) e a área do gráfico de distribuição das concentrações aferidas ao longo do tempo após a infusão, conhecida como área sob a curva (AUC, *area under the curve*, em inglês) (VASSAL et al., 1992).

O Bu é reconhecido como tendo um índice terapêutico estreito, e diferentes medidas de AUC ou C_{ss} mostraram-se associadas a diferentes desfechos clínicos (importante mencionar que a relação entre AUC e C_{ss} respeita a fórmula $AUC = C_{ss} \times \tau$, onde τ é o intervalo de tempo entre as doses). Estudos realizados majoritariamente em adultos revelaram que uma maior exposição ao Bu está relacionada a um aumento das toxicidades associadas à droga, como a SOS (COPELAN et al., 2001; DIX et al., 1996; GROCHOW, 1993; MCCUNE et al., 2000; SLATTERY et al., 1995). Entretanto, a SOS é claramente associada ao potencial hepatotóxico do Bu, sendo este compartilhado por outras drogas usadas em associação em TCTH. Fato que, associado à heterogeneidade dos estudos disponíveis, demanda cautela na interpretação dos seus resultados (MCCUNE et al., 2000).

A ciclofosfamida (Cy), um agente alquilante derivado da mostarda nitrogenada, frequentemente usada em conjunto com Bu, também é associada à toxicidade hepática, principalmente em nível das CES (DELEVE, 1996). Em estudo prospectivo composto por 147 adultos que receberam ICT e Cy 120mg/m² como condicionamento, 38% dos pacientes desenvolveram SOS, e a AUC do metabólito da Cy, mostarda de *o*-carboxetil-fosforamida, revelou-se significativamente aumentada em pacientes com diagnóstico de SOS grave ou moderada ($569 \pm 332 \mu\text{M.h}$, $p=0,0002$) e SOS leve ($440 \pm 124 \mu\text{M.h}$, $p=0,01$) quando comparados aos pacientes que não desenvolveram SOS ($369 \pm 126 \mu\text{M.h}$) (MCDONALD et al., 2003). Por outro lado, quando analisados os regimes de condicionamento reconhecidamente associados a menor hepatotoxicidade, como BuFlu, no quais a incidência de SOS é rara (0 a 3%) (BARTELINK et al., 2014; PIDALA et al., 2010), a SOS, frequentemente de início mais tardio quando presente, também está associada ao grau de exposição ao Bu, demonstrando um efeito independente desta droga (PAI, R. K. et al., 2012; PERKINS et al., 2012).

Em adultos que receberam Bu IV (3,2mg/Kg/dia q24h \times 4 dias) e Flu (50mg/m²/dia \times 5 dias) antes de TCTH alogênico e que foram objeto de estudo de FC do Bu obtido após infusão da terceira dose, uma $\text{AUC}_{0-\infty} > 6.000 \mu\text{M.min}$ esteve significativamente associada a menor sobrevida global (SG) a 3 anos pós-TCTH (14%, contra 59%) e sobrevida livre de progressão (SLP) (16% contra 58%), independentemente de outros fatores potenciais de confusão. Esse resultado pode ser em grande parte explicado pela maior mortalidade não relacionada à recaída (MNR) no primeiro ano nos pacientes com $\text{AUC} > 6.000 \mu\text{M.min}$ (38% contra 14%). A presença de DECH não esteve associada com a AUC (GEDDES et al., 2008).

Apesar da incidência de DECH não mostrar relação com o grau de exposição ao Bu no estudo acima, Andersson *et al.* (ANDERSSON et al., 2002) já haviam demonstrado anteriormente que AUC_{6h} mais altas nos pacientes adultos submetidos a TCTH por LMC após condicionamento tipo

BuCy2 estavam relacionadas com aumento na incidência de DECHa ($p<0,01$), toxicidade gastrointestinal ($p=0,01$) e hepática ($p<0,01$), além de diminuição da SG ($p=0,04$). Uma AUC_{6h} alvo entre 950 e 1.520 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ foi proposta por associar-se, neste estudo, a melhor sobrevida e menor toxicidade relacionada ao TCTH. Apesar da presença de uma tendência de associação, a presença de mucosite mais grave (grau II - IV) não foi dependente do grau de exposição ao Bu em ambos os estudos mencionados.

Enquanto a associação entre hiperexposição à droga e toxicidades parece clara, há fortes evidências que apontam igualmente para resultados inferiores entre pacientes subexpostos ao Bu. Stattely *et al.* (SLATTERY *et al.*, 1997), nos anos 1990, mostraram que pacientes adultos com LMC tratados com TCTH alogênico aparentado após BuCy2 apresentaram 38% de recaída quando expostos a uma AUC_{6h} menor que 1.339 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ ($C_{ss} = 916 \text{ ng/mL}$), a mediana da coorte estudada. Pacientes acima desse *cut-off* não apresentaram, no entanto, maior toxicidade (em comparação ao grupo de menor exposição); além disso, nenhum paciente apresentou recaída da doença da base durante três anos após TCTH.

Além de associar-se a uma eliminação insuficiente das células neoplásicas, a subexposição ao Bu parece ser insuficiente também na eliminação das células hematopoiéticas do receptor, aumentando o risco de falha de pega do enxerto ou rejeição das células infundidas. Em estudo que incluiu adultos e crianças, oito de 18 pacientes com C_{ss} inferior a 600ng/mL (equivalente a uma AUC_{6h} de 877 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$) tiveram rejeição do transplante, contra apenas 1 de 23 pacientes com $C_{ss} > 600 \text{ ng/mL}$ (MCCUNE *et al.*, 2000; SLATTERY *et al.*, 1995).

Em crianças, a definição da melhor faixa terapêutica é menos evidente. Com relação ao risco de rejeição, McCune *et al.* (MCCUNE *et al.*, 2002), baseados em resultados obtidos em 50 crianças tratadas com BuCy4 e TCTH, mostraram que a probabilidade de rejeição era de 55% quando a C_{ss} das duas primeiras doses era inferior a 200 ng/mL; sendo inferior a 12% quando a mesma C_{ss} era

> 600 ng/mL. Em outro estudo, Bolinger *et al.* (BOLINGER et al., 2001) observaram que reconstituição autóloga e rejeição eram significativamente mais frequentes em pacientes com C_{ss} < 600 ng/mL ($p=0,02$). Curiosamente, Ansari *et al.* (ANSARI et al., 2014), em investigação incluindo 75 crianças, a maioria delas tratada com BuCy4 (89%), mostrou uma associação entre C_{ss} da primeira dose de Bu > 600 ng/mL e uma maior incidência de MNR ($p < 0,001$) e DECHa grau 2-4 ($p = 0,04$), o que se refletia em menor sobrevida livre de evento (SLE) e SG ($p < 0,001$ e $p = 0,001$, respectivamente), sem diferença, entretanto, na incidência de falha de pega ou rejeição. Esta publicação sugere que pacientes que tenham uma C_{ss} < 600 ng/mL depois da primeira dose teriam maior capacidade de metabolização do Bu e, portanto, menor risco de toxicidades relacionadas à droga. Deve-se ressaltar que, neste último estudo, a dose de Bu foi ajustada de acordo com a C_{ss} da primeira dose, de maneira que a dose cumulativa de Bu recebida se encontrava dentro do valor alvo para a grande maioria dos pacientes.

Mais recentemente, Bartelink *et al.* (BARTELINK et al., 2016), em estudo multicêntrico realizado em 449 pacientes com mediana de idade de 4,5 anos (entre 0,1 e 30 anos), abordou a adequação a esse grupo etário da faixa terapêutica do Bu considerada “histórica” pelos autores, ou seja, C_{ss} entre 600 ng/mL e 900 ng/mL ou o equivalente a uma AUC_{6h} de 900 a 1.350 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ (MCCUNE et al., 2000). Em análise retrospectiva, validada em outros 225 pacientes, uma nova faixa de valores associada a uma maior SLE foi proposta: C_{ss} entre 817 e 1.050 ng/mL (AUC_{6h} entre 1.225 e 1.575 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$) (Figura 3). Uma AUC acumulada (16 doses) equivalente a uma AUC_{6h} inferior a 1.225 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ foi relacionada a aumento de falha de pega e a recaída da doença de base (HR=0,57, $p=0,004$), enquanto a exposição excessiva, aqui considerada como AUC acumulada equivalente a AUC_{6h} acima de 1.575 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$, esteve associada a maior MNR (HR=2,99, $p<0,001$). Com base nestes novos limites considerados “ótimos”, AUCs elevadas estiveram relacionadas com aumento de toxicidades agudas (HR=1,69, $p=0,013$), assim como a

associação de mais dois agentes alquilantes no regime de condicionamento (HR=1,69, $p<0.01$). Ressalte-se, porém, que as AUCs para estas análises foram calculadas segundo modelos não lineares de efeitos mistos (NONMEM) baseados em três estudos de FC populacional previamente publicados (BARTELINK et al., 2012; LONG-BOYLE et al., 2015; SAVIC et al., 2013), e que esse método de cálculo apresentou AUCs 9% maiores que aquelas obtidas pelo método mais comumente utilizado, $AUC_{0-\infty}$ medida por análise não compartimental (BARTELINK et al., 2016).

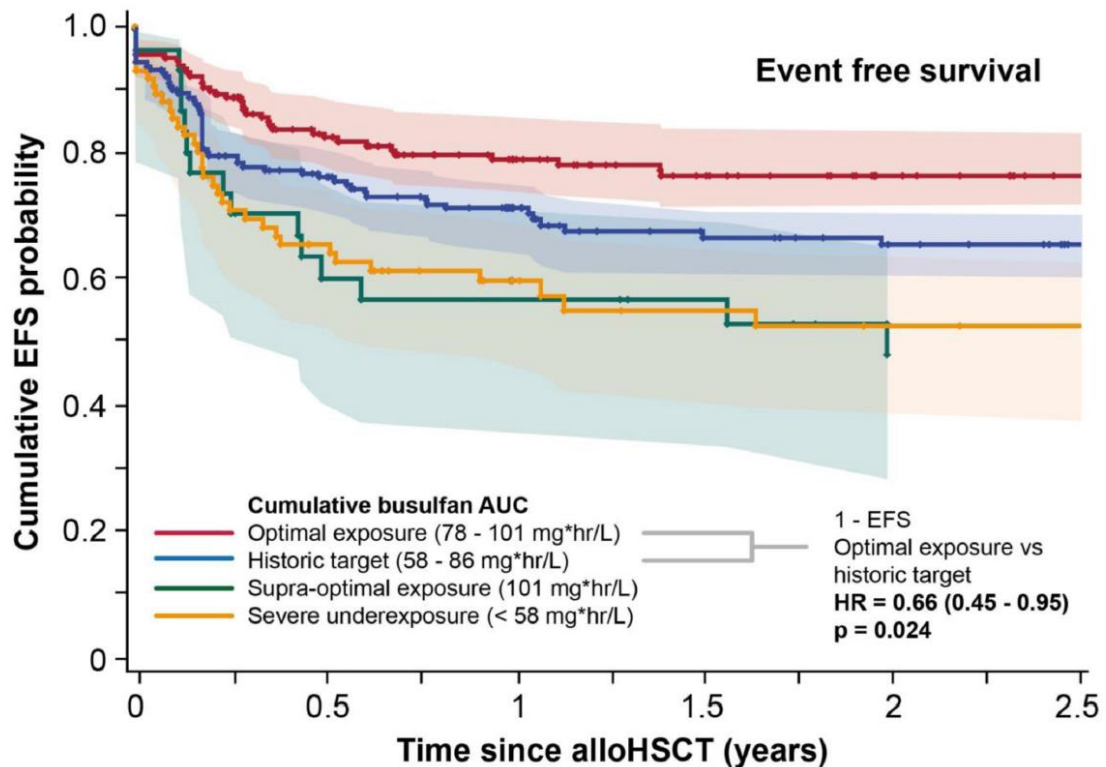


Figura 3. Gráfico de Kaplan-Mayer da SLE segundo a AUC acumulada. SLE: sobrevida livre de eventos (EFS, em inglês). Duas faixas terapêuticas foram analisadas: a faixa considerada “histórica” (58 – 86 mg*hr/L, equivalente a 900 – 1.350 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$), e a “ótima”, proposta por Bartelink *et al.* (78 – 101 mg*hr/L, equivalente a 1.225 – 1.575 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$) (BARTELINK et al., 2016). Como mostra a figura, a nova faixa proposta esteve associada a uma melhor SLE (HR=0,66, $p=0.024$).

Apesar do seu estreito índice terapêutico, o ajuste de dose baseado no estudo dos parâmetros de FC ao longo do tratamento não é amplamente empregado, sendo sugerido preferencialmente no caso de pacientes que recebem Bu em altas doses (dose total acumulada >8 mg/Kg), principalmente em associação com Cy (PALMER et al., 2016). O uso da então chamada monitorização de dose terapêutica (MDT) do Bu demonstrou aumento da incidência de pega do enxerto em crianças (BOLINGER et al., 2001) e diminuição de toxicidade relacionada ao tratamento em adultos (ANDERSSON et al., 2017; GROCHOW, 1993; MCCUNE et al., 2000; PIDALA et al., 2010), porém a heterogeneidade das doenças de base e dos condicionamentos utilizados nesses estudos torna difícil a indicação generalizada de MDT (PALMER et al., 2016). No entanto, principalmente em um grupo de alta variabilidade de FC como o pediátrico, os fatores abordados no presente documento fazem da utilização de MDT do Bu uma prática adequada e recomendada para o acompanhamento dessa droga crucial no regime de condicionamento para TCTH.

2.6 FARMACOGENÉTICA / FARMACOGENÔMICA

Enquanto o estudo do efeito de drogas em função de variações do DNA e/ou do RNA é chamado de farmacogenômica (PGx, do inglês), o impacto na farmacocinética e/ou farmacodinâmica de drogas associado a um só gene é matéria de interesse da farmacogenética (PG, do inglês). Ambas as denominações se baseiam em um conceito não tão recente de terapia personalizada: há registros de que esteve presente em medicinas tradicionais antigas, como a chinesa, a ayurvédica, a tibetana etc, visando à adaptação do tratamento a características individuais dos pacientes (BURT; DHILLON, 2013). Na medicina moderna, com o advento do que conhecemos hoje como genética, após a descrição do DNA por James Watson e Francis Crick em

1953 (WATSON; CRICK, 1953), essas características pessoais passaram a ser descritas como variações genéticas. Um artigo clássico publicado por Arno G. Motulsky no *Journal of the American Medical Association* (JAMA) em 1957 sugeria que “reações de sensibilidade a certas drogas (...) poderiam ser causadas por mecanismos (genéticos) semelhantes” (GURWITZ; MOTULSKY, 2007; MOTULSKY, 1957). Motulsky descreveu duas reações adversas a medicamentos que poderiam ser explicadas por deficiências de enzimas causadas por mutações genéticas: anemia hemolítica causada por certas drogas em pacientes deficientes de glicose-6-fostato desidrogenase (G6PD), assim como apneia prolongada após uso de succinilcolina em anestesia, associada à deficiência de pseudocolinesterase foram descritas neste artigo. No entanto, somente em 1968 a primeira evidência do papel da carga genética da resposta a um medicamento seria descrita por Vessel *et al.* (VESELL; PAGE, 1968) quando diferenças de FC de dicumarol, um anticoagulante oral e precursor da varfarina, foram evidenciadas em um estudo em gêmeos mono e dizigóticos. Com o avanço do sequenciamento genômico, diversas variações genéticas têm sido identificadas como preditoras de resposta a diferentes drogas. Atualmente, a FDA disponibiliza uma lista de mais de 200 medicamentos cujas bulas contêm recomendações baseadas em informações de PG e/ou PGx (<https://www.fda.gov/drugs/scienceresearch/researchareas/pharmacogenetics/ucm083378.htm>).

Também estão disponíveis recomendações sobre a introdução dos dados de PG/PGx no desenvolvimento de novos medicamentos e a inclusão desses dados em ensaios clínicos precoces de fase I e II (BURT; DHILLON, 2013) no intuito comum de melhorar a eficácia e diminuir a incidência de toxicidades relacionadas à droga.

2.7 VARIANTES GENÉTICAS DE GSTs

Como exposto acima, a GST é importante na catalisação da conjugação do Bu à GSH, sendo esta a principal via de metabolização da droga. A família das GSTs citosólicas em humanos é composta pelas classes α (GSTA), μ (GSTM), π (GSTP) e θ (GSTT) e são expressas principalmente em hepatócitos, apesar de também apresentarem expressão em enterócitos, no intestino delgado (GIBBS; YANG; SLATTERY, 1998) Entre as enzimas da superfamília de GSTs, os genes de GSTA1, GSTM1, GSTP1 e GSTT1 são altamente polimórficos e têm sido associados a níveis diferentes de atividade ou expressão da enzima (ANSARI et al., 2017; BREDSCHNEIDER et al., 2002; MOYER et al., 2007; MOYER et al., 2008).

GSTM1 e *GSTT1* apresentam deleções frequentes associadas à extinção completa da transcrição proteica (MOYER et al., 2007). A variante genética mais frequente de *GSTP1* é um polimorfismo de nucleotídeo único (ou *single nucleotide variant*, SNV, em inglês) não sinônimo que envolve a região funcional da molécula, alterando sua especificidade, o que, conseqüentemente, afeta seu nível de atividade (MOYER et al., 2008). Detalhes sobre os polimorfismos de *GSTM1*, *GSTM1* e *GSTP1*, assim como suas frequências alélicas, estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3. Polimorfismos mais frequentes dos genes *GSTP1*, *GSTM1* e *GSTT1*.

Gene	Variante genética	Frequência alélica				Fenótipo
		AA	CA	HCA	MA	
<i>GSTP1</i>	313G>A (p.Ile105Val)	43%	33%	12%	21%	22% da atividade <i>Wild type</i>
<i>GSTM1</i>	<i>Null</i>	51%	71%	78%	66%	Ausência de transcrito
<i>GSTT1</i>	<i>Null</i>	49%	34%	74%	66%	Ausência de transcrito

Frequências em populações de ascendência africana (AA), caucasiana (CA), asiática (HCA) e hispânica (MA) e associações fenotípicas encontradas (MOYER et al., 2007; MOYER et al., 2008).

A GSTA1 é a enzima mais importante da superfamília das GSTs, encontrada em alta concentração em hepatócitos (até 5% do total de proteínas solúveis) (GIBBS et al., 1998). Não obstante, quando na sua forma de homodímero (GSTA1-1), apresenta também maior afinidade ao Bu em comparação às outras formas de GSTs (GSTM1-1, e GSTP1-1 tem, respectivamente, 46% e 18% da atividade de GSTA1-1 por miligrama de proteína) (CZERWINSKI et al., 1996). A expressão de seu gene (*GSTA1*), porém, apresenta níveis dependentes de polimorfismos pontuais, que ocorrem na região promotora do gene (nucleotídeos -1142 a -69) e que se têm mostrado mais bem representados por haplótipos, como exposto na Tabela 4.

Tabela 4. SNVs que compõem os haplótipos do gene *GSTA1*.

Haplótipo	-69 (C>T)	-513 (A>G)	-631 (T>G)	-1142(C>G)	MAF	Pcts.
<i>*A1</i>	C	A	T	C	38%	63%
<i>*A2</i>	C	A	G	C	24%	40%
<i>*A3</i>	C	A	T	G	0,3%	1%
<i>*B1a</i>	T	A	G	G	30%	53%
<i>*B1b</i>	T	G	G	G	3%	7%
<i>*B2</i>	T	A	G	C	4%	9%

Frequências de alelo menor (MAF, em inglês) dos haplótipos de *GSTA1* em população de 138 pacientes de maioria caucasiana (73%). O percentual de pacientes portadores dos respectivos haplótipos também foi expresso (Pcts) (ANSARI et al., 2017). SNVs: variantes de nucleotídeos únicos.

Responsáveis quase que exclusivamente pela eliminação do Bu, os genes *GSTA1*, *GSTM1*, *GSTP1* e *GSTT1* tiveram suas variantes analisadas por vários grupos na tentativa de associar os diferentes níveis de atividade/expressão de seus produtos à conhecida variabilidade da FC da droga

e, conseqüentemente, aos desfechos clínicos em pacientes que receberam altas doses de Bu em contexto de TCTH. A Tabela 5 resume os principais achados desses estudos.

Tabela 5. Sumário dos achados clínicos e de FC associados a SNVs dos genes das GSTs.

Referência	N	Intervalo de idade (anos)	Condicionamento	Genes testados	Achados clínicos	Achados de FC
(TEN BRINK et al., 2012)	66	25 – 70	3% BuCy2 97% NMA	<i>GSTAI</i> <i>GSTP1</i> <i>GSTM1</i>	NS	14% de redução do CL Bu por cada alelo <i>GSTAI</i> * <i>B</i>
(LEE et al., 2012)	24	0,9 – 18,1	70,8% BuFlu	<i>GSTAI</i> <i>GSTM1</i> <i>GSTT1</i>	NS	NS
(ELHASID et al., 2010)	18	4 – 16	100%Bu(VO)Cy2	<i>GSTAI</i> <i>GSTP1</i> <i>GSTM1</i> <i>GSTT1</i>	NS	<i>GSTP1</i> 313A>G em homozigose = Cmax 15% menor que heterozigotos <i>GSTAI</i> * <i>A</i> / <i>*B</i> = Cmax 25-30% menor que <i>GSTAI</i> * <i>A</i> / <i>*A</i> ou <i>*B</i> / <i>*B</i>
(ZWAVELI NG et al., 2008)	77	0,2 – 23	40% Bu q6h 60% Bu q24h	<i>GSTAI</i> <i>GSTP1</i> <i>GSTM1</i> <i>GSTT1</i>	<i>GSTM1</i> -null = RR 1,7 para SOS	NS
(KIM, S. D. et al., 2011)	66	16 – 58	39,7% BuCy2	<i>GSTAI</i> <i>GSTP1</i> <i>GSTM1</i> <i>GSTT1</i>	NA	<i>GSTAI</i> * <i>A</i> = maior AUCs (alelo dominante) <i>GSTM1</i> / <i>GSTT1</i> double null = menor CL Bu
(ANSARI et al., 2013)	69	0,1 – 19,9	89,9% BuCy4	<i>GSTAI</i> <i>GSTP1</i> <i>GSTM1</i>	<i>GSTAI</i> * <i>B</i> / <i>*B</i> e <i>GSTAI</i> * <i>B1b</i> / <i>*B1b</i> maior chance de SOS (HR 10 e 5,6, respectivamente). <i>GSTM1</i> -null chance 4x maior de DECHa	<i>GSTAI</i> * <i>A2</i> maior clearance (alelo dominante) <i>GSTM1</i> -null menor clearance

Referência	N	Intervalo de idade (anos)	Condicionamento	Genes testados	Achados clínicos	Achados de FC
(ANSARI et al., 2016)	44	1,5 – 17	100% BuCy ^ε ±Thiotepa	<i>GSTA1</i> <i>GSTM1</i>	<i>GSTM1-null</i> = 5x mais chance de DECHa	<i>GSTA1</i> *A maior clearance (alelo dominante)
(YIN et al., 2015)	25	13 – 61	100% Ara-C + BuCy [†]	<i>GSTA1</i> <i>GSTP1</i>	NS	<i>GSTA1</i> *A/*B menor clearance (alelo dominante) <i>GSTP1 313G</i> menor clearance (alelo dominante)
(BREMER et al., 2015)	114	16 – 65	100% Bu(VO)Cy2	<i>GSTA1</i> <i>GSTM1</i> <i>GSTP1</i> <i>GSTT1</i>	<i>GSTM1-null</i> associado a aumento da mortalidade nos 30 dias pós-TCTH	CL/F Bu 11% e 18% diminuído se presença de 1 ou 2 alelos <i>GSTA1</i> *B , respectivamente Css 60% maior entre pacientes <i>GSTA1</i> *B/*B e <i>GSTT1/GSTM1 double-null</i>
(SRIVASTAVA et al., 2004)	114	2 – 16	100% Bu(VO)Cy4	<i>GSTM1</i> <i>GSTT1</i>	<i>GSTM1-null</i> 3x mais chance de SOS	<i>GSTM1-null</i> menor CL/F Bu
(CHOI et al., 2015)	36	18 – 64	42% BuCy2	<i>GSTA1</i> <i>GSTM1</i> <i>GSTP1</i> <i>GSTT1</i>	NS	<i>GSTA1</i> *B = CL Bu 15% menor
(JOHNSON et al., 2008)	29	0,1 – 18,3	86% BuCy4	<i>GSTA1</i> <i>GSTM1</i> <i>GSTP1</i>	NA	<i>GSTA1</i> *B ou /*B/*B = CL Bu 30% menor
(KUSAMA et al., 2006)	12	20 – 60	50% Bu(VO)Cy2	<i>GSTA1</i>	NA	<i>GSTA1</i> *B CL/F menor
(KIM, I. et al., 2007)	61	17 – 52	100% BuCy2 (VO e IV)	<i>GSTA1</i>	<i>GSTA1</i> *B 2,7x mais chance de DECHa	NA

GSTs: glutathione S-transferases. Bu: busulfano; Cy2: ciclofosfamida 60mg/Kg/dia por dois dias consecutivos, por um total de 120mg/Kg; Cy4: ciclofosfamida 50mg/Kg/dia por quatro dias consecutivos, por um total de 200mg/Kg; [‡]em Ansari *et al.* a dose total de ciclofosfamida variou de 160 a 200mg/Kg; [†] em Yin *et al.* a dose de ciclofosfamida foi de 1,8g/m²/dia em dois dias consecutivos; NMA: regime não mieloablativo; IV: intravenoso; VO: via oral; CL: *clearance* do Bu; CL/F: *clearance* aparente oral do Bu; Cmax: concentração máxima do Bu; C_{ss}: concentração de *steady-state* do Bu; DECHA: doença aguda do enxerto contra o hospedeiro; *GSTM1-null*: deleção dos dois alelos do respectivo gene; *GSTT1/GSTM double-null*: deleção dos dois alelos de ambos os respectivos genes.

Apesar da heterogeneidade dos genes estudados, da faixa etária dos pacientes e dos condicionamentos usados, é quase constante a associação entre presença de alelo *GSTAI -69T*, variação característica dos haplótipos **B*, e uma diminuição da metabolização do Bu. Ademais, algumas publicações indicam que essa associação tem um efeito de dose referente ao número de alelos variantes presentes (ANSARI et al., 2013; YIN et al., 2015). No entanto, pelo menos três diferentes haplótipos contendo *-69T* foram descritos como associados a diferentes níveis de expressão de *GSTAI* (ANSARI et al., 2017) (Figura 4). A combinação *-69T / -513G* (haplótipo **B1b*) apresentou níveis de expressão de *GSTAI* extremamente baixos *in vitro*, o que, *in vivo*, relaciona-se a CL do Bu mais lentos, comparáveis a homozigotos **B/*B* (ANSARI et al., 2017). Baseado nos testes *in vitro*, apoiados pelos dados de FC do Bu, uma classificação em quatro grupos de haplótipos distintos foi proposta, como detalhado na Figura 5. Corroborando a relação entre FC do Bu e sua toxicidade, pacientes identificados como pertencendo ao grupo 4, ou seja, homozigotos **B/*B* ou heterozigotos **B1b*, foram classificados como estando sujeitos a um risco aumentado de toxicidades relacionadas ao tratamento (HR 4,6, IC95% 2,1 – 10, $p < 0,001$), particularmente SOS (HR 7,1, IC95% 2,5 – 20,4, $p < 0,001$), quando comparados aos demais grupos. Pacientes do grupo 4 também apresentaram pior SG quando comparados aos do grupo 1, estes últimos identificados como metabolizadores rápidos do Bu (50% contra 100% em 5 anos, $p = 0,02$) (ANSARI et al., 2017).

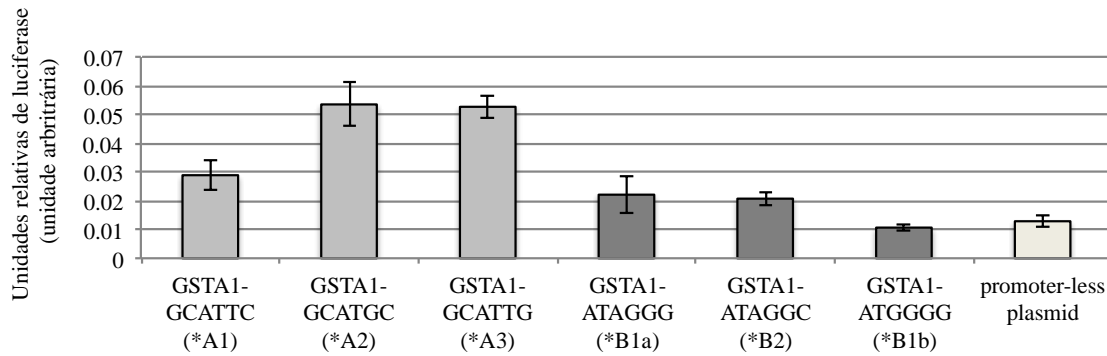


Figura 4. Potencial de transcrição dos diferentes haplótipos de *GSTA1*. Resultados expressos em unidades de luciferase em estudo in vitro utilizando células humanas de hepatoblastoma (HepG2) transfectadas com plasmídeos contendo variantes de *GSTA1* (ANSARI et al., 2017).



Figura 5. Composição dos grupos de haplótipos de *GSTA1*. Grupos nomeados de 1 a 4 conforme proposição de Ansari *et al.* (ANSARI et al., 2017). O grupo é o resultado da intersecção entre a coluna (alelo 1) e a linha (alelo 2), ambos referentes aos dois alelos detectados em cada indivíduo.

2.8 MODELOS DE PREDIÇÃO DE DOSE

Devido à variabilidade interindivíduo e ao estreito índice terapêutico do Bu, a maneira recomendada pelos órgãos de regulação como a FDA para o estudo da sua FC é a análise de FC de população, na tentativa de identificar subgrupos de pacientes em cujas diferenças significativas na distribuição ou eliminação da droga possam afetar sua segurança e eficácia (<https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/UCM072137.pdf>). Esta análise é baseada em dados esparsos de concentração-tempo obtidos de indivíduos de uma determinada população alvo que receberam Bu em um contexto de TCTH. Por meio de modelização não linear de efeitos mistos, a variabilidade entressujeitos (VES) e a variabilidade entreocasiões (VEO) ou intrassujeitos dos dados podem ser determinadas. Fatores como peso, idade e mesmo fatores genéticos possivelmente associados à VES podem posteriormente ser identificados em análise suplementar, o que possibilita a geração de parâmetros específicos para certos grupos de pacientes (WHITING; KELMAN; GREVEL, 1986).

Atualmente, as duas mais importantes agências reguladoras de medicamentos, a FDA e a EMA, baseiam suas recomendações de uso do Bu em crianças em estudos de FC de população publicados em meados dos anos 2000, ambos, por sua vez, baseados em 24 pacientes pediátricos menores de 16 anos (BOOTH et al., 2007; NGUYEN et al., 2004). O desempenho de tais modelos em prever doses que incluam os pacientes dentro do índice terapêutico (considerado aqui uma AUC_{6h} 900 à $1.500 \mu M \cdot min$) já se revelou baixo (24%) (MCCUNE et al., 2000) e desde então diversos *guidelines* de uso do Bu em pediatria foram sugeridos (ANSARI et al., 2013; BARTELINK et al., 2012; BOOTH et al., 2007; BUFFERY et al., 2014; LONG-BOYLE et al., 2015; MCCUNE et al., 2014; NGUYEN et al., 2004; PACI et al., 2012; SAVIC et al., 2013; TRAME et al., 2011; VEAL et al., 2012; WALL et al., 2010; ZWAVELING et al., 2008). Esses *guidelines*, recentemente

revisados, revelaram diferenças importantes da variabilidade final dos diferentes modelos (ZAO et al., 2015).

A maioria dos *guidelines* disponíveis para o uso do Bu em pediatria são baseadas em modelos de FC de população. Esses, na sua maioria, são modelos de um compartimento com excreção de primeira ordem, onde os parâmetros de FC aparecem frequentemente como função do peso corporal total (PCT) elevado a um coeficiente alométrico teórico (0,75 para CL e 1 para V) ou empírico (estimado pelo modelo). Alometria é um interessante conceito, segundo o qual os processos metabólicos não aumentam de forma linear conforme o aumento de tamanho dos seres, mas sim respeitando um exponencial que, através das espécies, tende a ser constante. West *et al.* (WEST; BROWN; ENQUIST, 1999) postulam que a potência de $\frac{3}{4}$ ou 0,75 pode ser explicada por razões geométricas e que esta seria a relação capaz de otimizar a capacidade metabólica de organismos, mesmo unicelulares, favorecendo sua adaptabilidade e consequente subsistência. Baseados no argumento de que este coeficiente alométrico não se mantém ao longo do desenvolvimento, mas sim depende do grau de maturação de vias de metabolismo (CALVIER et al., 2017), alguns modelos estimaram seus coeficientes de forma empírica. Alguns autores estabeleceram um coeficiente alométrico único para toda a coorte (BOOTH et al., 2007; ZWAVELING et al., 2008), enquanto outros determinaram diferentes coeficientes em função do PCT, os quais se mostraram maiores que o coeficiente teórico nos pacientes menores (BARTELINK et al., 2012; PACI et al., 2012). As características dos modelos atualmente disponíveis podem ser vistas na Tabela 6.

Tabela 6. Resumo dos modelos de FC de população do Bu disponíveis em pediatria..

Referência	N	Faixa etária (anos)	Via	τ (h)	Modelo de base	Estimativas	Covariáveis
(LONG-BOYLE et al., 2015)	90	0,1-24	IV	6	Um compartimento com coeficiente alométrico teórico	$CL_{22Kg} = 4,32$ L/h $V_{22Kg} = 15,7$ L	PCT e idade
(MCCUNE et al., 2014)	1.481 (PCT disponível em 133)	0,1 -65,8	IV	6, 8, 12, 24	Dois compartimentos com coeficiente alométrico teórico	$CL_{62Kg\ NFM} = 11,4$ L/h $V_{159Kg\ NFM} = 13,9$ L $Q_{62Kg\ NFM} = 135,2$ L/h $V_{259Kg\ NFM} = 29,9$ L	F_{size} e F_{mat}
(SAVIC et al., 2013)	149	0,1-3,3	IV	6	Um compartimento com coeficiente alométrico teórico	$CL_{8Kg} = 2,3$ L/h $V_{8Kg} = 6,4$ L	PCT, idade, Mat_{mag} e K_{mat}
(BARTELINK et al., 2012)	245	0,1-26	IV	6, 12, 24	Dois compartimentos com coeficiente alométrico empírico variável em função do PCT (1,2 a 0,55)	$CL_{15,3Kg} = 3,47$ L/hg $V_{15,3Kg} = 11,1$ L $Q_{15,3Kg} = 0,5$ L/h $V_{215,3Kg} = 76,8$ L	PCT e idade
(PACI et al., 2012)	115	0-12,3	IV	6	Dois compartimentos com dois coeficientes alométricos em função do PCT: 1,25 se $PCT < 9Kg$ e 0,76 se $PCT \geq 9Kg$	$CL_{9Kg} = 2.18$ L/h $V_{9Kg} = 6.62$ L	PCT

Referência	N	Faixa etária (anos)	Via	τ (h)	Modelo de base	Estimativas	Covariates
(TRAME et al., 2011)	94	0,4-18,8	46% IV	6 (VO) 24(IV)	Dois modelos de dois compartimentos: 1) baseado na ASC e 2) baseado no PCT elevado ao coeficiente alométrico teórico	Modelo baseado na ASC: CL=4,2 L/h/m ² V=18,4 L/Kg Modelo baseado no PCT: CL _{11,9Kg} =4,88 L/h V _{11,9Kg} =21,8 L	PCT ou ASC
(BOOTH et al., 2007)	24	0,25-16,7	IV	6	Um compartimento com coeficiente alométrico empírico (0,742 para o CL e 0,843 para o V)	CL _{20Kg} =4,04 L/h V _{20Kg} =12,8 L	PCT
(NGUYEN et al., 2004)	24	0,45-16,7	IV	6	Um compartimento com coeficiente alométrico empírico para o V (0,85); função log-linear do PCT para o CL.	CL _{22,9Kg} =3,10 L/h V _{22,9Kg} =14,3 L	PCT
(VEAL et al., 2012)	63	0,7-13,1	60% IV	6	Um compartimento com coeficiente alométrico teórico	CL _{13Kg} =13,1 L/h V _{13Kg} =9,8 L	PCT
(ZWAVELING et al., 2008)	77	0,2-23	IV	6, 24	Um compartimento com coeficiente alométrico empírico (0,84 para o CL e 0,98 para o V)	CL _{19Kg} =4,8 L/h V _{19Kg} =15 L	PCT

τ : intervalo entre doses; IV: intravenoso; VO: via oral; CL: *clearance*; V ou V1: Volume de distribuição central; Q: *clearance* intercompartimental; V2: Volume de distribuição no segundo compartimento; PCT: Peso corporal total; ASC: área de superfície corporal; F_{size} e F_{mat}: fatores variáveis de tamanho e maturação, respectivamente, ambos derivados do modelo de McCune *et al.* (MCCUNE et al.); Mat_{mag} e K_{mat}: magnitude de maturação (fixo em 0,46) e constante de maturação (1,4/ano), ambos fatores derivados do modelo de Savic *et al.* (SAVIC et al.).

Em outra tentativa de levar em consideração a maturação do metabolismo do Bu nos modelos de predição, alguns autores incluíram fatores de maturação baseados na idade dos pacientes. Savic *et al.* (SAVIC *et al.*, 2013), por exemplo, em modelo incluindo crianças abaixo de 12 Kg, derivaram de seus dados um fator de magnitude de maturação (Mag_{mat}) e uma constante de maturação (k_{mat}), ambos afetando o efeito da idade sobre o CL, como mostra a equação:

$$CL = 2.3 \frac{L}{h} \times (Mag_{mat} + (1 - Mag_{mat}) \times [1 - e^{(-idade \times k_{mat})}]) \times \left(\frac{PCT}{8Kg}\right)^{0.75}$$

A abordagem utilizada por McCune *et al.* (MCCUNE *et al.*, 2014) foi de derivar dos dados coletados de crianças e adultos o que chamou de TM50, ou seja, a idade pós-menstrual (IPM, idade cronológica acrescida das 40 semanas de gestação), em que a capacidade de metabolização do Bu atingia 50% dos níveis adultos, o que se revelou como sendo 46 semanas. Um fator de maturação, F_{mat} , foi determinado como função sigmoide E_{max} da IPM, conforme a equação seguinte, na qual o coeficiente de Hill para maturação encontrado foi de 2,3 (MCCUNE *et al.*, 2014).

$$F_{mat} = \left(\frac{1}{1 + \left(\frac{IPM}{TM50}\right)^{-Hill}} \right)$$

McCune *et al.* também incluíram a composição corporal em seu modelo, demonstrando que, ao invés do PCT, a variação da concentração de Bu era mais bem explicada pela massa magra acrescida de uma fração parâmetro-dependente da massa adiposa implicada no metabolismo e na distribuição do Bu, ou seja, 51% para o *clearance* e 20% para o volume de distribuição. O resultado,

chamado massa adiposa normal (NFM, *normal fat mass*), normalizado por coeficiente alométrico teórico de 0,75, foi então incorporado no modelo como fator “Tamanho” (F_{size}), juntamente com F_{mat} na estimativa de CL do Bu (MCCUNE et al., 2014).

Apesar de dados consistentes apontarem SNVs do gene *GSTAI* como um preditor do CL do Bu, fato recentemente revisado por Huezo-Diaz *et al.* (HUEZO-DIAZ et al., 2014), apenas recentemente esta informação foi incorporada com sucesso a um modelo de FC de população. Choi *et al.* (CHOI et al., 2015) reportaram em adultos um CL do Bu 15% menor em pacientes heterozigotos para *GSTAI -69T* (haplótipo *B), em comparação aos pacientes homozigotos -69C (haplótipos *A). No entanto, devido à raridade dos haplótipos *B na população asiática (YIN et al., 2015), nenhum paciente homozigoto *B foi incluído neste modelo, o que limita sua aplicabilidade em uma população majoritariamente caucasiana, de cujos sujeitos 12 a 52% já foram descritos como homozigotos *B (ANSARI et al., 2017; ANSARI et al., 2013; ZWAVELING et al., 2008).

Em uma coorte de 77 crianças e adolescentes (mediana de idade de 5 anos, entre 0,2 e 23 anos) e 71% de caucasianos, Zwaveling *et al.* (ZWAVELING et al., 2008) falharam na tentativa de incorporar em um modelo de FC de população SNVs não somente do gene *GSTAI*, mas também de *GSTM1*, *GSTP1* e *GSTT1*. Nesta população, apenas peso mostrou-se associado aos parâmetros de FC do Bu, mesmo quando idade, BSA e doença de base foram incluídos no modelo, além dos polimorfismos dos genes das GSTs. No que se refere especificamente aos polimorfismos de *GSTAI*, apenas o locus -69C/T, como em Choi *et al.* (CHOI et al., 2015), foi considerado na análise, o que não traduz a melhor classificação em termos de potencial de expressão de *GSTAI* e caracteriza uma possível explicação para o achado negativo do referido estudo. Mesmo capaz de adequadamente identificar os homozigotos *B (52% neste estudo), a análise exclusiva do locus -69C/T não é suficiente para identificar o haplótipo *B1b, associado a uma expressão de *GSTAI* diminuída e comparável aos homozigotos *B, mesmo em heterozigose. Haplótipos *A2 e *A3,

significativamente associados a uma hiperexpressão do gene em comparação a *AI, não podem, igualmente, ser identificados (ANSARI et al., 2017).

Conforme demonstrado em publicação recente (ANSARI et al., 2017), a análise mais abrangente da região promotora do gene *GSTAI* (vide Tabela 4) faz-se necessária para a melhor classificação do potencial de conjugação em crianças e adolescentes. A identificação de pelo menos dois grupos extremos de FC e de resultados clínicos (grupos 1 e 4, como descrito na Figura 5) foi possível com o agrupamento de haplótipos com potencial de expressão de *GSTAI* semelhantes. No entanto, até o presente momento, nenhum estudo de FC populacional avaliou a incorporação desta classificação em um modelo de predição de FC e, conseqüentemente, de dose de Bu em TCTH.

3 JUSTIFICATIVA

O bussulfano (Bu) possui uma farmacocinética (FC) com grande variabilidade interindividual e, como parte do condicionamento para transplantação de células-tronco hematopoiéticas (TCTH), apresenta estreito índice terapêutico. Sua superexposição mostrou-se relacionada a diversas toxicidades, enquanto a subexposição foi relacionada a recaída e falha de pega do enxerto. São vários os fatores que influenciam a FC do Bu; dentre os fatores estudados, está a expressão das enzimas da superfamília glutationa S-transferase (GST), cruciais na reação de conjugação entre Bu e Glutationa (GSH), principal via de metabolismo da droga. Frequentes polimorfismos foram relatados nos respectivos genes das isoenzimas GSTA1, GSTM1, GSTP1 e GSTT1 associados a diferentes níveis de expressão dos genes. Polimorfismos do gene de GSTA1, a isoenzima mais presente no parênquima hepático e a mais ativa na conjugação GSH-Bu, têm-se mostrado significativamente associados à FC do Bu e aos resultados clínicos. Diferentes diretrizes para a prescrição da dose de Bu são disponíveis, muitas delas baseadas em estudos de FC populacional, demonstrando a dificuldade em predizer a dose individual ideal, principalmente em crianças. Até o momento, o potencial de variabilidade da FC devido às variantes de *GSTA1* não é levado em consideração na prescrição da dose de Bu em pediatria. Baseado, pois, em um melhor conhecimento das variantes genéticas de *GSTA1*, há necessidade de incorporação deste fator em um novo modelo de FC populacional do Bu no intuito de melhor personalização da dose, melhor predição da exposição dos pacientes à droga e, conseqüentemente, possível melhora dos resultados de TCTH.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Criar um modelo de farmacocinética populacional do Bu intravenoso em crianças e adolescentes, incluindo as variantes genéticas de *GSTAI* como potenciais cofatores, visando a sua utilização no cálculo personalizado de dose em pacientes durante regime de condicionamento para transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar o desempenho dos métodos atualmente disponíveis de prescrição de dose do Bu em pediatria antes de TCTH em função das variantes genéticas de *GSTAI*;
- Comparar o desempenho do novo modelo aos métodos atualmente disponíveis para o cálculo da dose do Bu em crianças e adolescentes em TCTH.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ESTUDO I

Análise do papel das variantes genéticas de *GSTA1* no desempenho dos métodos de cálculo de dose do Bu em TCTH pediátrico.

5.1.1 Delineamento

Estudo observacional transversal.

5.1.2 População em estudo

Critérios de inclusão:

Foram incluídos os pacientes:

1 - Portadores de doenças malignas e não malignas que receberam bussulfano (Bu) intravenoso como parte do condicionamento antes de transplante autólogo ou alogênico de células-tronco (TCTH) no Serviço de Hemato-Oncologia Pediátrica do *Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Sainte-Justine*, em Montréal, Quebec, Canadá entre abril de 2002 e abril de 2012;

2 – Que assinaram o termo de consentimento informado;

3 – Que realizaram monitoramento de dose terapêutica (MDT) do Bu.

Crítérios de exclusão:

Foram excluídos os pacientes que:

- 1 - Não dispunham da FC da primeira dose de Bu;
- 2 - Não dispunham dos resultados de genotipagem de *GSTAI*.

5.1.3 Regime de tratamento

Bu (Busulfex®, Otsuka Pharmaceuticals, Saint-Laurent, Montreal, Quebec, Canadá) foi administrado quatro vezes ao dia por via intravenosa em infusões de duas horas. As doses iniciais foram prescritas de acordo com a idade e o peso corporal total (PCT) dos pacientes conforme previamente descrito (ANSARI et al., 2014): 16 mg/m² em lactentes ≤ 3 meses de idade; 0,8 mg/Kg em crianças >3 meses e <1 ou ≥4 anos de idade; e 1 mg/Kg naqueles ≥ 1 e < 4 anos de idade. A associação de outras drogas mielotóxicas como fludarabina, ciclofosfamida, etoposido e melfalano foi utilizada conforme protocolos específicos.

5.1.4 Variáveis em estudo

Variáveis independentes

Catégoricas: Genótipos de *GSTAI* (vide seção 5.1.5), regime de condicionamento.

Dicotômicas: Gênero, doença de base (maligna ou não maligna), adequação do peso (sobrepeso/obesidade).

Contínuas: Dose do Bu por quilo, idade em anos.

Variáveis dependentes

Contínuas: parâmetros de FC relativos à dose administrada: Clearance (CL) em mL/min/kg, área sob a curva (AUC) em $\mu\text{M}\cdot\text{min}$, concentrações máxima, de *steady-state* e mínima (C_{max}, C_{ss} e C_{min}, respectivamente) em ng/mL. Erro médio CL do Bu predito pelos métodos em que este valor é disponível, em percentual (EM%, vide seção 5.1.5).

Catégoricas: classificação das AUCs aferida e predita por cada método de prescrição de dose entre “abaixo do alvo”, “no alvo” ou “acima do alvo”, segundo cada método de prescrição de dose. Para detalhes da AUC considerada como alvo, vide seção 5.1.5.

5.1.5 Detecção das variáveis em estudo

Os dados da doença de base foram colhidos por meio de revisão de prontuário. Doses utilizadas de Bu, dados antropométricos e resultados dos estudos de FC foram obtidos nos registros do Serviço de Farmacologia Clínica do CHU Sainte-Justine.

Perfis de FC

Amostras de sangue total em tubo heparinizado foram obtidas de cateteres centrais (não utilizados para administração do Bu). As coletas foram feitas imediatamente antes da administração da primeira dose, e a 120, 135, 150, 180, 240, 300 e 360 minutos, contados a partir do início da infusão. A concentração de Bu foi determinada usando ensaio modificado de cromatografia líquida de alta performance (RIFAI et al., 1997). Parâmetros de FC foram estimados através de análise não compartimental e AUC calculada por método trapezoidal (WinNonlin, Pharsight, versão 3.1).

Genotipagem e classificação dos diplótipos

Células mononucleares periféricas coletadas dos pacientes antes da primeira infusão de Bu foram usadas para a genotipagem de *GSTAI* após extração de ADN, conforme previamente descrito (ANSARI et al., 2010). As variantes genéticas de *GSTAI* foram analisadas em haplótipos como demonstrado na Tabela 4. O resultado da combinação de dois haplótipos referentes aos dois alelos de *GSTAI*, chamados de diplótipos, foram ulteriormente reagrupados conforme a expressão esperada de *GSTA1* associada a cada variante (ANSARI et al., 2017) em metabolizadores rápidos (G1), normais (G2) ou lentos (G3), como mostrado na Figura 5.

Cálculo de dose de Bu conforme modelos disponíveis

A primeira dose de Bu foi calculada com base em 11 métodos de prescrição de primeira dose selecionados em 10 diferentes artigos (BARTELINK et al., 2012; BOOTH et al., 2007; BUFFERY et al., 2014; LONG-BOYLE et al., 2015; MCCUNE et al., 2014; NGUYEN et al., 2004; PACI et al., 2012; SAVIC et al., 2013; TRAME et al., 2011;

WALL et al., 2010). Posteriormente, uma predição de AUC foi calculada com base na AUC medida após a dose efetivamente administrada segundo a equação: $AUC_{predita} = (Dose_{administrada} / Dose_{predita}) \times AUC_{medida}$. Os modelos foram nomeados conforme o primeiro autor referido nos artigos de origem. Somente pacientes dentro dos limites de idade e peso de cada modelo foram incluídos nessa simulação.

Avaliação do desempenho dos métodos de predição

AUC de 900-1.500 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ foi considerada como alvo na avaliação dos métodos. Inicialmente, foi testado o desempenho do método utilizado para o cálculo da dose administrada. AUCs depois da primeira dose de Bu foram então classificadas em abaixo, dentro ou acima da AUC alvo. A mesma classificação foi feita para as AUCs obtidas a partir das doses calculadas pelos 11 outros métodos. Em quatro métodos selecionados, uma análise suplementar de desempenho foi realizada com base no percentual do erro de predição do CL (AE%). A média de erro de predição (ME%) foi calculada para cada modelo. Vide respectivas equações na Tabela 7.

Tabela 7. Equações para cálculos de erros de predição.

Erro absoluto de predição (AE%)	$AE\% = \frac{CL_{Pred}^{(i)} - CL_{Obs}^{(i)}}{CL_{Obs}^{(i)}} \times 100$
Média do erro de predição (ME%)	$ME\% = \frac{1}{N} \sum_i^N \frac{CL_{Pred}^{(i)} - CL_{Obs}^{(i)}}{CL_{Obs}^{(i)}} \times 100$

CL_{Pred} : Clearance predito pelos modelos; CL_{Obs} : Clearance observado em análise não compartimental dos dados de concentração-tempo medidos nos pacientes do estudo.

Análises estatísticas

Características clínicas e demográficas dos pacientes foram descritas em mediana e amplitude ou proporções de acordo com as características das variáveis. Comparação entre parâmetros de FC foi feita utilizando teste de Mann-Whitney ou teste t de Student, quando apropriado. Comparações das proporções de AUCs medidas, assim como daquelas preditas pelos diferentes métodos, entre grupos de diplótipos de *GSTAI*, foram feitas através de teste de X^2 de Pearson para análises univariáveis e regressão logística para análises multivariáveis. Análises lineares multivariadas (ANOVA) foram utilizadas para detectar fatores independentes relacionados aos erros de predição do CL Bu, nos modelos selecionados. Análises estatísticas foram efetuadas usando IBM® SPSS® Statistics (versão 24, IBM Corp. NY, USA).

5.2 ESTUDO II

Construção do modelo de FC de população incluindo variantes genéticas de *GSTAI* como covariável.

5.2.1 Delineamento

Estudo de coorte retrospectiva com desfecho farmacocinético.

5.2.2 População em estudo

Critérios de inclusão:

Foram incluídos os pacientes:

- 1 - Portadores de doenças malignas e não malignas que receberem Bussulfano (Bu) intravenoso como parte do condicionamento antes de transplante autólogo ou alogênico de células-tronco (TCTH) no Serviço de Hemato-Oncologia Pediátrica do *Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Sainte-Justine*, em Montréal, Quebec, Canadá entre abril de 2002 e agosto de 2015, incluindo os pacientes descritos na seção 5.1.2;
- 2 – Que assinaram o termo de consentimento informado;
- 3 – Que realizaram monitoramento de dose terapêutica (MDT) do Bu.

Crêterios de exclusão:

Foram excluídos os pacientes que:

- 1 - Não dispunham de nenhum perfil de FC do Bu;
- 2 - Receberam condicionamento não mieloablativo ou de toxicidade reduzida.
- 3 - Não dispunham de resultado de genotipagem de *GSTA1*.

5.2.3 Regime de tratamento

Bu intravenoso (Busulfex , Otsuka Pharmaceuticals, Saint-Laurent, Montreal, Quebec, Canadá) foi utilizado de acordo com dois protocolos de administra o: a) quatro doses ao dia (q6h), como descrito anteriormente na se o 5.1.3 e b) uma dose ao dia (q24h) em três horas de infusão. A primeira dose de Bu foi prescrita conforme descrito na se o 5.1.3 para os pacientes que receberam quatro doses ao dia. Esta dose foi multiplicada por quatro nos pacientes que receberam Bu uma vez ao dia. Ajustes baseados nos resultados de FC foram realizados a partir da quinta dose nos pacientes que receberam Bu q6h, ou a partir da segunda dose nos pacientes que receberam Bu q24h, visando AUCs cumulativas prescritas conforme protocolos específicos.

5.2.4 Variáveis em estudo

Variáveis independentes

Catóricas: Genótipos de *GSTAI* (vide seção 5.1.5), regime de condicionamento.

Dicotômicas: Sexo, doença de base (maligna ou não maligna), adequação do peso (sobrepeso/obesidade).

Contínuas: Dose do Bu, idade em anos, peso corporal total em quilos, função de maturação de metabolismo do Bu (F_{mat} , vide seção 5.2.5), função tamanho (F_{size} , vide seção 5.2.5), tempo decorrido desde o início da infusão de Bu.

Variáveis dependentes

Contínuas: concentração de Bu em ng/mL.

Catóricas: classificação da AUC predita entre abaixo, dentro ou acima da AUC alvo das AUCs medidas e preditas pelo novo modelo.

5.2.5 Detecção das variáveis em estudo

Os dados da doença de base foram colhidos por meio de revisão de prontuários. Doses utilizadas de Bu, dados antropométricos e os resultados dos perfis de FC foram obtidos dos registros do serviço de farmacologia clínica do CHU Sainte-Justine.

Medidas das concentrações de Bu

Amostras de sangue total em tubo heparinizado foram obtidas de cateteres centrais (não utilizados para administração do Bu). As coletas foram feitas imediatamente antes da

administração da primeira dose e a 120, 135, 150, 180, 240, 300 e 360 minutos, nos pacientes que usaram Bu q6h, e 180, 195, 240, 300, 360 e 480 minutos nos pacientes que usaram Bu q24h, tempos contados a partir do início da infusão. A concentração de Bu foi determinada como previamente descrito na seção 5.1.5.

Genotipagem e classificação dos diplótipos

Idem à seção 5.1.5.

Análise de FC populacional

A administração do Bu IV foi considerada constante e de duração de 120 minutos para Bu q6h e de 180 para Bu q24h. Dados de concentração-tempo foram analisados usando software Phoenix – NLME 6.4 (Certara USA, Inc., Princeton, NJ, EUA) com estimação condicional de primeira-ordem (FOE, *first order estimation*, em inglês) e opção de interação. Modelos não lineares de efeitos mistos (NLME, em inglês) foram usados para enquadrar os dados de concentração-tempo do Bu nos modelos estruturais típicos de FC, tais como modelos de um ou dois compartimentos com eliminação linear ou não linear. A variabilidade entre sujeitos (VES) e a variabilidade entre ocasiões (VEO) em parâmetros de FC foram incluídas em modelos de efeito exponencial aleatório no intuito de restringir a valores positivos os parâmetros individuais, os quais foram assumidos como seguindo uma distribuição log-normal.

A avaliação e a seleção do modelo de base basearam-se em representações gráficas

pertinentes, tipo *goodness-of-fit*, e na minimização de $-2 \text{Ln}(\text{log-likelihood})$, aqui chamado de valor de função objetiva (OFV, em inglês). Como a distribuição da diferença entre OFVs apresenta distribuição de X^2 (WILKS, 1938), modelos associados a uma diminuição de OFV maior que 3,84 e 5,99, respectivamente para 1 e 2 graus de liberdade (GL, lembrando que $\text{GL} = \text{número de categorias} - 1$), foram considerados como significativos ($p=0,05$). Para erros $\alpha=0,01$, os valores críticos de OFV foram 6,63 e 9,21, respectivamente para $\text{GL}=1$ e 2.

Dados antropométricos

Peso elevado a coeficientes alométricos teórico e empírico foram testados, assim como ASC. Composição corporal expressa por NFM e função de tamanho (F_{size}) descritas por McCune *et al.* (MCCUNE *et al.*) também foram aplicados ao modelo, assim como idade pós-natal e IPM. A função de maturação do metabolismo do Bu (F_{mat}) foi testada sobre o CL do Bu. Todas as equações utilizadas estão disponíveis na Tabela 8.

Tabela 8. Equações utilizadas para a obtenção dos valores de F_{mat} e F_{size} .

<p>FFM (<i>free fat mass</i>, Kg) onde HT: altura; PCT: peso corporal total</p> <p>WHS_{max}=37,99 e WHS₅₀=35,98 em mulheres e respectivamente 42,92 e 30,93 em homens.</p>	$FFM = WHS_{max} \times HT^2 \times \left(\frac{PCT}{WHS_{50} \times HT + PCT} \right) \quad (1)$
<p>NFM (<i>normal fat mass</i>, Kg); FFat_{CL}=0,51 e FFat_v=0,20</p>	$NFM_{CL\ ou\ v} = FFM + FFat_{CL\ ou\ v} \times (ABW - FFM) \quad (2)$
<p>F_{size}, onde pwr = 1 para V e 0,75 para CL</p>	$F_{size} = \left(\frac{NFM}{70} \right)^{pwr} \quad (3)$
<p>F_{mat}, onde TM50=46; coeficiente de Hill=2,3</p>	$F_{mat} = \left(\frac{1}{1 + \left(\frac{IPM}{TM50} \right)^{-Hill}} \right) \quad (4)$
<p>IPM</p>	$IPM = \left(\frac{Idade\ (anos)}{52} \right) + 40 \quad (5)$
<p>Cálculo da dose (mg) baseado no CL individualizado onde C_{ss}=0,75mg/L é equivalente a uma AUC_{24h} de 3.800µM.min</p>	$Dose_{Pred} = CL_{Pred} \left(\frac{L}{h} \right) \times 0,75 \left(\frac{mg}{L} \right) \times 24\ (h) \quad (6)$

Conforme descrito por McCune *et al.* (MCCUNE et al., 2014).

Análise de covariáveis

A análise de covariáveis foi realizada por meio de inspeção visual seguida de avaliação formal em Phoenix. Esta última consistiu inicialmente na adição ao modelo de covariáveis potencialmente significativas em *stepwise forward*, permanecendo no modelo aquelas cuja adição gerou uma diminuição de OFV de pelo menos o valor considerado crítico para $p = 0,05$. Em uma segunda etapa, as covariáveis foram eliminadas em alternância em *backward* e somente aquelas cujas eliminações se associaram a um aumento de OFV maior do que o

valor crítico para $p = 0,01$ restaram no modelo. As potenciais covariáveis foram avaliadas como segue: sexo, doença de base (maligna ou não maligna) e grupos baseado em diplótipos de *GSTAI* (vide seção 5.1.5), IPM, idade, regime de condicionamento (BuCy ou outros).

Avaliação do modelo

O desempenho do modelo de FC populacional final foi avaliado por meio de gráficos diagnósticos e verificação preditiva visual (VPC, em inglês). Para aferir se o modelo final poderia ser usado para estimar parâmetros individuais de FC com base em médias populacionais e dados esparsos de FC, foram avaliadas modificações nas estimativas de VES, variabilidade residual e *shrinkage* dos efeitos aleatórios (ou mistos) individuais. Valores de *shrinkage* $\leq 20\%$ indicam boas estimativas individuais de um parâmetro de interesse, enquanto valores maiores mostram piora das estimativas bayesianas individuais.

A estabilidade e a precisão do modelo foram avaliadas utilizando um *bootstrap* não paramétrico em Perl-Speaks-NONMEM (PsN V3.4.2). A técnica de *bootstrap* envolve a reamostragem dos dados originais, com cada indivíduo sendo considerado uma unidade de amostragem. Mil réplicas dos dados foram geradas por *bootstrap* para obter a mediana e o intervalo de confiança de 95% dos parâmetros de FC e os parâmetros de efeito fixo e aleatório. O viés de cada parâmetro foi calculado a partir da diferença entre o valor mediano derivado do *bootstrap* e a estimativa final do parâmetro.

Predição de dose inicial

Simulações de dose foram realizadas após o modelo final ter sido obtido, através da

equação 6 da Tabela 8, baseado no CL previsto pelo modelo proposto (CL_{pred}). A AUC predita foi então obtida pela equação $AUC_{predita} = (Dose_{administrada} / Dose_{predita}) \times AUC_{medida}$. Para determinar o desempenho do modelo, cada AUC resultante foi classificada em abaixo, dentro ou acima da AUC alvo, esta considerada como 3.600 a 6.000 $\mu M \cdot min$ para doses diárias e 900 a 1.500 $\mu M \cdot min$ para doses a cada seis horas. Os resultados foram comparados aos das AUCs obtidas de maneira similar, a partir das doses previstas por outros quatro modelos recentes de FC populacional do Bu em crianças (BARTELINK et al., 2012; LONG-BOYLE et al., 2015; MCCUNE et al., 2014; PACI et al., 2012). O desempenho entre o modelo proposto e os demais modelos foram comparados por meio de teste não paramétrico de McNemar para amostras pareadas.

5.3 ASPECTOS ÉTICOS

Ambos os estudos I e II fazem parte de um projeto em andamento, aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do CHU Sainte-Justine e registrado no site clinicaltrials.gov site sob o número NCT01257854.

REFERÊNCIAS

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. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 8, n. 9, p. 477-85, 2002.

ANDERSSON, B. S. et al. Fludarabine with pharmacokinetically guided IV busulfan is superior to fixed-dose delivery in pretransplant conditioning of AML/MDS patients. **Bone Marrow Transplant**, v. 52, n. 4, p. 580-587, Apr 2017.

ANSARI, M. et al. GSTA1 diplotypes affect busulfan clearance and toxicity in children undergoing allogeneic HSCT: a multicenter study. **Onco Targets Ther**, 2017 (aceito).

ANSARI, M. et al. Influence of glutathione S-transferase gene polymorphisms on busulfan pharmacokinetics and outcome of hematopoietic stem-cell transplantation in thalassemia pediatric patients. **Bone Marrow Transplant**, v. 51, n. 3, p. 377-83, Mar 2016.

ANSARI, M. et al. Influence of GST gene polymorphisms on busulfan pharmacokinetics in children. **Bone Marrow Transplant**, v. 45, n. 2, p. 261-7, Feb 2010.

ANSARI, M. et al. Glutathione S-transferase gene variations influence BU pharmacokinetics and outcome of hematopoietic SCT in pediatric patients. **Bone Marrow Transplant**, v. 48, n. 7, p. 939-46, Jul 2013.

ANSARI, M. et al. Association between busulfan exposure and outcome in children receiving intravenous busulfan before hematopoietic stem cell transplantation. **Ther Drug Monit**, v. 36, n. 1, p. 93-9, Feb 2014.

BACH, F. H. et al. Bone-marrow transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome. **Lancet**, v. 2, n. 7583, p. 1364-6, Dec 28 1968.

BARNES, D. W. et al. Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. **Br Med J**, v. 2, n. 4993, p. 626-7, Sep 15 1956.

BARTELINK, I. H. et al. Body weight-dependent pharmacokinetics of busulfan in paediatric haematopoietic stem cell transplantation patients: towards individualized dosing. **Clin Pharmacokinet**, v. 51, n. 5, p. 331-45, May 01 2012.

BARTELINK, I. H. et al. Association of busulfan exposure with survival and toxicity after haemopoietic cell transplantation in children and young adults: a multicentre, retrospective cohort analysis. **Lancet Haematol**, v. 3, n. 11, p. e526-e536, Nov 2016.

BARTELINK, I. H. et al. Fludarabine and exposure-targeted busulfan compares favorably with busulfan/cyclophosphamide-based regimens in pediatric hematopoietic cell transplantation: maintaining efficacy with less toxicity. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 20, n. 3, p. 345-53, Mar 2014.

BEN-BAROUCHE, S. et al. Busulfan fludarabine vs busulfan cyclophosphamide as a preparative regimen before allogeneic hematopoietic cell transplantation: systematic review and meta-analysis. **Bone Marrow Transplant**, v. 51, n. 2, p. 232-40, Feb 2016.

BERNARD, F. et al. Health status of childhood leukemia survivors who received hematopoietic cell transplantation after BU or TBI: an LEA study. **Bone Marrow Transplant**, v. 49, n. 5, p. 709-16, May 2014.

BOLINGER, A. M. et al. Target dose adjustment of busulfan in pediatric patients undergoing bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant**, v. 28, n. 11, p. 1013-8, Dec 2001.

BOOTH, B. P. et al. Population pharmacokinetic-based dosing of intravenous busulfan in pediatric patients. **J Clin Pharmacol**, v. 47, n. 1, p. 101-11, Jan 2007.

BREDSCHNEIDER, M. et al. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase A1, the major glutathione S-transferase in human liver: consequences for enzyme expression and busulfan conjugation. **Clin Pharmacol Ther**, v. 71, n. 6, p. 479-87, Jun 2002.

BREMER, S. et al. Glutathione Transferase Gene Variants Influence Busulfan Pharmacokinetics and Outcome After Myeloablative Conditioning. **Ther Drug Monit**, v. 37, n. 4, p. 493-500, Aug 2015.

BUFFERY, P. J. et al. Thirteen years' experience of pharmacokinetic monitoring and dosing of busulfan: can the strategy be improved? **Ther Drug Monit**, v. 36, n. 1, p. 86-92, Feb 2014.

BURT, T.; DHILLON, S. Pharmacogenomics in early-phase clinical development. **Pharmacogenomics**, v. 14, n. 9, p. 1085-97, Jul 2013.

CALVIER, E. A. et al. Allometric Scaling of Clearance in Paediatric Patients: When Does the Magic of 0.75 Fade? **Clin Pharmacokinet**, v. 56, n. 3, p. 273-285, Mar 2017.

CASELLI, D. et al. Risk of seizures in children receiving busulphan-containing regimens for stem cell transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 20, n. 2, p. 282-5, Feb 2014.

CHAUDHRY, H. M. et al. The Incidence and Severity of Oral Mucositis among Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Patients: A Systematic Review. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 22, n. 4, p. 605-16, Apr 2016.

CHOI, B. et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of busulfan with GSTA1 polymorphisms in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Pharmacogenomics**, v. 16, n. 14, p. 1585-94, 2015.

COPELAN, E. A. et al. Busulfan levels are influenced by prior treatment and are associated with hepatic veno-occlusive disease and early mortality but not with delayed

complications following marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant**, v. 27, n. 11, p. 1121-4, Jun 2001.

COPPELL, J. A. et al. Hepatic veno-occlusive disease following stem cell transplantation: incidence, clinical course, and outcome. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 16, n. 2, p. 157-68, Feb 2010.

CZERWINSKI, M.; GIBBS, J. P.; SLATTERY, J. T. Busulfan conjugation by glutathione S-transferases alpha, mu, and pi. **Drug Metab Dispos**, v. 24, n. 9, p. 1015-9, Sep 1996.

DELEVE, L. D. Cellular target of cyclophosphamide toxicity in the murine liver: role of glutathione and site of metabolic activation. **Hepatology**, v. 24, n. 4, p. 830-7, Oct 1996.

DELEVE, L. D.; SHULMAN, H. M.; MCDONALD, G. B. Toxic injury to hepatic sinusoids: sinusoidal obstruction syndrome (veno-occlusive disease). **Semin Liver Dis**, v. 22, n. 1, p. 27-42, Feb 2002.

DIX, S. P. et al. Association of busulfan area under the curve with veno-occlusive disease following BMT. **Bone Marrow Transplant**, v. 17, n. 2, p. 225-30, Feb 1996.

ELFENBEIN, G. J. et al. Cytogenetic evidence for recurrence of acute myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation in donor hematopoietic cells. **Blood**, v. 52, n. 3, p. 627-36, Sep 1978.

ELHASID, R. et al. Influence of glutathione S-transferase A1, P1, M1, T1 polymorphisms on oral busulfan pharmacokinetics in children with congenital hemoglobinopathies undergoing hematopoietic stem cell transplantation. **Pediatr Blood Cancer**, v. 55, n. 6, p. 1172-9, Dec 1 2010.

FAN, C. Q.; CRAWFORD, J. M. Sinusoidal obstruction syndrome (hepatic veno-occlusive disease). **J Clin Exp Hepatol**, v. 4, n. 4, p. 332-46, Dec 2014.

FINK, D.; AEBI, S.; HOWELL, S. B. The role of DNA mismatch repair in drug resistance. **Clin Cancer Res**, v. 4, n. 1, p. 1-6, Jan 1998.

FRIED, W.; KEDO, A.; BARONE, J. Effects of cyclophosphamide and of busulfan on spleen colony-forming units and on hematopoietic stroma. **Cancer Res**, v. 37, n. 4, p. 1205-9, Apr 1977.

GALTON, D. A.; TILL, M.; WILTSHAW, E. Busulfan (1, 4-dimethanesulfonyloxybutane, myleran); summary of clinical results. **Ann N Y Acad Sci**, v. 68, n. 3, p. 967-73, Apr 24 1958.

GATTI, R. A. et al. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. **Lancet**, v. 2, n. 7583, p. 1366-9, Dec 28 1968.

GEDDES, M. et al. High busulfan exposure is associated with worse outcomes in a daily i.v. busulfan and fludarabine allogeneic transplant regimen. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 14, n. 2, p. 220-8, Feb 2008.

GIBBS, J. P.; CZERWINSKI, M.; SLATTERY, J. T. Busulfan-glutathione conjugation catalyzed by human liver cytosolic glutathione S-transferases. **Cancer Res**, v. 56, n. 16, p. 3678-81, Aug 15 1996.

GIBBS, J. P. et al. Up-regulation of glutathione S-transferase activity in enterocytes of young children. **Drug Metab Dispos**, v. 27, n. 12, p. 1466-9, Dec 1999.

GIBBS, J. P. et al. Age-dependent tetrahydrothiophenium ion formation in young children and adults receiving high-dose busulfan. **Cancer Res**, v. 57, n. 24, p. 5509-16, Dec 15 1997.

GIBBS, J. P.; YANG, J. S.; SLATTERY, J. T. Comparison of human liver and small intestinal glutathione S-transferase-catalyzed busulfan conjugation in vitro. **Drug Metab Dispos**, v. 26, n. 1, p. 52-5, Jan 1998.

GROCHOW, L. B. Busulfan disposition: the role of therapeutic monitoring in bone marrow transplantation induction regimens. **Semin Oncol**, v. 20, n. 4 Suppl 4, p. 18-25; quiz 26, Aug 1993.

GROCHOW, L. B. et al. Busulfan disposition in children. **Blood**, v. 75, n. 8, p. 1723-7, Apr 15 1990.

GUEST, I.; UETRECHT, J. Drugs toxic to the bone marrow that target the stromal cells. **Immunopharmacology**, v. 46, n. 2, p. 103-12, Feb 2000.

GUNGOR, T. et al. Reduced-intensity conditioning and HLA-matched haemopoietic stem-cell transplantation in patients with chronic granulomatous disease: a prospective multicentre study. **Lancet**, v. 383, n. 9915, p. 436-48, Feb 01 2014.

GURWITZ, D.; MOTULSKY, A. G. 'Drug reactions, enzymes, and biochemical genetics': 50 years later. **Pharmacogenomics**, v. 8, n. 11, p. 1479-84, Nov 2007.

HASSAN, M.; EHRSSON, H. Urinary metabolites of busulfan in the rat. **Drug Metab Dispos**, v. 15, n. 3, p. 399-402, May-Jun 1987.

HASSAN, M. et al. Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of busulfan during high-dose therapy. **Bone Marrow Transplant**, v. 4, n. 1, p. 113-4, Jan 1989.

HASSAN, M. et al. Busulfan bioavailability. **Blood**, v. 84, n. 7, p. 2144-50, Oct 1 1994.

HEHLMANN, R. et al. Randomized comparison of busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia: prolongation of survival by hydroxyurea. The German CML Study Group. **Blood**, v. 82, n. 2, p. 398-407, Jul 15 1993.

HEHLMANN, R. et al. Randomized comparison of interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. The German CML Study Group. **Blood**, v. 84, n. 12, p. 4064-77, Dec 15 1994.

HENIG, I.; ZUCKERMAN, T. Hematopoietic stem cell transplantation-50 years of evolution and future perspectives. **Rambam Maimonides Med J**, v. 5, n. 4, p. e0028, Oct 2014.

HUEZO-DIAZ, P. et al. Pharmacogenetic aspects of drug metabolizing enzymes in busulfan based conditioning prior to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children. **Curr Drug Metab**, v. 15, n. 3, p. 251-64, Mar 2014.

IWAMOTO, T. et al. DNA intrastrand cross-link at the 5'-GA-3' sequence formed by busulfan and its role in the cytotoxic effect. **Cancer Sci**, v. 95, n. 5, p. 454-8, May 2004.

JOHNSON, L. et al. Glutathione S-transferase A1 genetic variants reduce busulfan clearance in children undergoing hematopoietic cell transplantation. **J Clin Pharmacol**, v. 48, n. 9, p. 1052-62, Sep 2008.

KIM, I. et al. Glutathione S-transferase A1 polymorphisms and acute graft-vs.-host disease in HLA-matched sibling allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Clin Transplant**, v. 21, n. 2, p. 207-13, Mar-Apr 2007.

KIM, S. D. et al. Influence of GST gene polymorphisms on the clearance of intravenous busulfan in adult patients undergoing hematopoietic cell transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 17, n. 8, p. 1222-30, Aug 2011.

KREMER, L. C. et al. Anthracycline-induced clinical heart failure in a cohort of 607 children: long-term follow-up study. **J Clin Oncol**, v. 19, n. 1, p. 191-6, Jan 01 2001.

KUBOTA, K. et al. In vitro busulfan sensitivity of granulocyte-macrophage and erythroid progenitor cells in patients with chronic myelogenous leukemia. **Cancer Res**, v. 43, n. 12 Pt 1, p. 6090-3, Dec 1983.

KUSAMA, M. et al. Influence of glutathione S-transferase A1 polymorphism on the pharmacokinetics of busulfan. **Clin Chim Acta**, v. 368, n. 1-2, p. 93-8, Jun 2006.

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. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 18, n. 6, p. 944-50, Jun 2012.

LONG-BOYLE, J. R. et al. Population pharmacokinetics of busulfan in pediatric and young adult patients undergoing hematopoietic cell transplant: a model-based dosing algorithm for personalized therapy and implementation into routine clinical use. **Ther Drug Monit**, v. 37, n. 2, p. 236-45, Apr 2015.

MA, D. E. I. et al. Comparison of two different conditioning regimens before autologous transplantation for children with high-risk neuroblastoma. **Anticancer Res**, v. 32, n. 12, p. 5527-33, Dec 2012.

MCCUNE, J. S. et al. Busulfan in infant to adult hematopoietic cell transplant recipients: a population pharmacokinetic model for initial and Bayesian dose personalization. **Clin Cancer Res**, v. 20, n. 3, p. 754-63, Feb 01 2014.

MCCUNE, J. S.; GIBBS, J. P.; SLATTERY, J. T. Plasma concentration monitoring of busulfan: does it improve clinical outcome? **Clin Pharmacokinet**, v. 39, n. 2, p. 155-65, Aug 2000.

MCCUNE, J. S. et al. Busulfan concentration and graft rejection in pediatric patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant**, v. 30, n. 3, p. 167-73, Aug 2002.

MCDONALD, G. B. et al. Cyclophosphamide metabolism, liver toxicity, and mortality following hematopoietic stem cell transplantation. **Blood**, v. 101, n. 5, p. 2043-8, Mar 01 2003.

MOHTY, M. et al. Revised diagnosis and severity criteria for sinusoidal obstruction syndrome/veno-occlusive disease in adult patients: a new classification from the European Society for Blood and Marrow Transplantation. **Bone Marrow Transplant**, v. 51, n. 7, p. 906-12, Jul 2016.

MOLINA, B. et al. High-dose busulfan and melphalan as conditioning regimen for autologous peripheral blood progenitor cell transplantation in high-risk neuroblastoma patients. **Pediatr Hematol Oncol**, v. 28, n. 2, p. 115-23, Mar 2011.

MORALES-RAMIREZ, P. et al. In vivo kinetics of micronuclei induction by bifunctional alkylating antineoplastics. **Mutagenesis**, v. 19, n. 3, p. 207-13, May 2004.

MOTULSKY, A. G. Drug reactions enzymes, and biochemical genetics. **J Am Med Assoc**, v. 165, n. 7, p. 835-7, Oct 19 1957.

MOYER, A. M. et al. Glutathione S-transferase T1 and M1: gene sequence variation and functional genomics. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 23, p. 7207-16, Dec 01 2007.

MOYER, A. M. et al. Glutathione S-transferase p1: gene sequence variation and functional genomic studies. **Cancer Res**, v. 68, n. 12, p. 4791-801, Jun 15 2008.

NGUYEN, L. et al. I.V. busulfan in pediatrics: a novel dosing to improve safety/efficacy for hematopoietic progenitor cell transplantation recipients. **Bone Marrow Transplant**, v. 33, n. 10, p. 979-87, May 2004.

NIETO, Y. et al. High-dose infusional gemcitabine combined with busulfan and melphalan with autologous stem-cell transplantation in patients with refractory lymphoid malignancies. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 18, n. 11, p. 1677-86, Nov 2012.

OAKHILL, A. et al. Busulphan lung in childhood. **J Clin Pathol**, v. 34, n. 5, p. 495-500, May 1981.

OANCEA, I. et al. A novel mouse model of veno-occlusive disease provides strategies to prevent thioguanine-induced hepatic toxicity. **Gut**, v. 62, n. 4, p. 594-605, Apr 2013.

OLINER, H. et al. Interstitial pulmonary fibrosis following busulfan therapy. **Am J Med**, v. 31, p. 134-9, Jul 1961.

OSGOOD, E. E.; RIDDLE, M. C.; MATHEWS, T. J. Aplastic anemia treated with daily transfusions and intravenous marrow; case report*. **Annals of Internal Medicine**, v. 13, n. 2, p. 357-367, 1939.

OVERBEEK, A. et al. Chemotherapy-related late adverse effects on ovarian function in female survivors of childhood and young adult cancer: A systematic review. **Cancer Treat Rev**, v. 53, p. 10-24, Feb 2017.

PACI, A. et al. Pharmacokinetic behavior and appraisal of intravenous busulfan dosing in infants and older children: the results of a population pharmacokinetic study from a large pediatric cohort undergoing hematopoietic stem-cell transplantation. **Ther Drug Monit**, v. 34, n. 2, p. 198-208, Apr 2012.

PAI, R. K. et al. Clinicopathologic features of late-onset veno-occlusive disease/sinusoidal obstruction syndrome after high dose intravenous busulfan and hematopoietic cell transplant. **Leuk Lymphoma**, v. 53, n. 8, p. 1552-7, Aug 2012.

PAI, S. Y. et al. Transplantation outcomes for severe combined immunodeficiency, 2000-2009. **N Engl J Med**, v. 371, n. 5, p. 434-46, Jul 31 2014.

PALMER, J. et al. Personalizing Busulfan-Based Conditioning: Considerations from the American Society for Blood and Marrow Transplantation Practice Guidelines Committee. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 22, n. 11, p. 1915-1925, Nov 2016.

PERKINS, J. B. et al. Maximally tolerated busulfan systemic exposure in combination with fludarabine as conditioning before allogeneic hematopoietic cell transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 18, n. 7, p. 1099-107, Jul 2012.

PIDALA, J. et al. Pharmacokinetic targeting of intravenous busulfan reduces conditioning regimen related toxicity following allogeneic hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia. **J Hematol Oncol**, v. 3, p. 36, Oct 06 2010.

QIAO, J. et al. Evaluation of the effects of preconditioning regimens on hepatic veno-occlusive disease in mice after hematopoietic stem cell transplantation. **Exp Mol Pathol**, v. 98, n. 1, p. 73-8, Feb 2015.

REGAZZI, M. B. et al. Disposition of high-dose busulfan in pediatric patients undergoing bone marrow transplantation. **Clin Pharmacol Ther**, v. 54, n. 1, p. 45-52, Jul 1993.

RIFAI, N. et al. Measurement of plasma busulfan concentration by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Ther Drug Monit**, v. 19, n. 2, p. 169-74, Apr 1997.

ROBINSON, S. M. et al. Pathogenesis of FOLFOX induced sinusoidal obstruction syndrome in a murine chemotherapy model. **J Hepatol**, v. 59, n. 2, p. 318-26, Aug 2013.

SADEGHI, B. et al. The effect of administration order of BU and CY on engraftment and toxicity in HSCT mouse model. **Bone Marrow Transplant**, v. 41, n. 10, p. 895-904, May 2008.

SAKAGUCHI, H. et al. Incidence, clinical features, and risk factors of idiopathic pneumonia syndrome following hematopoietic stem cell transplantation in children. **Pediatr Blood Cancer**, v. 58, n. 5, p. 780-4, May 2012.

SAVIC, R. M. et al. Effect of weight and maturation on busulfan clearance in infants and small children undergoing hematopoietic cell transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 19, n. 11, p. 1608-14, Nov 2013.

SCIAN, M.; ATKINS, W. M. The busulfan metabolite EdAG irreversibly glutathionylates glutaredoxins. **Arch Biochem Biophys**, v. 583, p. 96-104, Oct 01 2015.

SHI-XIA, X. et al. Total body irradiation plus cyclophosphamide versus busulphan with cyclophosphamide as conditioning regimen for patients with leukemia undergoing allogeneic stem cell transplantation: a meta-analysis. **Leuk Lymphoma**, v. 51, n. 1, p. 50-60, Jan 2010.

SILVER, R. T. et al. An evidence-based analysis of the effect of busulfan, hydroxyurea, interferon, and allogeneic bone marrow transplantation in treating the chronic phase of chronic myeloid leukemia: developed for the American Society of Hematology. **Blood**, v. 94, n. 5, p. 1517-36, Sep 01 1999.

SISLER, I. Y. et al. Impact of conditioning regimen in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for children with acute myelogenous leukemia beyond first complete remission: a pediatric blood and marrow transplant consortium (PBMTC) study. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 15, n. 12, p. 1620-7, Dec 2009.

SLATTERY, J. T. et al. Marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: the influence of plasma busulfan levels on the outcome of transplantation. **Blood**, v. 89, n. 8, p. 3055-60, Apr 15 1997.

SLATTERY, J. T. et al. Graft-rejection and toxicity following bone marrow transplantation in relation to busulfan pharmacokinetics. **Bone Marrow Transplant**, v. 16, n. 1, p. 31-42, Jul 1995.

SONI, S. et al. Busulfan and melphalan as consolidation therapy with autologous peripheral blood stem cell transplantation following Children's Oncology Group (COG) induction platform for high-risk neuroblastoma: early results from a single institution. **Pediatr Transplant**, v. 18, n. 2, p. 217-20, Mar 2014.

SRIVASTAVA, A. et al. Glutathione S-transferase M1 polymorphism: a risk factor for hepatic venoocclusive disease in bone marrow transplantation. **Blood**, v. 104, n. 5, p. 1574-7, Sep 01 2004.

TALLMAN, M. S. et al. Incidence of sinusoidal obstruction syndrome following Mylotarg (gemtuzumab ozogamicin): a prospective observational study of 482 patients in routine clinical practice. **Int J Hematol**, v. 97, n. 4, p. 456-64, Apr 2013.

TEINTURIER, C. et al. Ovarian function after autologous bone marrow transplantation in childhood: high-dose busulfan is a major cause of ovarian failure. **Bone Marrow Transplant**, v. 22, n. 10, p. 989-94, Nov 1998.

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 Transplant**, v. 47, n. 2, p. 190-5, Feb 2012.

THOMAS, E. D. et al. One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. **Blood**, v. 49, n. 4, p. 511-33, Apr 1977.

THOMAS, E. D. et al. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. **N Engl J Med**, v. 257, n. 11, p. 491-6, Sep 12 1957.

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. **Clin Cancer Res**, v. 17, n. 21, p. 6867-77, Nov 01 2011.

TRAN, H. et al. Pharmacokinetics and individualized dose adjustment of intravenous busulfan in children with advanced hematologic malignancies undergoing allogeneic stem cell transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 10, n. 11, p. 805-12, Nov 2004.

VASSAL, G. et al. Is 600 mg/m² the appropriate dosage of busulfan in children undergoing bone marrow transplantation? **Blood**, v. 79, n. 9, p. 2475-9, May 01 1992.

VASSAL, G. et al. Dose-dependent neurotoxicity of high-dose busulfan in children: a clinical and pharmacological study. **Cancer Res**, v. 50, n. 19, p. 6203-7, Oct 01 1990.

VASSAL, G. et al. Pharmacokinetics of high-dose busulfan in children. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 24, n. 6, p. 386-90, 1989.

VASSORD, C. et al. Endothelial cells do not express GSTA1: potential relevance to busulfan-mediated endothelial damage during haematopoietic stem cell transplantation. **Eur J Haematol**, v. 80, n. 4, p. 299-302, Apr 2008.

VEAL, G. J. et al. Busulfan pharmacokinetics following intravenous and oral dosing regimens in children receiving high-dose myeloablative chemotherapy for high-risk neuroblastoma as part of the HR-NBL-1/SIOPEN trial. **Eur J Cancer**, v. 48, n. 16, p. 3063-72, Nov 2012.

VESELL, E. S.; PAGE, J. G. Genetic control of dicumarol levels in man. **J Clin Invest**, v. 47, n. 12, p. 2657-63, Dec 1968.

WALL, D. A. et al. Safety, efficacy, and pharmacokinetics of intravenous busulfan in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Pediatr Blood Cancer**, v. 54, n. 2, p. 291-8, Feb 2010.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. The structure of DNA. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 18, p. 123-31, 1953.

WEST, G. B.; BROWN, J. H.; ENQUIST, B. J. The fourth dimension of life: fractal geometry and allometric scaling of organisms. **Science**, v. 284, n. 5420, p. 1677-9, Jun 04 1999.

WHITING, B.; KELMAN, A. W.; GREVEL, J. Population pharmacokinetics. Theory and clinical application. **Clin Pharmacokinet**, v. 11, n. 5, p. 387-401, Sep-Oct 1986.

WILKS, S. S. The Large-Sample Distribution of the Likelihood Ratio for Testing Composite Hypotheses. **Ann Math Statist**, v. 9, n. 1, p. 60-62, 1938.

WILLMOT FC, R. G. Senecio disease or cirrhosis of the liver due to senecio poisoning. **Lancet**, v. 1920, n. ii, p. 2, 1920.

YANNAM, G. R. et al. A nonhuman primate model of human radiation-induced venoocclusive liver disease and hepatocyte injury. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 88, n. 2, p. 404-11, Feb 1 2014.

YIN, J. et al. Once-daily i.v. BU-based conditioning regimen before allogeneic hematopoietic SCT: a study of influence of GST gene polymorphisms on BU pharmacokinetics and clinical outcomes in Chinese patients. **Bone Marrow Transplant**, v. 50, n. 5, p. 696-705, May 2015.

ZAO, J. H. et al. Performance of Busulfan Dosing Guidelines for Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplant Conditioning. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 21, n. 8, p. 1471-8, Aug 2015.

ZENG, L. et al. Vascular endothelium changes after conditioning in hematopoietic stem cell transplantation: role of cyclophosphamide and busulfan. **Transplant Proc**, v. 42, n. 7, p. 2720-4, Sep 2010.

ZWAVELING, J. et al. Glutathione S-transferase polymorphisms are not associated with population pharmacokinetic parameters of busulfan in pediatric patients. **Ther Drug Monit**, v. 30, n. 4, p. 504-10, Aug 2008.

ARTIGO I

(Aceito pelo jornal *Biology of Blood and Marrow Transplantation*)

***GSTA1* genetic variants and conditioning regimen: missing key factors in dosing guidelines of busulfan in pediatric hematopoietic stem cell transplantation**

T Nava¹⁻²⁻³⁻⁷, MA Rezgui¹, CRS Uppugunduri²⁻³, P Huezo-Diaz Curtis²⁻³, Y Théoret¹⁻⁴⁻⁵, M Duval¹⁻⁶, LE Daudt⁷, M Ansari^{2-3*}, M Krajinovic^{1-4-5*}, H Bittencourt^{1-6*}

¹Department of Pediatrics, Charles-Bruneau Cancer Center, CHU Sainte-Justine Research Center, Montreal, Quebec, Canada; ²CANSEARCH Research Laboratory, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Geneva, Switzerland; ³Department of Pediatrics, Onco-Hematology Unit, Geneva University Hospital, Geneva University, Geneva, Switzerland; ⁴Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada; ⁵Clinical Pharmacology Unit, Department of Pediatrics, CHU Sainte-Justine, Montreal, Quebec, Canada; ⁶Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada; ⁷Post Graduate Program in Child and Adolescent Health, School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

* These authors contributed equally.

ABSTRACT

Busulfan (Bu) is a key component of conditioning regimens used prior to hematopoietic stem cell transplantation (SCT) in children. Different predictive methods have been used to calculate the Bu first-dose. To evaluate the necessity of further improvements, we retrospectively analyzed the currently available weight- and age-based guidelines to calculate the first doses in 101 children who underwent allogenic SCT in CHU Sainte-Justine, Montreal, following an intravenous Bu-containing conditioning regimen according to genetic and clinical factors. The measured AUCs were within target (900-1500 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$) in 38.7% patients, after the administration of the first dose calculated based on age and weight, as locally recommended. *GSTA1* diplotypes linked to poor Bu metabolism (G3) and fludarabine-containing regimens were the only factors associated with AUC within target (OR: 4.7, 95% CI: 1.1-19.8, $p=0.04$; and OR: 9.9, 95% CI: 1.6-61.7, $p=0.01$, respectively).

From the eleven methods selected methods for dose calculation, the percentage of AUCs within the target varied between 16% and 74%. In some models, G3 was associated with AUCs within the therapeutic and the toxic range, whereas rapid-metabolizers (G1) were correlated with sub-therapeutic AUCs when different methods were used. These associations were confirmed by clearance-prediction analysis, in which *GSTA1* diplotypes consistently influenced the prediction errors of the methods. These findings suggest that these factors should be considered in Bu dose prediction in addition to the anthropometric data from patients. Furthermore, our data indicated that *GSTA1* diplotypes was a factor that should be included in future population pharmacokinetic models, including similar

conditioning regimens, to improve the prediction of Bu exposure after its initial dose.

INTRODUCTION

The bi-functional alkylating agent busulfan (Bu) is a key component of several conditioning regimens administered prior to stem cell transplantation (SCT). In children, it is used as an alternative to total body irradiation (TBI) with comparable event free survival (EFS) in patients with acute myeloblastic leukemia (AML)¹ and produced less developmental and cognitive impacts in long-term survivors^{2, 3}. Bu is also included in conditioning regimens before allogeneic SCT for acute lymphoblastic leukemia⁴ and non-malignant diseases^{5,6} as well as in regimens used before autologous transplantation for high-risk neuroblastoma⁷⁻⁹ and relapsed/refractory Hodgkin's lymphoma¹⁰.

Bu has a narrow therapeutic window with higher rates of relapse and rejection are observed in patients with a low Bu exposure and over-exposure is associated with transplant-related toxicities such as acute graft versus host disease (aGVHD), sinusoidal occlusive syndrome (SOS) and death¹¹⁻¹⁵. Therapeutic drug concentration monitoring (TDM) is an important tool and allows the adjustments of doses to optimize the treatment outcomes¹³. Bu exposure over time is expressed by the area under the curve (AUC), has a proposed target AUC of 900-1,500 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ for a 6-hour dosing schedule, although some debate exists about the optimal therapeutic range¹⁵⁻

The intra- and inter-patient pharmacokinetic (PK) variability of Bu after equivalent doses during conditioning regimen is high¹⁸. The clearance of high-dose oral Bu proved to be significantly higher in children than adults, especially in children under 4 years old¹⁹⁻²¹. The use of intravenous (IV) form of Bu intended to minimize this variability. However, a high fluctuation of PK parameters persists²²⁻²⁴. The only known metabolic pathway of Bu is its conjugation to glutathione, a reaction that is mainly catalyzed by the hepatic enzyme glutathione S-transferase (GST), in particular by its isoform alpha-1^{25, 26}. In addition to anthropometric measures, several groups have shown that part of the PK variability of Bu was explained by different metabolic potentials that result, to a certain extent, from genetic variations in the enzyme coding gene *GSTA1*^{12, 27-33}.

In clinical practice, a test dose can be administered to assess the Bu clearance, which is subsequently used to calculate dose (dose = measured clearance*desired AUC)³⁴. However, Bu dose is usually obtained from recommendations, most of which are based on population-based PK studies^{35,36}. Several guidelines with different nomograms, algorithms and internet-based calculation tools are also available using weight and/or age to calculate the initial Bu doses³⁵⁻⁴⁵. A recent review¹⁷ of those methods revealed a high coefficient of variation that showed simulated first-dose AUCs within the therapeutic target in 51-74% of cases.

Based on previous associations between Bu PK variability and *GSTA1* variants, the current study aimed to evaluate the impact of this genetic factor on the performance

of the currently available IV Bu dosing guidelines in children.

MATERIALS AND METHODS

Patients

After approval by the local Institutional Review Board, the medical charts of 148 pediatric patients that received intravenous (IV) Bu between April 2002 and April 2012 at CHU Sainte-Justine were retrospectively reviewed. All received IV Bu as part of conditioning regimen in preparation for autologous or allogeneic SCT. Signed informed consent was available for 114 patients. Twelve patients were excluded owing to the absence of *GSTAI* genetic information and one patient was excluded because the first-dose PK was unavailable. This analysis is part of an ongoing study registered at clinicaltrials.gov website (NCT01257854). PK and clinical outcomes of a subgroup of 84 patients receiving exclusively myeloablative conditioning regimens have been previously reported¹². Nine patients with chronic granulomatous disease received significantly higher Bu first-doses in comparison with doses routinely prescribed as they were participants in another study in which higher daily AUCs were suggested⁵. Consequently, those patients were not included in the measured AUC analysis, however they were considered for predicted AUC and clearance (CL) evaluation.

Treatment regimen

Busulfan (Busulfex, Otsuka Pharmaceuticals, Saint-Laurent, Montreal, QC, Canada) was administered IV in a 2-hour infusion q6h. The first doses were prescribed based on age and total body weight as previously described⁴³: 16 mg/m² in infants \leq 3 months old; 0.8 mg/Kg in children $>$ 3 months old and $<$ 1 year old or \geq 4 years old; and 1.0 mg/Kg in

children ≥ 1 and < 4 years old. Weight adequacy was classified as previously reported for patients older than 2 years old⁴⁶.

PK analysis and genotyping

Samples were obtained from central venous line, which was not used for Bu administration, immediately before and at 120, 135, 150, 180, 240, 300 and 360 minutes after the start of the infusion. The plasma Bu concentration was determined by using a modified high-performance liquid chromatographic assay⁴⁷. The PK parameters were estimated by non-compartmental analysis using WinNonlin (Pharsight, version 3.1). Peripheral mononuclear cells or saliva collected from all patients before Bu infusion were used for *GSTAI* genotyping, as previously described⁴⁸. The diplotypes composition is presented in Table S1. The patients were further grouped based on respective expected promoter activity of *GSTAI*¹² into rapid (G1), normal (G2) and poor metabolizers (G3), as shown in Figure 1.

Measured and predicted PK

The first-dose measured AUC_{0-INF} was classified as below, within, or above the target range (900-1,500 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$). To evaluate the prediction accuracy, predicted AUC_{0-INF} values were calculated from Bu q6h doses obtained from the available dosing guidelines³⁵⁻⁴⁵. The respective equations used to calculate the predicted doses are presented in Table S3. For McCune's method³⁸, the predicted doses were obtained from the web-based calculator available at www.nextdose.org. The AUCs were predicted for each patient and each guideline based on the measured clearance through the equation available in the Supplement Material (Table S2, Equation 1). Subsequently, the predicted AUCs were

afterwards classified similarly to measured equivalents. The guidelines were named according to the first author of each paper and are summarized in Table 1. For each guideline, the same age and/or weight limits used of each guideline were respected.

Evaluation of clearance prediction evaluation

We evaluated the fitness of individual and group Bu CL prediction obtained from the four best performing guidelines through the calculation of the individual absolute prediction error (AE%) and the mean relative prediction error (ME%) of the models. The respective equations are available in Table S2 (Equations 2 and 3, respectively).

Statistical analysis

Demographics and baseline characteristics were described for all patients (median and range or proportion according to variable characteristics). The comparison between PK parameters was performed by using a Mann-Whitney test or Student's *t*-test, as appropriate). The *GSTAI* inter-group comparisons for the proportions of patients with AUCs below, within or above the target AUC were performed using the Pearson chi-square test for univariate analysis and logistic regression for multivariate analysis. Finally, a univariate and multivariate linear model (ANOVA) with Bonferroni adjustment for categorical variables was used to assess independent factors related to the measurements of AUC and CL AE%. Statistical analyses were performed by using IBM® SPSS® statistics (version 24, IBM Corp., NY, USA).

RESULTS

Observed PK parameters and influencing factors

The patient characteristics are shown in Table 2. The overall median of administered Bu first-doses was 0.81 mg/Kg (0.63-1.09 mg/Kg), which resulted in a median AUC_{0-INF} of 846 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ (385-1,751 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$). After the exclusion of patients with chronic granulomatous disease, despite the similar Bu first-doses, AUC_{0-INF} and C_{ss} were significantly higher and Bu CL was significantly lower in patients that received fludarabine-containing conditioning regimens (FluCR) as detailed in Table 3. In a linear multivariate analysis controlled for sex, with Bu dose scaled by weight and age, FluCR ($p=0.02$) and *GSTAI* groups G2 and G3 ($p=0.03$) were associated with higher AUC_{0-INF} , whereas malignant diseases were associated with lower AUC_{0-INF} ($p=0.03$).

After the Bu first-dose, the target AUC was achieved in 38.7% of patients, whereas it was in the toxic range in 1% of the patients. The fraction of AUCs within the target was 0%, 39.4%, and 66.7%, for G1, G2 and G3 patients, respectively ($p=0.01$). The majority of the patients that were administered FluCR achieved the AUC target range in comparison with other regimens (75% vs 30.1%, respectively, $p = 0.05$). In the multivariate logistic regression controlled for sex, disease and Bu dose per kilogram and age, FluCR (OR: 9.9, 95% CI: 1.6-61.7, $p=0.01$) and G3 (OR: 4.7, 95% CI: 1.1-19.8, $p=0.04$) were associated with a higher probability of having a first AUC within the target range. The PK parameters of both regimens are summarized in Table 3.

Performance evaluation of the guidelines

Overall, doses calculated by different guidelines resulted in 49.5% of predicted AUCs

within the target (rang: 16-74%). G3 patients performed better: 66.7% of the predicted AUCs achieved the target (range: 41.7%-100%). However, these patients also had the highest percentage (7.3%) of AUCs in the toxic range (0 to 25%). In contrast, G1 patients had the highest percentage of AUCs below the target (60%; rang: 30-100%) and no AUCs in the toxic range. The overall performances of the different methods and evaluation of the *GSTAI*-based groups are shown in Table 4.

In the multivariate analysis including age, sex, disease, conditioning, and *GSTAI*-based groups, G3 patients a had probability of achieving AUC within the target by using the absolute body weight (ABW)-based Trame's method⁴⁴ (OR: 7.7, 95%CI: 1.4-40.8, $p=0.02$) or Wall's method⁴⁵ (OR: 10.9, 95%CI: 2.1-56, $p=0.004$). Patients with benign disease experienced an increased probability of achieving the target AUC using Wall's method (OR: 3.6, 95%CI: 1.3-9.7, $p=0.01$) or Booth's³⁵ method (OR: 3.3, 95%CI: 1.3-8.5, $p=0.01$). Girls were more likely to have an AUC within the target range than boys when doses were calculated by the methods of Bartelink³⁷ (OR: 3.2, 95%CI: 1.1-8.9, $p=0.02$), Buffery⁴² (OR: 4.6, 95%CI 1.6-13.3, $p=0.005$) or Booth (OR: 2.6, 95%CI: 1.0-6.5, $p=0.048$).

In contrast, patients from the G1 and G2 subgroups, after a first dose calculated by Wall's method (OR: 6.9, 95% CI: 1.6-30.2, $p=0.01$) and BSA-based Trame's method (OR: 6.9, 95% CI: 1.6-29.2, $p=0.01$); and in the G1 subgroup by Paci's⁴¹ method (OR: 17.4, 95% CI: 1.5-207) had a higher probability of having AUC below the target. Lower AUCs were seen more frequently in boys, when doses were calculated by Long-Boyle's³⁹ (OR: 3.9, 95% CI: 1.0-9.4, $p=0.04$) or Paci's methods (OR: 2.9, 95% CI: 1.1-7.8, $p=0.03$); patients with

malignant disease were also more likely to have AUCs below the target by using Long-Boyle's (OR: 3.9, 95%CI: 1.2-12.9, $p=0.03$) or Wall's (OR: 3.2, 95% CI: 1.2-8.4, $p=0.02$) methods.

Younger patients had a higher probability of AUCs below the target when the doses were calculated by Walls' ($p=0.02$) or Long-Boyle's ($p<0.001$) methods.

Predicted AUCs in the toxic range

Using Bartelink's model, G3 patients were found to be at higher risk of AUCs in the toxic range (OR: 9.9, 95% CI: 1.1-88.8, $p=0.04$), whereas patients receiving FluCR (OR: 9.7, 95% CI: 1.6-60.7, $p=0.02$) and older patients ($p=0.004$) experienced at a higher risk of toxic AUC when doses were calculated using Long-Boyle's model.

Clearance prediction error

The four selected methods^{37-39,41} returned a global error from -20.8 to 4.6%. *GSTAI* groups. In univariate analysis, the *GSTAI* groups presented a consistent association with the prediction errors of all methods, except for Long-Boyle's (Table 5).

In the multivariate analysis including age, disease, sex and conditioning regimen, *GSTAI* groups were revealed to be the only significant factor that influenced McCune's³⁸ ($p=0.005$) and Paci's AE% ($p=0.02$). For Bartelink's method, age was associated with AE% ($p=0.03$) in addition to *GSTAI*-based groups ($p=0.004$),. For Long-Boyle's method, only age ($p < 0.001$) was strongly related to AE%.

DISCUSSION

This study shows that the Bu first-dose varied significantly based on the available guidelines. These results agreed with those of Zao et al.¹⁷ who reported performances from 51-74% (compared with 16-74% in the present results), although patients in Zao's cohort were more frequently in the toxic range (6-30% vs. 0-15% in our cohort). Some variables were already included in dosing methods, such as age. However, other variables not usually considered in Bu dose estimates, such as baseline disease (malignant or not), components of the conditioning regimen, sex and genetic background appeared to interfere with the guidelines' performance. Methods such as McCune's³⁸, Bartelink's³⁷, Paci's⁴¹ and Long-Boyle's³⁹ presented a better overall performance than the age- and weight-based dosing method used in our center. Nevertheless, some groups of patients did not follow the overall prediction even when best- performing guidelines were used.

Bu is mainly metabolized by glutathione (GSH) conjugation, which is dependent on GST, the enzyme responsible to catalyze the reaction²⁶. GST α -1, encoded by the *GSTA1* gene, is the most important isoform²⁵ involved in Bu metabolism. Single nucleotide variations in the promoter region of the *GSTA1* gene and the derived haplotypes have been proven to result in different levels of enzyme expression, which were associated with differences in Bu PK^{12, 28, 30, 33, 49, 50}.

Similarly, the present analysis showed that the recipient's *GSTA1* genetic background was associated with measured AUC. More than half of the patients treated in our center

presented a measured AUC below the target and this proportion was independently related to *GSTAI* diplotype group (67% in G1/G2 and 36% in G3 patients). Likewise, in predicted AUCs, *GSTAI* diplotypes appeared as an independent factor associated with toxic (G3) or sub-therapeutic (G1) AUCs when particular models were used for the dose calculation.

Although consistent data exists on *GSTAI* genotype as a prediction for Bu PK, as reviewed by Huezo-Diaz et al.⁵¹, it was only recently successfully introduced into an adult population PK model (PPK). Choi et al.³⁰ suggested that patients heterozygous for the *GSTAI* haplotype *B (**B1b*, **B1a*, and **B2*, see Table S1) have 15% lower clearance than the other haplotype (*A) and required a reduced dose. Owing to the rarity of haplotype *B in the Asian population²⁸, no homozygous patients were included in that model. In our dataset, which comprised 79% of Caucasian patients, homozygous *B individuals were also represented by G3 group (12% of our cohort). Previous reports from our group identified G3 patients were at higher risk of Bu toxicities after non-FluCR, partially owing to a 20% lower Bu clearance in those patients^{12, 33}. The present analysis was concordant with these findings: when the best-performing methods were used to calculate the Bu dose, higher rates of AUCs in the toxic range were predicted in G3 patients (8.3-25%) in comparison with G2 (2.8-13.9%) and G1 (no AUCs in the toxic range). In contrast, G1 patients (homozygous *A2 or *A3 or a heterozygous compound of these two haplotypes), which were previously recognized as rapid metabolizers^{12, 33}, showed consistent underestimation, up to 35%, when using the same dosing methods. This demonstrated that that all the variability of Bu PK cannot be explained by anthropometric data, even if more elaborate population PK models are used in attempt to predict individual Bu clearance³⁷⁻³⁹,

41.

We also showed that the conditioning regimen influenced Bu PK parameters. Patients administered FluCR presented Bu first-dose AUCs 37% higher and clearance 30% lower than those who received other regimens. This resulted in more patients administered such treatments with AUCs within the target after the Bu first-dose (77.8% vs 34.5% for other regimens). Some studies in adults using oral⁵² or IV BU^{53, 54} have shown 10 to 30% lower Bu clearance after 3-4 days of Flu exposure when compared to protocols using combinations of Bu and cyclophosphamide (Cy). Similar inter-patient variability was observed in adults⁵⁴ and children²³ administered FluCR. However, this Bu-Flu interaction was not confirmed in studies where Bu PK was assessed earlier during Flu exposure^{55, 56}. In our cohort, all patients received Bu on the same day, immediately after Flu. Although the difference was not significant, age may be a factor of the conditioning regimens (13.3 vs. 7.4 years, $p=0.11$), which could explain the lower clearance of apparently older patients in the Flu group. As only Bu first-doses were analyzed, no conclusion can be drawn about a late decrement in Bu clearance over Flu exposure. However, an interaction between the drugs cannot be excluded.

Flu has a different metabolic pathway in comparison to Bu. It is a purine analogue that is quickly phosphorylated in erythrocytes, endothelial cells and large organs to F-ara-A by 5'-nucleotidase. Intracellular phosphorylation by deoxycytidine kinase converts F-ara-A to its active form, F-ara-ATP, which is ultimately incorporated into the DNA and blocks cell division^{52, 57}. The activation of Flu and the elimination pathway does not seem to overlap

with Bu metabolism, but it is unknown if Flu exposure interferes in Bu elimination. FluCR is known to be an important component of reduced toxicity conditioning regimens⁵⁸ as it is sometimes selected instead of BuCy in patients with a higher risk of toxicity. Although rare, complications such as SOS⁵³ and non-relapse mortality (NRM)^{59, 60} have also been reported with FluCR and are clearly related to the intensity of Bu exposure. In addition to the influence of *GSTA1* genotypes on baseline Bu clearance, this potential Bu-Flu interaction becomes a concern in poor-metabolizer patient, as the risk of complications is theoretically increased, even when fludarabine-based reduced toxicity conditioning regimens are used. This association could not be assessed in our cohort as it included only one 13-year-old boy from G3 group that received FluCR. His first AUC was within the target, close to the upper limit (1,492 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$), after a Bu dose of 1 mg/kg.

Age interfered with the performance of some models, which most likely demonstrated the suboptimal control of this well-known influencing factor of Bu clearance in the original models^{61,62}. Girls were more often within the target AUC but no other data seems to support this finding. Differences in fat mass composition, which are described and included in McCune's prediction model³⁸ may be responsible for this finding.

An improvement in the first AUC prediction based on patients characteristics that would preclude Bu TDM is far from clinical reality. PK variability and clinical outcomes appear to be only partially explained by the currently known anthropometric and even genetic factors. Although data are still missing to support the notion that patients with target AUC after the first-dose are at lower risk of Bu toxicity, the collection of information on several

factors that influence this variability may provide an improved assessment of each patient undergoing SCT; it would be possible to tailor the treatment to the profile of the patient. In this context, the incorporation of *GSTAI* diplotypes into Bu dosing algorithms could be the first step toward an genetically-based personalization of the conditioning regimen. Depending on patient's *GSTAI* diplotype group, Bu first-dose tailoring can be estimated from doses obtained from currently available weight- and/or age-based guidelines. However, the inclusion of the *GSTAI* diplotype groups as a covariate in a novel pharmacogenetics-based population PK model appear to be a more attractive option.

An important inter-individual variability and a potential decrease in Bu clearance in association with Flu is a phenomenon that should be more deeply investigated, despite the apparent absence of a direct pharmacological interaction. It is noteworthy that, as shown in Table 1, although most of the articles analyzed in the present study have included FluCR in their training dataset, subgroup analyses of different conditioning regimens are not available. The potential drug-drug interaction and detrimental effect on Bu poor metabolizers is still not fully understood and requires further study.

CONCLUSION

We found that factors such as the *GSTAI* genotype and the association of Flu in the conditioning regimens were significantly related to the performance of different guidelines currently used to prescribe the first dose of Bu. Improvement in the current guidelines, or a new model in which these factors will be considered, is necessary to ensure a better first-dose personalization, especially in patients recognized to be at a higher risk of SCT

complications.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to all the patients and their parents who consented to participate in this HSCT study.

REFERENCES

1. Sisler IY, Koehler E, Koyama T, et al. Impact of conditioning regimen in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for children with acute myelogenous leukemia beyond first complete remission: a pediatric blood and marrow transplant consortium (PBMTTC) study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15:1620-1627.
2. Shi-Xia X, Xian-Hua T, Hai-Qin X, Bo F, Xiang-Feng T. Total body irradiation plus cyclophosphamide versus busulphan with cyclophosphamide as conditioning regimen for patients with leukemia undergoing allogeneic stem cell transplantation: a meta-analysis. *Leuk Lymphoma*. 2010;51:50-60.
3. Bernard F, Auquier P, Herrmann I, et al. Health status of childhood leukemia survivors who received hematopoietic cell transplantation after BU or TBI: an LEA study. *Bone Marrow Transplant*. 2014;49:709-716.
4. Bartelink IH, van Reij EM, Gerhardt CE, et al. Fludarabine and exposure-targeted busulfan compares favorably with busulfan/cyclophosphamide-based regimens in pediatric hematopoietic cell transplantation: maintaining efficacy with less toxicity. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20:345-353.

5. Gungor T, Teira P, Slatter M, et al. Reduced-intensity conditioning and HLA-matched haemopoietic stem-cell transplantation in patients with chronic granulomatous disease: a prospective multicentre study. *Lancet*. 2014;383:436-448.
6. Pai SY, Logan BR, Griffith LM, et al. Transplantation outcomes for severe combined immunodeficiency, 2000-2009. *N Engl J Med*. 2014;371:434-446.
7. Molina B, Alonso L, Gonzalez-Vicent M, et al. High-dose busulfan and melphalan as conditioning regimen for autologous peripheral blood progenitor cell transplantation in high-risk neuroblastoma patients. *Pediatr Hematol Oncol*. 2011;28:115-123.
8. MA DEI, Contoli B, Jenkner A, et al. Comparison of two different conditioning regimens before autologous transplantation for children with high-risk neuroblastoma. *Anticancer Res*. 2012;32:5527-5533.
9. Soni S, Pai V, Gross TG, Ranalli M. Busulfan and melphalan as consolidation therapy with autologous peripheral blood stem cell transplantation following Children's Oncology Group (COG) induction platform for high-risk neuroblastoma: early results from a single institution. *Pediatr Transplant*. 2014;18:217-220.
10. Nieto Y, Thall P, Valdez B, et al. High-dose infusional gemcitabine combined with busulfan and melphalan with autologous stem-cell transplantation in patients with refractory lymphoid malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18:1677-1686.

11. Bolinger AM, Zangwill AB, Slattery JT, et al. Target dose adjustment of busulfan in pediatric patients undergoing bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2001;28:1013-1018.
12. Ansari M, Huezo-Diaz Curtis P, Uppugunduri CRS, et al. GSTA1 diplotypes affect busulfan clearance and toxicity in children undergoing allogenic HSCT: a multicenter study. *Onco Targets Ther.* 2017(accepted).
13. McCune JS, Gibbs JP, Slattery JT. Plasma concentration monitoring of busulfan: does it improve clinical outcome? *Clin Pharmacokinet.* 2000;39:155-165.
14. Bartelink IH, Bredius RG, Belitser SV, et al. Association between busulfan exposure and outcome in children receiving intravenous busulfan before hematologic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15:231-241.
15. Bartelink IH, Lalmohamed A, van Reij EM, et al. Association of busulfan exposure with survival and toxicity after haemopoietic cell transplantation in children and young adults: a multicentre, retrospective cohort analysis. *Lancet Haematol.* 2016;3:e526-e536.
16. Andersson BS, Thall PF, Madden T, 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. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2002;8:477-485.
17. Zao JH, Schechter T, Liu WJ, et al. Performance of Busulfan Dosing Guidelines for Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplant Conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21:1471-1478.

18. McCune JS, Holmberg LA. Busulfan in hematopoietic stem cell transplant setting. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2009;5:957-969.
19. Vassal G, Fischer A, Challine D, et al. Busulfan disposition below the age of three: alteration in children with lysosomal storage disease. *Blood.* 1993;82:1030-1034.
20. Gibbs JP, Murray G, Risler L, Chien JY, Dev R, Slattery JT. Age-dependent tetrahydrothiophenium ion formation in young children and adults receiving high-dose busulfan. *Cancer Res.* 1997;57:5509-5516.
21. Gibbs JP, Liacouras CA, Baldassano RN, Slattery JT. Up-regulation of glutathione S-transferase activity in enterocytes of young children. *Drug Metab Dispos.* 1999;27:1466-1469.
22. Veal GJ, Nguyen L, Paci A, et al. Busulfan pharmacokinetics following intravenous and oral dosing regimens in children receiving high-dose myeloablative chemotherapy for high-risk neuroblastoma as part of the HR-NBL-1/SIOPEN trial. *Eur J Cancer.* 2012;48:3063-3072.
23. Lee JW, Kang HJ, Lee SH, 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. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18:944-950.
24. Wall DA, Chan KW, Nieder ML, et al. Safety, efficacy, and pharmacokinetics of intravenous busulfan in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer.* 2010;54:291-298.
25. Czerwinski M, Gibbs JP, Slattery JT. Busulfan conjugation by glutathione S-transferases alpha, mu, and pi. *Drug Metab Dispos.* 1996;24(9):1015-9.

26. Gibbs JP, Czerwinski M, Slattery JT. Busulfan-glutathione conjugation catalyzed by human liver cytosolic glutathione S-transferases. *Cancer Res.* 1996;56(16):3678-81.
27. Ansari M, Huezio-Diaz P, Rezgui MA et al. Influence of glutathione S-transferase gene polymorphisms on busulfan pharmacokinetics and outcome of hematopoietic stem-cell transplantation in thalassemia pediatric patients. *Bone Marrow Transplant.* 2016;51(3):377-83
28. Yin J, Xiao Y, Zheng H, Zhang YC. Once-daily i.v. BU-based conditioning regimen before allogeneic hematopoietic SCT: a study of influence of GST gene polymorphisms on BU pharmacokinetics and clinical outcomes in Chinese patients. *Bone Marrow Transplant.* 2015;50:696-705.
29. Bremer S, Fløisand Y, Brinch L et al. Glutathione Transferase Gene Variants Influence Busulfan Pharmacokinetics and Outcome After Myeloablative Conditioning. *Ther Drug Monit.* 2015 Aug;37(4):493-500.
30. Choi B, Kim MG, Han N, et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of busulfan with GSTA1 polymorphisms in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Pharmacogenomics.* 2015;16:1585-1594.
31. Johnson L, Orchard PJ, Baker KS et al. Glutathione S-transferase A1 genetic variants reduce busulfan clearance in children undergoing hematopoietic cell transplantation. *J Clin Pharmacol.* 2008;48(9):1052-62.

32. Kusama M, Kubota T, Matsukura Y et al. Influence of glutathione S-transferase A1 polymorphism on the pharmacokinetics of busulfan. *Clin Chim Acta*. 2006;368(1-2):93-8.
33. Ansari M, Rezgui MA, Theoret Y, et al. Glutathione S-transferase gene variations influence BU pharmacokinetics and outcome of hematopoietic SCT in pediatric patients. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48:939-946.
34. Weil E, Zook F, Oxencis C et al. Evaluation of the Pharmacokinetics and Efficacy of a Busulfan Test Dose in Adult Patients Undergoing Myeloablative Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017;23(6):952-957.
35. Booth BP, Rahman A, Dagher R, et al. Population pharmacokinetic-based dosing of intravenous busulfan in pediatric patients. *J Clin Pharmacol*. 2007;47:101-111.
36. Nguyen L, Fuller D, Lennon S, Leger F, Puozzo C. I.V. busulfan in pediatrics: a novel dosing to improve safety/efficacy for hematopoietic progenitor cell transplantation recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2004;33:979-987.
37. Bartelink IH, Boelens JJ, Bredius RG, et al. Body weight-dependent pharmacokinetics of busulfan in paediatric haematopoietic stem cell transplantation patients: towards individualized dosing. *Clin Pharmacokinet*. 2012;51:331-345.
38. McCune JS, Bemmer MJ, Barrett JS, Scott Baker K, Gamis AS, Holford NH. Busulfan in infant to adult hematopoietic cell transplant recipients: a population pharmacokinetic model for initial and Bayesian dose personalization. *Clin Cancer Res*. 2014;20:754-763.

39. Long-Boyle JR, Savic R, Yan S, et al. Population pharmacokinetics of busulfan in pediatric and young adult patients undergoing hematopoietic cell transplant: a model-based dosing algorithm for personalized therapy and implementation into routine clinical use. *Ther Drug Monit.* 2015;37:236-245.
40. Savic RM, Cowan MJ, Dvorak CC, et al. Effect of weight and maturation on busulfan clearance in infants and small children undergoing hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013;19:1608-1614.
41. Paci A, Vassal G, Moshous D, et al. Pharmacokinetic behavior and appraisal of intravenous busulfan dosing in infants and older children: the results of a population pharmacokinetic study from a large pediatric cohort undergoing hematopoietic stem-cell transplantation. *Ther Drug Monit.* 2012;34:198-208.
42. Buffery PJ, Allen KM, Chin PK, Moore GA, Barclay ML, Begg EJ. Thirteen years' experience of pharmacokinetic monitoring and dosing of busulfan: can the strategy be improved? *Ther Drug Monit.* 2014;36:86-92.
43. Ansari M, Theoret Y, Rezgui MA, et al. Association between busulfan exposure and outcome in children receiving intravenous busulfan before hematopoietic stem cell transplantation. *Ther Drug Monit.* 2014;36:93-99.
44. Trame MN, Bergstrand M, Karlsson MO, Boos J, Hempel G. Population pharmacokinetics of busulfan in children: increased evidence for body surface area and allometric body weight dosing of busulfan in children. *Clin Cancer Res.* 2011;17:6867-6877.

45. Wall DA, Chan KW, Nieder ML et al. Safety, efficacy, and pharmacokinetics of intravenous busulfan in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;54(2):291-8.
46. Barlow SE, Expert C. Expert committee recommendations regarding the prevention, assessment, and treatment of child and adolescent overweight and obesity: summary report. *Pediatrics*. 2007;120 Suppl 4:S164-192.
47. Rifai N, Sakamoto M, Lafi M, Guinan E. Measurement of plasma busulfan concentration by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Ther Drug Monit*. 1997;19:169-174.
48. Ansari M, Lauzon-Joset JF, Vachon MF, et al. Influence of GST gene polymorphisms on busulfan pharmacokinetics in children. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45:261-267.
49. Elhasid R, Krivoy N, Rowe JM, et al. Influence of glutathione S-transferase A1, P1, M1, T1 polymorphisms on oral busulfan pharmacokinetics in children with congenital hemoglobinopathies undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;55:1172-1179.
50. ten Brink MH, van Bavel T, Swen JJ, et al. Effect of genetic variants GSTA1 and CYP39A1 and age on busulfan clearance in pediatric patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Pharmacogenomics*. 2013;14:1683-1690.
51. Huezio-Diaz P, Uppugunduri CR, Tyagi AK, Krajinovic M, Ansari M. Pharmacogenetic aspects of drug metabolizing enzymes in busulfan based conditioning prior to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children. *Curr Drug Metab*. 2014;15:251-264.

52. de Castro FA, Lanchote VL, Voltarelli JC, Colturato VA, Simoes BP. Influence of fludarabine on the pharmacokinetics of oral busulfan during pretransplant conditioning for hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Pharmacol.* 2013;53:1205-1211.
53. Perkins JB, Kim J, Anasetti C, et al. Maximally tolerated busulfan systemic exposure in combination with fludarabine as conditioning before allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18:1099-1107.
54. Yeh RF, Pawlikowski MA, Blough DK, et al. Accurate targeting of daily intravenous busulfan with 8-hour blood sampling in hospitalized adult hematopoietic cell transplant recipients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18:265-272.
55. de Castro FA, Simoes BP, Godoy AL, Bertagnoli Trigo FM, Coelho EB, Lanchote VL. Use of an Oral Busulfan Test Dose in Patients Undergoing Hematopoietic Stem Cell Transplantation Treated With or Without Fludarabine. *J Clin Pharmacol.* 2016;56:1555-1562.
56. Almog S, Kurnik D, Shimoni A, et al. Linearity and stability of intravenous busulfan pharmacokinetics and the role of glutathione in busulfan elimination. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011;17:117-123.
57. Gandhi V, Plunkett W. Cellular and clinical pharmacology of fludarabine. *Clin Pharmacokinet.* 2002;41:93-103.

58. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, et al. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15:1628-1633.
59. Geddes M, Kangaroo SB, Naveed F, et al. High busulfan exposure is associated with worse outcomes in a daily i.v. busulfan and fludarabine allogeneic transplant regimen. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008;14:220-228.
60. Russell JA, Kangaroo SB, Williamson T, et al. Establishing a target exposure for once-daily intravenous busulfan given with fludarabine and thymoglobulin before allogeneic transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013;19:1381-1386.
61. Grochow LB, Krivit W, Whitley CB, Blazar B. Busulfan disposition in children. *Blood.* 1990;75:1723-1727.
62. Hassan M, Oberg G, Bekassy AN, et al. Pharmacokinetics of high-dose busulphan in relation to age and chronopharmacology. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1991;28:130-134

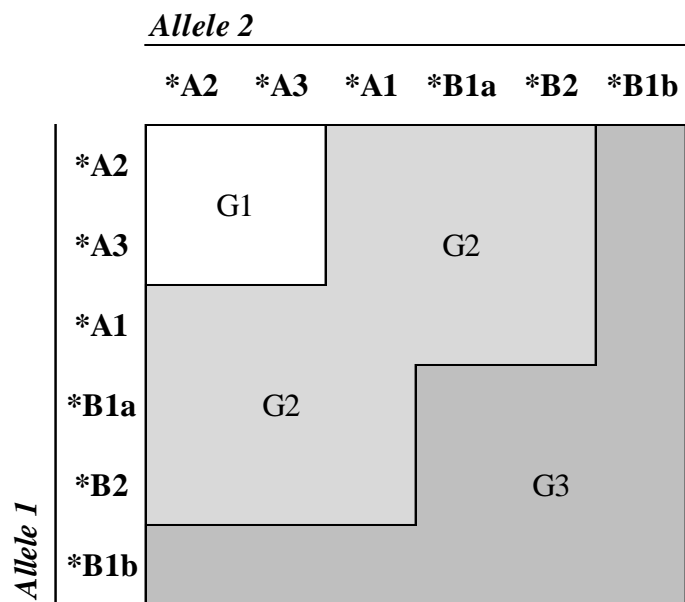


Figure 1. Grouping composition based on *GSTA1*-diplotypes. G1 group contains homozygous patients for haplotypes associated with a rapid Bu metabolism; G3 contains homozygous for haplotypes associated with poor metabolism (**B*) and heterozygous **B1b* and G2 contains diplotypes not classified as G1 or G3.

Dosing Guideline	Year of publication	Target AUC ($\mu\text{M}\cdot\text{min}$)	Bu formulation	Dose frequency (h)	Parameters for dose calculation	N of patients (development)	Age range (years)	FCCR
Long-Boyle	2015	Css: 600-900ng/mL	IV	6	ABW and age	90	0.1-24	yes
Ansari	2014	Css: 600-900ng/mL	IV	6	ABW and age	75	0.1-20	No
Buffery [#]	2014	900-1.400 (PO and IV adults) 925-1.350 (IV children)	77% PO	6 (PO) 24 (IV)	ABW	144 (89 pediatric)	0.5-58	NA
McCune	2014	1.125	IV	6, 8, 12, 24	ABW, gender and PMA	1,481 (133 available ABW)	0.1 - 65.8	NA
Savic ^{&}	2013	1.096	IV	6	ABW and age	149	0.1-3.3	Yes
Bartelink	2012	1.350	IV	6, 12, 24	ABW and age	245	0.1-26	30% BuFlu(12%); BuCyFlu(11%); BuMelFlu(4%)
Paci	2012	1.200	IV	6	ABW	115	0-12.3	No*
Trame [§]	2011	1.125 (ABW) 1.150 (BSA)	54% PO	6 (PO) 24(IV)	ABW or BSA	94	0.4-18.8	NA
Wall	2010	900-1.350	IV	6	ABW	24	0-18	Only BuCy
Booth	2007	900-1.350	IV	6	ABW	24	0.25-16.7	NA
Nguyen	2004	1.125	IV	6	ABW	24	0.45-16.7	Only BuCy

Table 1. Models' characteristics. IV: Intravenous, PO: oral; PMA: post-menstrual age; [#] Buffery's method is limited to patients of at least 10kg of weight; [&]Savic's method is conceived to patients having 12kg or less; *Paci et al. stated that patients received no other chemotherapy before busulfan although that BuFlu was used in rare cases. [§] Trame's publication indicated two calculation methods. The ABW-based (absolute body weight) one and BSA-based (body surface area). Adapted from Zao et al.¹⁷.

Patients characteristics		N (%)	
Gender	<i>Male</i>	56	(55.4)
	<i>Female</i>	45	(44.6)
Age	<i>< 1 year</i>	16	(15.8)
	<i>1-4 years</i>	20	(19.8)
	<i>>4 years</i>	65	(64.4)
Diagnosis		61	(60.4)
	<i>AML</i>	30	(29.7)
	<i>ALL</i>	10	(9.9)
	<i>MDS</i>	19	(18.8)
	<i>Myeloproliferative syndrome</i>	1	(1.0)
	<i>Neuroblastoma</i>	0	(0.0)
	<i>Other solid tumors</i>	1	(1.0)
Non-Malignancies		40	(39.6)
	<i>Immunodeficiencies</i>	19	(18.8)
	<i>Hemoglobinopathy</i>	10	(9.9)
	<i>Hemophagocytic syndrome</i>	5	(5.0)
	<i>Metabolic diseases</i>	6	(5.9)
Conditioning regimen			
	<i>BuCy</i>	75	(74.3)
	<i>BuFlu</i>	17	(16.8)
	<i>BuCyVP16</i>	7	(6.9)
	<i>BuMel</i>	2	(2.0)
Ethnic groups			
	<i>Causasian</i>	80	(79.2)
	<i>African</i>	11	(10.9)
	<i>Other</i>	10	(9.9)
Weight adequacy			
	<i>Overweight</i>	15	(14.9)
	<i>Obesity</i>	6	(5.9)
GSTA1 haplotype group			
	<i>Rapid metabolizers (G1)</i>	10	(9.9)
	<i>Normal metabolizers (G2)</i>	79	(78.2)
	<i>Poor metabolizers (G3)</i>	12	(11.9)
Age (years)		8.5 (0.1 - 21)	

Table 2. Patients' characteristics. AML: acute myeloide leukemia; AAL: acute lymphoblastic leukemia; MDS: Myeloplastic disease; Cy: Cyclophosphamide; Flu: Fludarabine; VP16: Etoposide; Mel: Melphalan

Parameter	BuFlu (N=9)		Other (N=84)		p-value
	Median	Range	Median	Range	
Age at SCT (years)	13.3	0.4-21.0	7.4	0.1-19.9	0.11
Dose (mg/kg)	0.79	0.75-1.00	0.8	0.63-1.09	0.48
C _{max} (ng/ml)	976	537-1,338	846	537-1,249	0.21
C _{ss} (ng/ml)	762	264-1,021	555	302-1,198	0.03*
AUC _{0-INF} (mcM.min)	1,113	385-1,491	810	442-1,751	0.03*
Clearance (ml/kg/min)	2.9	2.3-7.7	4.2	1.8-7.2	0.02*

Table 3. Comparison of the measured PK parameters between patients receiving BuFlu or other regimens.

Guidelines	Dose (mg/kg)		Overall (N(%))						G1 (N(%))					
	Mean	SD	Below		Within		Above		Below		Within		Above	
McCune	1.05	0.14	19	(18.8)	75	(74.3)	7	(6.9)	4	(40.0)	6	(60.0)	0	(0.0)
Bartelink	1.05	0.21	22	(23.7)	66	(71.0)	5	(5.4)	3	(30.0)	7	(70.0)	0	(0.0)
Paci	0.98	0.15	32	(34.4)	58	(62.4)	3	(3.2)	5	(50.0)	5	(50.0)	0	(0.0)
Long-Boyle	1.08	0.11	27	(26.7)	60	(59.4)	14	(13.9)	4	(40.0)	6	(60.0)	0	(0.0)
Nguyen	0.96	0.15	37	(39.8)	54	(58.1)	2	(2.2)	5	(50.0)	5	(50.0)	0	(0.0)
Buffery*	0.91	0.16	31	(42.5)	41	(56.2)	1	(1.4)	2	(40.0)	3	(60.0)	0	(0.0)
Savic*	1.03	0.10	12	(50.0)	12	(50.0)	0	(0.0)	5	(100.0)	0	(0.0)	0	(0.0)
Wall	0.87	0.10	54	(58.1)	38	(40.9)	1	(1.1)	8	(80.0)	2	(20.0)	0	(0.0)
Booth	0.87	0.13	53	(57.0)	38	(40.9)	2	(2.2)	7	(70.0)	3	(30.0)	0	(0.0)
Trame(ABW)	0.76	0.16	80	(79.2)	20	(19.8)	1	(1.0)	8	(80.0)	2	(20.0)	0	(0.0)
Trame(BSA)	0.75	0.17	84	(83.2)	16	(15.8)	1	(1.0)	9	(90.0)	1	(10.0)	0	(0.0)
			(46.7)		(49.5)		(3.8)		(60.0)		(40.0)		(0.0)	

Guidelines	G2 (N(%))						G3 (N(%))							
	Below		Within		Above		Below		Within		Above			
McCune	15	(19.0)	59	(74.7)	5	(6.3)	3	(20.0)	10	(66.7)	2	(13.3)		
Bartelink	19	(26.8)	49	(69.0)	3	(4.2)	0	(0.0)	10	(83.3)	2	(16.7)		
Paci	26	(36.6)	43	(60.6)	2	(2.8)	1	(8.3)	10	(83.3)	1	(8.3)		
Long-Boyle	21	(26.6)	47	(59.5)	11	(13.9)	2	(16.7)	7	(58.3)	3	(25.0)		
Nguyen	30	(42.3)	40	(56.3)	1	(1.4)	2	(16.7)	9	(75.0)	1	(8.3)		
Buffery*	27	(47.4)	29	(50.9)	1	(1.8)	2	(18.2)	9	(81.8)	0	(0.0)		
Savic*	7	(38.9)	11	(61.1)	0	(0.0)	0	(0.0)	1	(100.0)	0	(0.0)		
Wall	43	(60.6)	27	(38.0)	1	(1.4)	3	(25.0)	9	(75.0)	0	(0.0)		
Booth	41	(57.7)	28	(39.4)	2	(2.8)	5	(41.7)	7	(58.3)	0	(0.0)		
Trame(ABW)	65	(82.3)	13	(16.5)	1	(1.3)	7	(58.3)	5	(41.7)	0	(0.0)		
Trame(BSA)	68	(86.1)	10	(12.7)	1	(1.3)	7	(58.3)	5	(41.7)	0	(0.0)		
			(48.5)		(47.7)		(3.8)		(26.0)		(66.7)		(7.3)	

Table 4. Performance comparison among different guidelines across the *GSTAI*-based groups. *Buffery's guideline included patients $\geq 10\text{kg}$ (N=81) and Savic's $\leq 12\text{kg}$ (N=24). SD: standard deviation. Trame (ABW): based on absolute body weight; Trame (BSA): based on body surface area.

Model	ME%	95% CI		p value
		lower	upper	
McCune (N=101)	-4.2	-8.6	0.1	0.02*
G1	-22.4	-35.5	-9.4	0.03*
G2	-4.2	-8.8	0.5	reference
G3	10.7	-1.2	22.6	0.07
Bartelink (N=101)	-20.8	-24.1	-17.5	<0.01*
G1	-30.2	-40.5	-20.0	0.38
G2	-21.8	-25.4	-18.1	reference
G3	-6.7	-16.0	2.7	0.01*
Paci (N=101)	-19.3	-23.8	-15.8	<0.01*
G1	-29.9	-40.6	-19.1	0.25
G2	-19.8	-23.6	-16.0	reference
G3	-7.2	-17.0	2.6	0.06
Long-Boyle (N=101)	4.6	-2.2	11.4	0.13
G1	-13.2	-34.4	8.1	0.34
G2	5.1	-2.5	12.7	reference
G3	16.1	-3.3	35.5	0.89

Table 5. Mean of prediction mean error (ME%) across *GSTAI*-based groups. *p* values from ANOVA test. ME% between groups compared with Bonferroni coefficient interval adjustment as fixing G2 as the reference group. * significant values ($p < 0.05$)

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Haplotype	Nucleotide Change			
	-69 (C>T)	-513 (A>G)	-613 (T>G)	-1142(C>G)
*A1	C	A	T	C
*A2	C	A	G	C
*A3	C	A	T	G
*B1a	T	A	G	G
*B1b	T	G	G	G
*B2	T	A	G	C

Table S1. Haplotypes composition based on single nucleotides variants of *GSTA1*.

Calculation of Bu predicted AUC based on observed clearance (CL) where 243.6 is a unit conversion factor (from ng.min/mL to μ M.min) and “Obs” and “Pred” indicated respectively observed/measured and predicted PK parameters.	$AUC_{Pred} = \frac{Dose_{Pred}}{CL_{Obs}} \times 243.6 \quad (1)$
Absolute prediction error (AE%)	$AE\% = \frac{CL_{Pred}^{(i)} - CL_{Obs}^{(i)}}{CL_{Obs}^{(i)}} \times 100 \quad (2)$
Mean prediction error (ME%)	$ME\% = \frac{1}{N} \sum_i \frac{CL_{Pred}^{(i)} - CL_{Obs}^{(i)}}{CL_{Obs}^{(i)}} \times 100 \quad (3)$

Table S2. Equations used in predicted Bu AUC calculation and clearance prediction error.

Author	IV Busulfan Dosing Guideline (every 6 hourly dosing)
Ansari ⁴³	≤ 3 months: 16 mg/m ² /dose ≥ 3 months to <1 year: 0.8 mg/kg/dose ≥ 1 year old to <4 years old: 1 mg/kg/dose ≥ 4 years old: 0.8 mg/kg/dose
Wall ⁴⁵	< 4 years: 1mg/kg/dose ≥ 4 years: 0.8 mg/kg/dose
Bartelink ³⁷	$\text{Dose (mg)} = \text{AUC}_{\text{target}} \times 0.0041^{\dagger} \times 3.32 \left(\frac{1}{h}\right) \times \left(\frac{\text{BW}}{15.3\text{kg}}\right)^{1.57} \times \text{BW}^{-0.224}$
Booth ³⁵	≤ 12 kg: 1.1 mg/kg/dose > 12 kg: 0.8 mg/kg/dose
Buffery ⁴²	10 to 16 kg: 1.2 mg/kg/dose 17 to 18 kg: 1.1 mg/kg/dose 19 to 22 kg: 1 mg/kg/dose 23 to 25 kg: 0.9 mg/kg/dose ≥ 26 kg: 0.8 mg/kg/dose
Nguyen ³⁶	< 9 kg: 1 mg/kg/dose 9 to < 16 kg: 1.2 mg/kg/dose 16 to < 23 kg: 1.1 mg/kg/dose 23 to 34 kg: 0.95 mg/kg/dose >34 kg: 0.8 mg/kg/dose
Paci ⁴¹	< 9 kg: $\text{Dose (mg)} = \text{AUC}_{\text{target}} \times 0.0041^{\dagger} \times 2.18 \text{ (L/h)} \times (\text{BW}/9\text{Kg})^{1.26}$ ≥ 9 kg: $\text{Dose (mg)} = \text{AUC}_{\text{target}} \times 0.0041^{\dagger} \times 2.18 \text{ (L/h)} \times (\text{BW}/9\text{Kg})^{0.76}$
Trame ⁴⁴	<i>BW-based</i> $\text{Dose (mg)} = 4.72 \text{ (mg/h/L)}^{\epsilon} \times 4.11 \text{ (L/h)} \times (\text{BW}/27.2\text{kg})^{0.75}$ <i>BSA-based</i> $\text{Dose (mg)} = 4.72 \text{ (mg/h/L)}^{\epsilon} \times 4.16 \text{ (L/h)} \times \text{BSA}$
Long-Boyle ³⁹	< 12 kg:

	$\text{Dose (mg)} = \text{AUC}_{\text{target}} \times 0.0041^{\dagger} \times 4.32 \text{ (L/h)} \times (\text{BW}/22\text{kg})^{0.75} \times (1 + 0.032 \times \text{age})$ <p>$\geq 12 \text{ kg:}$</p> $\text{Dose (mg)} = \text{AUC}_{\text{target}} \times 0.0041^{\dagger} \times 4.32 \text{ (L/h)} \times (\text{BW}/22\text{kg})^{0.75} \times (1 + 0.032 \times 12) \times [1 + 0.0138 \times (\text{age} - 12)]$
Savic ⁴⁰	<p>Only in patients $\leq 12 \text{ kg:}$</p> $\text{Dose (mg)} = \text{AUC}_{\text{target}} \times 0.0041^{\dagger} \times (0.46 + (1 - 0.46) \times [1 - e^{-(\text{age} \times 1.4)}]) \times (\text{BW}/8\text{kg})^{0.75}$

Table S3. Nomograms and equations used to obtain IV Bu doses according to each method. BW: body weight (kg); $\text{AUC}_{\text{target}}$: target area under the curve ($\mu\text{M}\cdot\text{min}/\text{L}$); BSA: body surface area (m^2); $^{\dagger}0.0041$ is the conversion factor to convert the AUC units from $\mu\text{M}\cdot\text{min}/\text{L}$ to $\text{mg}\cdot\text{h}/\text{L}$. $^{\#}4.72 \text{ mg}/\text{h}/\text{L} = 1,150\mu\text{M}\cdot\text{min}$. Adapted from Zao et al.¹⁷.

ARTIGO II(Submetido ao *British Journal of Clinical Pharmacology*)**Incorporation of *GSTA1* genetic variations into a population pharmacokinetic model for IV busulfan in paediatric hematopoietic stem cell transplantation**

T Nava¹⁻²⁻³⁻⁸, N Kassir⁴, MA Rezgui¹, CRS Uppugunduri²⁻³, P Huezo-Diaz Curtis²⁻³, M Duval¹⁻⁷,
Y Théoret Y¹⁻⁵⁻⁶, LE Daudt⁸, C Litalien⁵⁻⁷, M Ansari^{2-3*}, M Krajinovic^{1-5-6*}, H Bittencourt^{1-7*}

¹Department of Pediatrics, Charles-Bruneau Cancer Center, CHU Sainte-Justine Research Center, Montreal, Quebec, Canada; ²CANSEARCH Research Laboratory, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, University of Geneva, Geneva, Switzerland; ³Department of Pediatrics, Onco-Hematology Unit, University Hospital of Geneva, Geneva, Switzerland; ⁴Certara Strategic Consulting, Montreal, Quebec, Canada; ⁵Clinical Pharmacology Unit, Department of Pediatrics, CHU Sainte-Justine, Montreal, Quebec, Canada; ⁶Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada; ⁷Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada; ⁸Post Graduate Program in Child and Adolescent Health, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil. * These authors contributed equally.

Corresponding author:
Tiago Nava, MD

Division of Pediatric Onco-Hematology
University Hospital of Geneva
Avenue de la Roseraie 64 – 5th floor.
1205 – Geneva
Switzerland
tiago.nava@unige.ch
+41 (0) 76 242 4006
+41 (0) 22 379 4682

Keywords: Busulfan, children, adolescents, pharmacogenetics, therapeutic drug monitoring, stem cell transplantation, *GSTAI*, glutathione-S-transferase, polymorphisms, population pharmacokinetics

WORD COUNT: 3196

SUMMARY

AIMS

The investigators aimed to develop a model-based dosing recommendations for the use of busulfan in children according to the *GSTAI* genotype.

METHODS

Plasma busulfan concentration-time data was collected from 112 children and adolescents (median 5.4 years old, range 0.1 to 20) who had received IV Bu during the conditioning regimen prior to stem cell transplantation. Weight, sex, baseline disease (malignant *vs.* non-malignant), age, conditioning regimen and *GSTAI* diplotypes were evaluated as covariates of PK by using non-linear mixed effects analysis. Models' ability to achieve the target AUC_{24h} (3,600 – 6,000 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$) was assessed by comparing first doses calculated by other available models and those calculated by the proposed *GSTAI*-based one, which was also compared across age groups.

RESULTS

A one-compartment model with first-order elimination best described the data. Allometric scaling of weight and factor of Bu metabolism maturation (F_{mat}) were included in the base model. *GSTAI* diplotypes were found to be a significant covariate of CL. CL rates for rapid metabolizers were 7% faster and 12% slower for poor metabolizers, in comparison with normal metabolizers. *GSTAI*-

based calculated doses achieved the target AUC for 85.2% of the cases, which was significantly better than other available models (37.4 – 73.9%) and revealed a stable performance across all age groups.

CONCLUSION

This is the first Bu dosing algorithm described in a paediatric population. Its use may contribute considerably to better predict Bu exposure in children and adolescents enabling customization of the dose according to the individual's metabolic capacity.

What is already known about this subject

- In children, busulfan has been associated with high pharmacokinetic variability, in spite of the use of IV formulation.
- Although genetic variations have been associated with pharmacokinetic variability, Bu dosing in children and adolescents are still sustained by models built from anthropometric data such as weight and/or age.
- *GSTAI* genetic variations have been consistently associated with busulfan clearance and recently were successfully introduced into an adult population pharmacokinetic model.

What this study adds

- This study provides the first busulfan dosing algorithm for children and adolescents adjusted by *GSTAI* genetic variations. Incorporating genetic markers of drug metabolism capacity along with a maturation factor predicts better busulfan exposure, which may result in less treatment-related toxicities.

INTRODUCTION

The bi-functional alkylating agent Busulfan (Bu) is a key component of several conditioning regimens before stem cell transplantation (SCT). In children, it has been used as an alternative to total body irradiation (TBI) with comparable event free survival (EFS) in patients with acute myeloblastic leukemia (AML) (1) and less developmental and cognitive impacts in long-term survivors (2, 3). Bu is also included in conditioning regimens before allogeneic SCT for acute lymphoblastic leukemia (4) and non-malignant diseases (5, 6) as well as in autologous transplantation regimens for high-risk neuroblastoma (7-10) and relapsed/refractory Hodgkin lymphoma (11).

Despite its wide utilization, Bu presents a narrow therapeutic window. Higher rates of relapse and rejection occur among patients with a low Bu exposure, whereas over-exposure correlates with transplant-related toxicities such as acute graft versus host disease (aGVHD), sinusoidal occlusive syndrome (SOS) and death (12-15). Pharmacokinetic (16) studies have demonstrated a high intra- and inter-patient variability despite equivalent doses of Bu (17-23). Dosing recommendations in children are supported by population PK (PopPK) studies which describe concentration-time data according to weight and/or age (23-32).

Recently, single nucleotide variations (SNV) of the gene coding for glutathione S-transferase alpha-1 (*GSTA1*), implicated in the main metabolic pathway of Bu conjugation to glutathione, was successfully introduced into an adult PopPK model, suggesting that patients heterozygous for *GSTA1* g.-69C>T variant (haplotype **B*) should have their doses decreased (33).

Although another study has failed to include the same *GSTA1* variants into a PopPK model in

children (34), data from Choi *et al.* (33) are in agreement with previous findings from our group whereby pediatric patients homozygous for haplotype *B and heterozygous for haplotype *B/b (g.-69C>T, g.-513A>G, g.-1142C>G) presented lower Bu clearance and had higher risk of treatment-related toxicities (35). Moreover, as reported in a recent publication, three distinct groups of patients were identified based on *GSTAI* haplotypes combinations (diplotypes), which were associated with different gene expression and consequently with Bu metabolism capacity (13).

Based on a wider analysis of SNVs occurring in *GSTAI* promoter region, this current study aims to include this genetic information into a PopPK model to improve individualization of Bu dosing and consequently optimize Bu exposure in pediatric patients.

MATERIALS AND METHODS

Patients

After approval by the local Institutional Review Board, medical charts of 247 pediatric patients that received IV Bu between April 2002 and August 2016 at CHU Sainte-Justine (261 transplantations) as part of conditioning regimen in preparation for autologous or allogeneic HSCT were retrospectively reviewed. A signed informed consent was available for 173 patients. Only first exposures to Bu were included while non-myeloablative or reduced toxicity regimens were excluded from the analysis. Out of the 137 remaining patients, 5 were excluded since no PK data was available, 10 were excluded due to absence of *GSTAI* genetic information and 10 due to missing crucial clinical data. This analysis is part of an ongoing study registered at clinicaltrials.gov site (NCT01257854) and a subset of patients was reported in previous studies (13, 35-37).

Treatment regimen

Busulfan (Busulfex, Otsuka Pharmaceuticals, Saint-Laurent, Montreal, QC, Canada) was administered intravenously (IV) according to two different dosing schedules: initially a 2-hour infusion every 6 hours (Bu6) was used; but from May 2012 Busulfan was administered as a 3-hour infusion every 24 hours (Bu24). Bu6 initial dose was prescribed as described elsewhere (36): 16mg/m² in infants ≤ 3 months of age; 0.8mg/Kg in children >3 months and <1 or ≥ 4 years old; and 1.0mg/Kg in those ≥ 1 and <4 years old. Daily doses (Bu24) were obtained multiplying Bu6 doses by 4. PK-guided dose adjustments were done from 5th (Bu6) or 2nd (Bu24) dose and so forth according to target cumulative AUCs.

PK analysis and genotyping.

Samples were obtained from the central venous line (not used to administer Bu) immediately before and at 120, 135, 150, 180, 240, 300 and 360 minutes from the start of infusion of Bu6 doses and 180, 195, 240, 300, 360 and 480 minutes for Bu24 doses. Plasma concentrations of Bu were determined using a modified high-performance liquid chromatographic assay (38). PK parameters were estimated using non-compartmental analysis (WinNonlin, Pharsight, version 3.1). *GSTA1* genotyping was performed as previously described (39) from peripheral mononuclear cells or saliva samples, before Bu infusion. Diplotypes composition is shown in Supplemental Material, Table S1. They were further grouped based on respective *GSTA1* expected activity (13) in rapid (G1), normal (G2) and poor metabolizers (G3), described in Figure S1.

Population Pharmacokinetic Analysis

Bu IV administration was assumed to be constant with an infusion duration of 120 minutes for Bu6 and 180 minutes for Bu24 doses. Concentration-time data was analyzed using Phoenix - NLME 6.4

(Certara USA Inc., Princeton, NJ, EUA), with the first-order conditional estimation (FOCE) and the interaction option. Nonlinear mixed effects models were used to describe typical PK compartmental models (*e.g.* one- or two-compartmental models with linear or nonlinear elimination) that better fit to the Bu concentration–time data. Between-subject variability (BSV) and inter-occasion variability (IOV) in PK parameters were modeled as exponential random-effect models in order to constrain the individual parameter values positively, which were thus assumed to follow a log-normal distribution.

Model evaluation and selection were based on pertinent graphical representations of goodness-of-fit and on the minimization of $-2 \log$ (likelihood), which was presented as the objective function value (OFV). A decrease in the OFV of 3.84 and 5.99 ($p = 0.05$) and 6.63 and 9.21 ($p=0.01$), respectively for 1 and 2 degrees of freedom were considered as statistically significant.

Anthropometric data descriptors

Body weight, body surface area (BSA) and body composition were applied to the base model. For weight, theoretical and empirical allometric scaling were tested. Another allometric scaled size factor was also tested in the model, which is composed by free fat mass (40) added to the fraction of fat mass that interferes on Bu PK. As proposed by McCune *et al.* (25), that fraction is 51% for the Bu CL and 20% for the V. Bu metabolism maturation on CL was evaluated as a maturation function (Fmat), which was derived from patients' post-menstrual age (PMA), obtained by adding a gestational age of 40 weeks to post-natal age, as also described by McCune *et al.* (25). All respective equations used for calculations are available in supplemental material (Supplemental Material, Table S2, Equations A, B, C, D and E).

Covariate analysis and sources of variability

Covariate analysis was carried out using visual inspection followed by a formal evaluation in Phoenix. The latter consisted of a stepwise forward additive approach ($p = 0.05$) followed by backward elimination ($p = 0.01$). Potential covariates were evaluated as follows: sex, baseline disease (malignant vs. non-malignant) and *GSTAI*-based group (Tables S1 and S2), PMA, post-natal age, and conditioning regimen (BuCy vs. others).

During forward selection, covariates were tested in univariate analysis and deemed significant if the OFV decreased by at least 3.84 ($\chi^2, p \leq 0.05, DF = 1$) followed by their inclusion in the model. During backward elimination, significance of the covariates was confirmed by removing one at a time from the full model and required an increase in the OFV of at least 6.63 ($\chi^2, p \leq 0.01, DF = 1$) to remain in the model.

Model evaluation

The performance of the final PopPK model was evaluated with diagnostic plots and visual predictive check (VPC). In order to assess whether the final model could be used to estimate individual PK parameters based on population means and sparse PK data, changes in the estimates of BSV, residual variability and shrinkage in individual random effects were evaluated (41). Shrinkage values of $\leq 20\%$ indicate good individual estimates of a parameter of interest, while larger shrinkage values show that individual Bayesian estimates ‘shrunk’ towards the population mean values.

In addition, the stability and precision of the model were evaluated using a nonparametric bootstrap within Perl-Speaks-NONMEM (PsN V3.4.2) (42). The bootstrap technique involves resampling from the original data, with each individual subject considered as a sampling unit. One thousand

replicates of the data were generated by bootstrap to obtain the median and 95% percentile of PK parameters and the fixed- and random-effect parameters. The bias of each parameter was calculated by computing the difference between the median value derived from the bootstrap and the final parameter estimate.

Comparison of dosing strategies

Simulation of the first dose was conducted once the final model was obtained. Based on individual predicted CL, the ability to achieve the target AUC using the current model was assessed. Other published PopPK models in children were also selected to perform the same assessment. For models allowing flexible AUC target (25, 26, 28), a value of $C_{ss} = 770\text{ng/mL}$ was used, which represents an $\text{AUC}_{24\text{h}}$ of $4,500\ \mu\text{M}\cdot\text{min}$ or an $\text{AUC}_{6\text{h}}$ of $1,125\ \mu\text{M}\cdot\text{min}$. A linear relationship was assumed between dose and AUC, then predicted AUCs were calculated as follows: $\text{AUC}_{\text{predicted}} = (\text{AUC}_{\text{observed}}/\text{DOSE}_{\text{administrated}}) * \text{DOSE}_{\text{proposed}}$.

To determine the proportion of subjects who achieve the target AUC, the therapeutic window was set to $3,600 - 6,000\ \mu\text{M}\cdot\text{min}$ for Bu24 or $900 - 1,500\ \mu\text{M}\cdot\text{min}$ for Bu6 doses. Comparisons were performed between the *GSTAI*-based doses and those generated from 4 other paediatric models (24-26, 28) that were recently reported as the most performant ones (37). Doses calculated according to FDA (30) and EMA (32) recommendations for Bu dosing in children were also included in this analysis. McNemar's test for related samples was used for comparison and p values were considered statistically significant if < 0.05 .

RESULTS

One-hundred and ninety-nine PK profiles were obtained from 112 pediatric patients from 0.1 to 20 years of age (median 5.4 years old) undergoing 115 HSCT after a Bu-containing conditioning regimen. Patients' clinical and demographic characteristics are summarized in Table 1. A hundred and fourteen (57%) PK profiles were obtained from 31 patients receiving Bu24. PK profiles of patients that received Bu6 were almost exclusively derived from first doses (99%), whereas 97% of the children receiving Bu24 had PK profiles deriving from the first through to the third dose analyzed. A total of 1,735 blood samples were available for the PopPK analysis. Observed concentration–time profiles of Bu are plotted in Figure S2 (Supplemental Material).

Base model

Bu concentration-time data were best fitted using a one-compartment model with a first-order elimination. The maturation factor of Bu metabolism (F_{mat} , see in Supplemental Material, Table S2, equation D) and theoretical allometric scaling of the actual body weight (ABW) were included in the base model. During covariate analysis, PMA ($\Delta OFV = -26.7$, $p = 2.3 \times 10^{-7}$) and *GSTAI* diplotypes groups ($\Delta OFV = -11.7$, $p = 0.003$) were retained as significant factors on V and CL, respectively. Compared to normal metabolizers (G2), rapid metabolizers had 7% faster CL rates (G1) while poor metabolizers (G3) had 12% slower CL rates (see in Supplemental Material, Figure S3). The PopPK parameter estimates of the final model for a patient with a median body weight of 70 kg together with results from the bootstrapping are listed in Table 2. Goodness-of-fit plots in Figure 1 show that the model predictions were in reasonable agreement with the observed plasma concentrations. The VPC in Figure 2 suggests the model describes Bu levels across treatments and ages from 0.1 to 20 years by accounting for differences in body size, maturation of CL, and *GSTAI* diplotypes groups. The robustness of the final model was shown by the bootstrap results (Table 2). The population estimates for the final model were very similar to the mean of the bootstrap

replicates and within the 95% confidence interval obtained from the bootstrap analysis. The individualized clearance was predicted by the following equation:

$$CL\left(\frac{L}{h}\right) = 13.7 \times \left(\frac{ABW}{70}\right)^{0.75} \times F_{mat} \times F_{GSTA1},$$

where $F_{GSTA1}=1.07$ for G1, 1 for G2 and 0.88 for G3 patients.

Comparison of dosing strategies

Doses were obtained from the *GSTA1*-based PopPK model from Equation F in Supplemental material, Table S2 and they achieved the target AUC in 85.2%, which was significantly higher than those calculated by other tested models. Proportions of predicted AUCs based on doses obtained from different models for different age groups are shown Table 3. Using *GSTA1*-based doses, target AUC was achieved less frequently in patients younger than 1 year of age (70%), which was comparable to other most performant models, whereas among patients from 18 to 20 years, 50% achieved the therapeutic level. Among sixteen patients with poor metabolizer status (G3), three had an AUC that would be considered toxic with *GSTA1*-based calculated doses. The same was seen with McCune's and Bartelinks model. While four of these patients fell within the toxic range when using the Long-Boyle model. On the other hand, *GSTA1*-based doses resulted in no G1 patient outside the AUC target, contrary to the frequent AUC below the target when doses were calculated by Bartelink's (18.8%, $p=0.25$), McCune's (43.8%, $p=0.02$), Long-Boyle's (37.5%, $p=0.03$), Paci's and Nguyen's (68.8%, $p<0.001$) and Booth (81.3%, $p<0.001$) models (Supplemental Material, Figure S4).

DISCUSSION

This study has provided the first PopPK model for Bu in paediatrics that shows improvement of PK parameter predictions with an inclusion of a genetic factor as a covariate. Even though consistent data exist on *GSTAI* genotype as a factor influencing Bu PK (summarized in Supplemental Material, Table S3), only recently has it successfully been introduced into an adult PopPK model. Choi *et al.* (33) suggesting that patients heterozygous for *GSTAI* haplotype *B have 15% lower CL compared to homozygous haplotype (*A) and require dose reduction. Due to the rarity of haplotype *B in the Asian population (44) no homozygous patients were included in that model, revealing a limitation in its applicability in this ethnic group. However in Caucasians where the prevalence of *B homozygosity is higher than 50% (34) the applications would be more interesting. In the study by Zwaveling *et al.* composed mostly of Caucasian children, inclusion of *GSTAI* genetic variants as well as those in *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* genes in PopPK analysis did not result in a model improvement (34). However, among *GSTAI* polymorphisms, only the -69C/T locus was considered, which does not translate to the best classification in terms of *GSTAI* conjugation potential, possibly explaining the negative finding in that study.

Although -69C/T can adequately identify *B homozygotes it does not identify *B1b haplotype, associated with reduced *GSTAI* expression even in heterozygotes. Moreover, patients with *A2 and *A3 diplotype combinations present significantly higher gene expression compared to *A1 carriers and should not be classified as having a similar potential to metabolize Bu (13). In the present study, a more reliable classification of *GSTAI* diplotypes (see in Supplemental Material, Figure S1) involved taking extreme metabolism capacities (G1 and G3) into account, improving PopPK model predictability, which resulted in that 85% of predicted doses achieved the target.

A one-compartment model with first-order elimination had better fit with our data, similarly to most available Bu PopPK models (Supplemental Material, Table S4). It is worth noting that our data set included both once and 4-time daily doses and that patients who received non-myeloablatives or toxicity-reduced regimens were not included in our cohort. The latter is important since some reports suggested a 10 to 30% lower Bu CL after 3-4 days of Fludarabine (Flu) use along with Bu, which would constitute a source of bias (45-47).

The present maturation- and pharmacogenetics(PG)-based PopPK model revealed an excellent performance in all age groups. Its performance is comparable to other PopPK models that consider the Bu metabolism maturation along with the aging process in dose calculations. McCune *et al.* (25), suggested an E_{\max} sigmoid curve to explain Bu maturation and, according to it, children reached 50% of the adult metabolic rates at 46 weeks of PMA, that is, age including pre- and post-natal periods. Based on McCune's finding, this maturation factor or Fmat was also tested in our data, which fitted better on CL than other age descriptors. Other models like Bartelink's (24) and Paci's (28) have employed weight-dependent empirical allometric scaling on CL, which also seemed to improve their models predictability with aging. Contrarily, in Long-Boyle's (26), 2 different age-dependent linear corrections for CL (> or < 12 years old) were used, which in our analysis resulted in more patients falling within the toxic range, especially for the over 10 years old. Nguyen's model's log-linear function of weight and Booth's fixed empirical allometric scaling of weight resulted in clearly worse performance. Recommendations for Bu use in children, made by regulatory agencies such as the European Medicines Agency (EMA) and its American counterpart, the Food and Drug Agency (FDA), are based on Nguyen's and Booth's models' results, respectively. The poor results of those models as found in the present analysis revealed that

the rate of Bu metabolism can be, at least in children, only partially explained by the weight and their descriptors.

The only available model that includes body composition in its predictions is McCune's. It incorporates the free fat mass (40) added to a fraction of 51% of the fat mass (FM), which was reported as the fraction involved in Bu CL (25). The resulting normal fat mass on clearance (NFM_{CL}) as well as NFM on volume of distribution (NFM_v , $FFM + 20\%$ of FM), both with theoretical allometric scaling, were also tested in the present data with no advantage in comparison of using ABW. It is worth mentioning though, that only a few obese patients were included in the current study (6% of the concentration-time data).

The current model proposes dose adjustments for poor (G3) and rapid (G1) metabolizers. However, G2 patients, considered normal metabolizers (71% of our cohort), present a high PK variability that could not be explained by covariates included in our analysis. Even though predictability improvement was achieved with the inclusion of *GSTAI* diplotypes groups into the model, other genetic and non-genetic factors may contribute to that Bu PK variability.

Among G1 individuals, *GSTAI*-based doses resulted in better achievement of AUC target. These patients were previously reported as having higher EFS even with lower first-dose AUCs and less treatment-related toxicities (13). In spite of the improved prediction, the clinical impact of this *GSTAI*-based model might be less important for this category of patients. On the other hand, among G3 patients, which were recognized as having higher risk of toxicity, the model's performance was comparable to other most performant models. Since only 16 G3 patients are included in our cohort, comparisons between the dosing strategies among patients from this group are limited, hence a

larger, multicentric prospective study is needed to better evaluate the efficacy and the safety of the present model in this specific group of patients.

CONCLUSION

The present maturation and PG-based PopPK model for Bu is the first to be described in a paediatric population. Based on the identification of 3 groups of diplotypes of *GSTAI* associated with distinct enzyme expressions, this model may contribute considerably to better predict Bu exposure in children and adolescents, tailoring the dose according to the individual metabolic capacity. A prospective trial is needed to compare PG vs. non-PG dosing algorithm.

ACKNOWLEDGEMENTS:

We warmly thank the patients and their parents for consenting to participate in this HSCT study. We also thank R. Lo Piccolo, S. Mezziani, M-F.Vachon, and M. Cortier for the help in this study as well as the Fondation Centre de Canérogénie Charles-Bruneau and the CANSEARCH Foundation for being the sponsors of this study.

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Sisler IY, Koehler E, Koyama T, Domm JA, Ryan R, Levine JE, et al. Impact of conditioning regimen in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for children with acute myelogenous leukemia beyond first complete remission: a pediatric blood and marrow transplant consortium (PBMTTC) study. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15(12):1620-7.

2. Shi-Xia X, Xian-Hua T, Hai-Qin X, Bo F, Xiang-Feng T. Total body irradiation plus cyclophosphamide versus busulphan with cyclophosphamide as conditioning regimen for patients with leukemia undergoing allogeneic stem cell transplantation: a meta-analysis. *Leuk Lymphoma*. 2010;51(1):50-60.
3. Bernard F, Auquier P, Herrmann I, Contet A, Poiree M, Demeocq F, et al. Health status of childhood leukemia survivors who received hematopoietic cell transplantation after BU or TBI: an LEA study. *Bone Marrow Transplant*. 2014;49(5):709-16.
4. Bartelink IH, van Reij EM, Gerhardt CE, van Maarseveen EM, de Wildt A, Versluys B, et al. Fludarabine and exposure-targeted busulfan compares favorably with busulfan/cyclophosphamide-based regimens in pediatric hematopoietic cell transplantation: maintaining efficacy with less toxicity. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20(3):345-53.
5. Gungor T, Teira P, Slatter M, Stussi G, Stepensky P, Moshous D, et al. Reduced-intensity conditioning and HLA-matched haemopoietic stem-cell transplantation in patients with chronic granulomatous disease: a prospective multicentre study. *Lancet*. 2014;383(9915):436-48.
6. Pai SY, Logan BR, Griffith LM, Buckley RH, Parrott RE, Dvorak CC, et al. Transplantation outcomes for severe combined immunodeficiency, 2000-2009. *N Engl J Med*. 2014;371(5):434-46.
7. Proust-Houdemont S, Pasqualini C, Blanchard P, Dufour C, Benhamou E, Goma G, et al. Busulfan-melphalan in high-risk neuroblastoma: the 30-year experience of a single institution. *Bone Marrow Transplant*. 2016;51(8):1076-81.
8. Molina B, Alonso L, Gonzalez-Vicent M, Andion M, Hernandez C, Lassaletta A, et al. High-dose busulfan and melphalan as conditioning regimen for autologous peripheral blood progenitor cell transplantation in high-risk neuroblastoma patients. *Pediatr Hematol Oncol*. 2011;28(2):115-23.
9. MA DEI, Contoli B, Jenkner A, MD DEP, Serra A, L DES, et al. Comparison of two different conditioning regimens before autologous transplantation for children with high-risk neuroblastoma. *Anticancer Res*. 2012;32(12):5527-33.
10. Soni S, Pai V, Gross TG, Ranalli M. Busulfan and melphalan as consolidation therapy with autologous peripheral blood stem cell transplantation following Children's Oncology Group (COG) induction platform for high-risk neuroblastoma: early results from a single institution. *Pediatr Transplant*. 2014;18(2):217-20.

11. Nieto Y, Thall P, Valdez B, Andersson B, Popat U, Anderlini P, et al. High-dose infusional gemcitabine combined with busulfan and melphalan with autologous stem-cell transplantation in patients with refractory lymphoid malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18(11):1677-86.
12. Bolinger AM, Zangwill AB, Slattery JT, Risler LJ, Sultan DH, Glidden DV, et al. Target dose adjustment of busulfan in pediatric patients undergoing bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2001;28(11):1013-8.
13. Ansari M, Huezo-Diaz Curtis P, Uppugunduri CRS, Nava T, Rezgui MA, Mlakar V, et al. *GSTA1* diplotypes affect busulfan clearance and toxicity in children undergoing allogeneic HSCT: a multicenter study. *Onco Targets Ther* (accepted) 2017.
14. McCune JS, Gibbs JP, Slattery JT. Plasma concentration monitoring of busulfan: does it improve clinical outcome? *Clin Pharmacokinet.* 2000;39(2):155-65.
15. Bartelink IH, Bredius RG, Belitser SV, Suttorp MM, Bierings M, Knibbe CA, et al. Association between busulfan exposure and outcome in children receiving intravenous busulfan before hematologic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15(2):231-41.
16. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, Gress R, Sepkowitz K, Storek J, et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15(10):1143-238.
17. McCune JS, Holmberg LA. Busulfan in hematopoietic stem cell transplant setting. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2009;5(8):957-69.
18. Vassal G, Fischer A, Challine D, Boland I, Ledheist F, Lemerle S, et al. Busulfan disposition below the age of three: alteration in children with lysosomal storage disease. *Blood.* 1993;82(3):1030-4.
19. Gibbs JP, Murray G, Risler L, Chien JY, Dev R, Slattery JT. Age-dependent tetrahydrothiophenium ion formation in young children and adults receiving high-dose busulfan. *Cancer Res.* 1997;57(24):5509-16.
20. Gibbs JP, Liacouras CA, Baldassano RN, Slattery JT. Up-regulation of glutathione S-transferase activity in enterocytes of young children. *Drug Metab Dispos.* 1999;27(12):1466-9.

21. Veal GJ, Nguyen L, Paci A, Riggi M, Amiel M, Valteau-Couanet D, et al. Busulfan pharmacokinetics following intravenous and oral dosing regimens in children receiving high-dose myeloablative chemotherapy for high-risk neuroblastoma as part of the HR-NBL-1/SIOPEN trial. *Eur J Cancer*. 2012;48(16):3063-72.

22. Lee JW, Kang HJ, Lee SH, Yu KS, Kim NH, Yuk YJ, 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. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18(6):944-50.

23. Wall DA, Chan KW, Nieder ML, Hayashi RJ, Yeager AM, Kadota R, et al. Safety, efficacy, and pharmacokinetics of intravenous busulfan in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;54(2):291-8.

24. Bartelink IH, Boelens JJ, Bredius RG, Egberts AC, Wang C, Bierings MB, et al. Body weight-dependent pharmacokinetics of busulfan in paediatric haematopoietic stem cell transplantation patients: towards individualized dosing. *Clin Pharmacokinet*. 2012;51(5):331-45.

25. McCune JS, Bemer MJ, Barrett JS, Scott Baker K, Gamis AS, Holford NH. Busulfan in infant to adult hematopoietic cell transplant recipients: a population pharmacokinetic model for initial and Bayesian dose personalization. *Clin Cancer Res*. 2014;20(3):754-63.

26. Long-Boyle JR, Savic R, Yan S, Bartelink I, Musick L, French D, et al. Population pharmacokinetics of busulfan in pediatric and young adult patients undergoing hematopoietic cell transplant: a model-based dosing algorithm for personalized therapy and implementation into routine clinical use. *Ther Drug Monit*. 2015;37(2):236-45.

27. Savic RM, Cowan MJ, Dvorak CC, Pai SY, Pereira L, Bartelink IH, et al. Effect of weight and maturation on busulfan clearance in infants and small children undergoing hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19(11):1608-14.

28. Paci A, Vassal G, Moshous D, Dalle JH, Bleyzac N, Neven B, et al. Pharmacokinetic behavior and appraisal of intravenous busulfan dosing in infants and older children: the results of a population pharmacokinetic study from a large pediatric cohort undergoing hematopoietic stem-cell transplantation. *Ther Drug Monit*. 2012;34(2):198-208.

29. Buffery PJ, Allen KM, Chin PK, Moore GA, Barclay ML, Begg EJ. Thirteen years' experience of pharmacokinetic monitoring and dosing of busulfan: can the strategy be improved? *Ther Drug Monit*. 2014;36(1):86-92.

30. Booth BP, Rahman A, Dagher R, Griebel D, Lennon S, Fuller D, et al. Population pharmacokinetic-based dosing of intravenous busulfan in pediatric patients. *J Clin Pharmacol.* 2007;47(1):101-11.
31. Trame MN, Bergstrand M, Karlsson MO, Boos J, Hempel G. Population pharmacokinetics of busulfan in children: increased evidence for body surface area and allometric body weight dosing of busulfan in children. *Clin Cancer Res.* 2011;17(21):6867-77.
32. Nguyen L, Fuller D, Lennon S, Leger F, Puozzo C. I.V. busulfan in pediatrics: a novel dosing to improve safety/efficacy for hematopoietic progenitor cell transplantation recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2004;33(10):979-87.
33. Choi B, Kim MG, Han N, Kim T, Ji E, Park S, et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of busulfan with *GSTA1* polymorphisms in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Pharmacogenomics.* 2015;16(14):1585-94.
34. Zwaveling J, Press RR, Bredius RG, van Derstraaten TR, den Hartigh J, Bartelink IH, et al. Glutathione S-transferase polymorphisms are not associated with population pharmacokinetic parameters of busulfan in pediatric patients. *Ther Drug Monit.* 2008;30(4):504-10.
35. Ansari M, Rezgui MA, Theoret Y, Uppugunduri CR, Mezziani S, Vachon MF, et al. Glutathione S-transferase gene variations influence BU pharmacokinetics and outcome of hematopoietic SCT in pediatric patients. *Bone Marrow Transplant.* 2013;48(7):939-46.
36. Ansari M, Theoret Y, Rezgui MA, Peters C, Mezziani S, Desjean C, et al. Association between busulfan exposure and outcome in children receiving intravenous busulfan before hematopoietic stem cell transplantation. *Ther Drug Monit.* 2014;36(1):93-9.
37. Nava T, Rezgui MA, Uppugunduri CRS, Huezo-Diaz Curtis P, Theoret Y, Duval M, et al. *GSTA1* genetic variants and conditioning regimen: missing key factors in dosing guidelines of Busulfan in pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* (accepted). 2017.
38. Rifai N, Sakamoto M, Lafi M, Guinan E. Measurement of plasma busulfan concentration by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Ther Drug Monit.* 1997;19(2):169-74.
39. Ansari M, Lauzon-Joset JF, Vachon MF, Duval M, Theoret Y, Champagne MA, et al. Influence of GST gene polymorphisms on busulfan pharmacokinetics in children. *Bone Marrow Transplant.* 2010;45(2):261-7.

40. Hofer S, Brenner T, Bopp C, Stepan J, Lichtenstern C, Weitz J, et al. Cell death serum biomarkers are early predictors for survival in severe septic patients with hepatic dysfunction. *Crit Care*. 2009;13(3):R93.
41. Karlsson MO, Savic RM. Diagnosing model diagnostics. *Clin Pharmacol Ther*. 2007;82(1):17-20.
42. Henderson AR. The bootstrap: a technique for data-driven statistics. Using computer-intensive analyses to explore experimental data. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2005;359(1-2):1-26.
43. Barlow SE. Expert committee recommendations regarding the prevention, assessment, and treatment of child and adolescent overweight and obesity: summary report. *Pediatrics*. 2007;120 Suppl 4:S164-92.
44. Yin J, Xiao Y, Zheng H, Zhang YC. Once-daily i.v. BU-based conditioning regimen before allogeneic hematopoietic SCT: a study of influence of GST gene polymorphisms on BU pharmacokinetics and clinical outcomes in Chinese patients. *Bone Marrow Transplant*. 2015;50(5):696-705.
45. de Castro FA, Lanchote VL, Voltarelli JC, Colturato VA, Simoes BP. Influence of fludarabine on the pharmacokinetics of oral busulfan during pretransplant conditioning for hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Pharmacol*. 2013;53(11):1205-11.
46. Perkins JB, Kim J, Anasetti C, Fernandez HF, Perez LE, Ayala E, et al. Maximally tolerated busulfan systemic exposure in combination with fludarabine as conditioning before allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18(7):1099-107.
47. Yeh RF, Pawlikowski MA, Blough DK, McDonald GB, O'Donnell PV, Rezvani A, et al. Accurate targeting of daily intravenous busulfan with 8-hour blood sampling in hospitalized adult hematopoietic cell transplant recipients. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18(2):265-72.
48. ten Brink MH, Wessels JA, den Hartigh J, van der Straaten T, von dem Borne PA, Guchelaar HJ, et al. Effect of genetic polymorphisms in genes encoding GST isoenzymes on BU pharmacokinetics in adult patients undergoing hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2012;47(2):190-5.
49. Elhasid R, Krivoy N, Rowe JM, Sprecher E, Adler L, Elkin H, et al. Influence of glutathione S-transferase A1, P1, M1, T1 polymorphisms on oral busulfan pharmacokinetics in children with

congenital hemoglobinopathies undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;55(6):1172-9.

50. Kim SD, Lee JH, Hur EH, Lee JH, Kim DY, Lim SN, et al. Influence of GST gene polymorphisms on the clearance of intravenous busulfan in adult patients undergoing hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17(8):1222-30.

51. Ansari M, Huezo-Diaz P, Rezgui MA, Markt S, Duval M, Bittencourt H, et al. Influence of glutathione S-transferase gene polymorphisms on busulfan pharmacokinetics and outcome of hematopoietic stem-cell transplantation in thalassemia pediatric patients. *Bone Marrow Transplant*. 2016;51(3):377-83.

52. Bremer S, Floisand Y, Brinch L, Gedde-Dahl T, Bergan S. Glutathione Transferase Gene Variants Influence Busulfan Pharmacokinetics and Outcome After Myeloablative Conditioning. *Ther Drug Monit*. 2015;37(4):493-500.

53. Srivastava A, Poonkuzhali B, Shaji RV, George B, Mathews V, Chandy M, et al. Glutathione S-transferase M1 polymorphism: a risk factor for hepatic venoocclusive disease in bone marrow transplantation. *Blood*. 2004;104(5):1574-7.

54. Johnson L, Orchard PJ, Baker KS, Brundage R, Cao Q, Wang X, et al. Glutathione S-transferase A1 genetic variants reduce busulfan clearance in children undergoing hematopoietic cell transplantation. *J Clin Pharmacol*. 2008;48(9):1052-62.

55. Kusama M, Kubota T, Matsukura Y, Matsuno K, Ogawa S, Kanda Y, et al. Influence of glutathione S-transferase A1 polymorphism on the pharmacokinetics of busulfan. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2006;368(1-2):93-8.

56. Kim I, Keam B, Lee KH, Kim JH, Oh SY, Ra EK, et al. Glutathione S-transferase A1 polymorphisms and acute graft-vs.-host disease in HLA-matched sibling allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Transplant*. 2007;21(2):207-13.

TABLES

Table 1. Patients' demographic and clinical characteristics. *Evaluated according Barlow *et al.* (43) only in children older than 2 years old. AML: acute myeloid leukemia; MDS: myelodysplastic syndrome; ALL: acute lymphoblastic leukemia; MPS: myeloproliferative syndrome; Bu: busulfan; Cy: cyclophosphamide; VP16: etoposide; Mel: Melphalan; AraC: cytarabine.

Table 2. Model's pharmacokinetic parameters estimates and bootstrap results.

Table 3. Frequency of achievement of target AUC_{6h} of 900 – 1,500 M.min or AUC_{24h} 3,600-6000 M.min according to different models along age. **p* value < 0.05 for comparison of other models to *GSTA1*-based one by McNemar's related-samples test.

FIGURES

Figure 1. Goodness-of-fit of the final model. (A) Observed individual concentrations of Bu vs. population predicted concentrations; (B) observed individual concentration of Bu vs. individual predicted concentration; (C) conditional weighted residuals vs. population predicted concentrations; (D) conditional weighted residuals vs. time after the first dose.

Figure 2. Visual Prediction Check (VPC) of final model. Q6H for doses every 6 hours and Q24H for doses every 24 hours. The dots represent observed concentrations and the solid line represents the median of the simulated profiles. Dashed lines represent the 5th and 95th percentiles of the simulated values.

Table 1

Demographic characteristics	Overall (N=112) N (%)	Once daily (N=31) N (%)	Four times daily (N=81) N (%)
Gender			
Male	53 (47.3)	14 (45.2)	39 (48.1)
Female	59 (52.7)	17 (54.8)	42 (51.9)
Diagnosis			
Malignancies			
AML	34 (30.4)	7 (22.6)	27 (33.3)
MDS	19 (17.0)	1 (3.2)	18 (22.2)
ALL	8 (7.1)	2 (6.5)	6 (7.4)
Neuroblastoma	12 (10.7)	12 (38.7)	0 (0.0)
MPS	1 (0.9)	0 (0.0)	1 (1.2)
Non-Malignancies			
Immunodeficiencies	10 (8.9)	0 (0.0)	10 (12.3)
Hemoglobinopathy	16 (14.3)	7 (22.6)	9 (11.1)
Metabolic diseases	7 (6.3)	2 (6.5)	5 (6.2)
Hemophagocytic syndrome	5 (4.5)	0 (0.0)	5 (6.2)
Conditioning regimen (N=115)			
BuCy	91 (81.3)	17 (54.8)	74 (91.4)
BuCyVP16	8 (7.1)	0 (0.0)	8 (9.9)
BuMel	14 (12.5)	12 (38.7)	2 (2.5)
BuCyMel	1 (0.9)	1 (3.2)	0 (0.0)
BuMelAraC	1 (0.9)	1 (3.2)	0 (0.0)
Number of HSCT			
2	7 (6.3)	0 (0.0)	7 (8.6)
3 or more	1 (0.9)	0 (0.0)	1 (1.2)
Ethnic groups			
Causasian	94 (83.9)	65 (80.2)	29 (93.5)
African	12 (10.7)	10 (12.3)	2 (6.5)
Other	6 (5.4)	6 (7.4)	0 (0.0)
Weight adequacy *			
Overweight	14 (12.5)	1 (4.3)	13 (23.2)
Obesity	7 (6.3)	1 (4.3)	6 (10.7)
GSTAI diplotype group			
Group 1	16 (14.3)	6 (19.4)	10 (12.3)
Group 2	80 (71.4)	20 (64.5)	60 (74.1)
Group 3	16 (14.3)	5 (16.1)	11 (13.6)
Age (years)			
Median	5.4	4.8	5.6
Minimum	0.1	0.4	0.1
Maximum	20	16	20

Table 2

	Base model			Final model			Bootstrap (1,000 runs)	
	Estimate	RSE(%)	Shrinkage(%)	Estimate	RSE(%)	Shrinkage(%)	Median value	95%CI
PK parameter								
CL 70kg (L/h)	13.58	1.97		13.70	2.43		13.69	13.12 - 14.16
V 70kg (L)	50.05	1.21		49.57	1.15		49.57	49.72 - 50.76
<i>GSTAI</i> -group on CL (Reference G2)								
G3				0.88	0.40		0.89	0.82 - 0.96
G1				1.07	4.40		1.07	1.05 - 1.21
PMA on V				-0.06	23.40		-0.06	-0.18 - 0.09
Between-subject variability (BSV)								
BSV CL (%)	18.30	9.00	6.20	13.30	8.80	6.00	18.80	15.00 - 21.20
BSV V (%)	11.50	15.40	22.30	7.00	19.20	24.60	7.48	3.64 - 9.95
Between-occasion variability (BOV)								
BOV CL (%)	7.40	8.00	46.10	7.30	8.10	46.60	7.44	6.12 - 8.28
BOV V (%)	10.00	18.60	21.50	9.60	16.40	9.30	9.57	4.94 - 12.40
Random residual variability								
σ [Proportional error (%)]	7.40	7.90		7.40	7.90		27.20	25.00 - 29.00

Table 3

Age group (years)	N	GSTAI -based	Bartelink	McCune	Long-Boyle	Paci	Nguyen	Booth
0-1	20	70.0	70.0	65.0	65.0	60.0	30.0	50.0
1-2	12	83.3	83.3	66.7	58.3	50.0	50.0	41.7*
2-4	16	93.8	87.5	81.3	43.8*	56.3	62.5	12.5*
4-6	11	100.0	90.9	81.8	45.5*	45.5*	45.5*	0*
6-8	7	100.0	85.7	85.7	57.1	28.6	42.9	0*
8-10	11	90.9	90.9	63.6	54.5	27.3*	27.3*	9.1*
10-12	15	86.7	66.7	73.3	86.7	33.3*	40*	26.7*
12-14	4	100.0	100.0	100.0	75.0	75.0	50.0	50.0
14-16	7	71.4	28.6	57.1	42.9	28.6	28.6	28.6
16-18	9	77.8	33.3	77.8	77.8	55.6	44.4	44.4
18-20	2	50.0	100.0	50.0	0.0	50.0	50.0	50.0
>20	1	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	100.0	100.0
Total	115	85.2	73.9*	73.0*	59.1*	47.0*	42.6*	37.4*

Figure 1

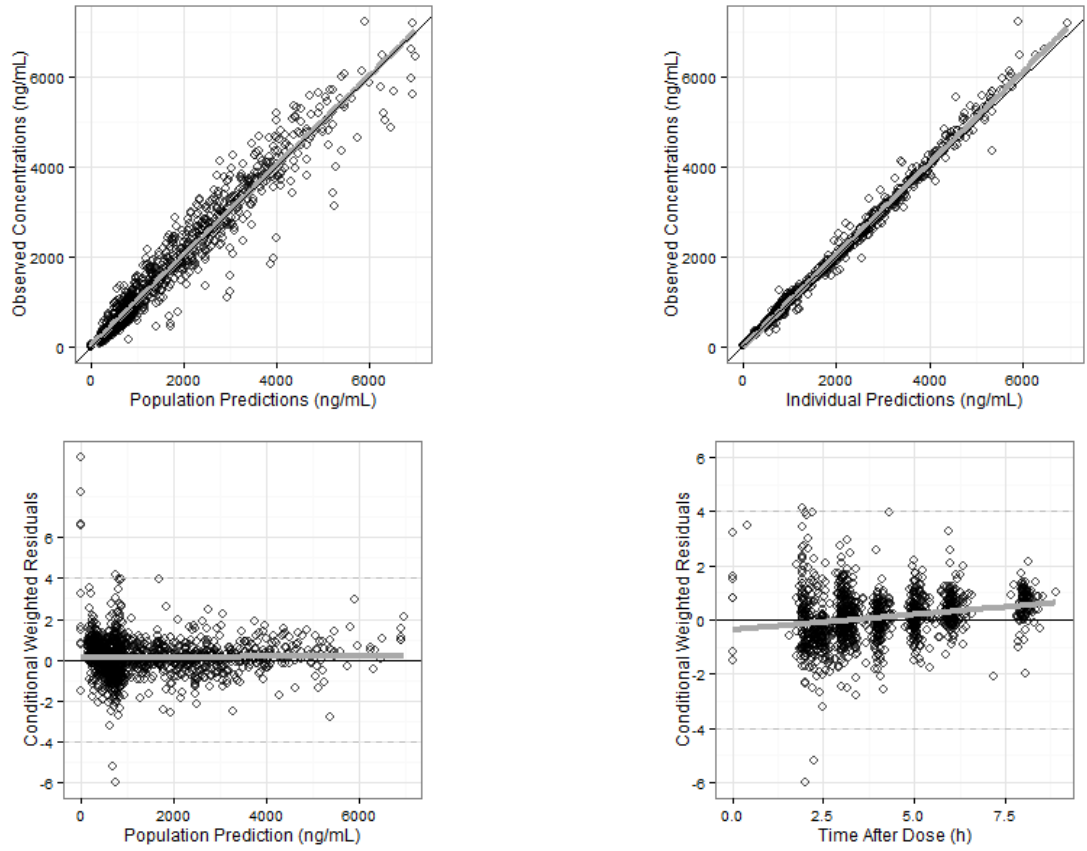
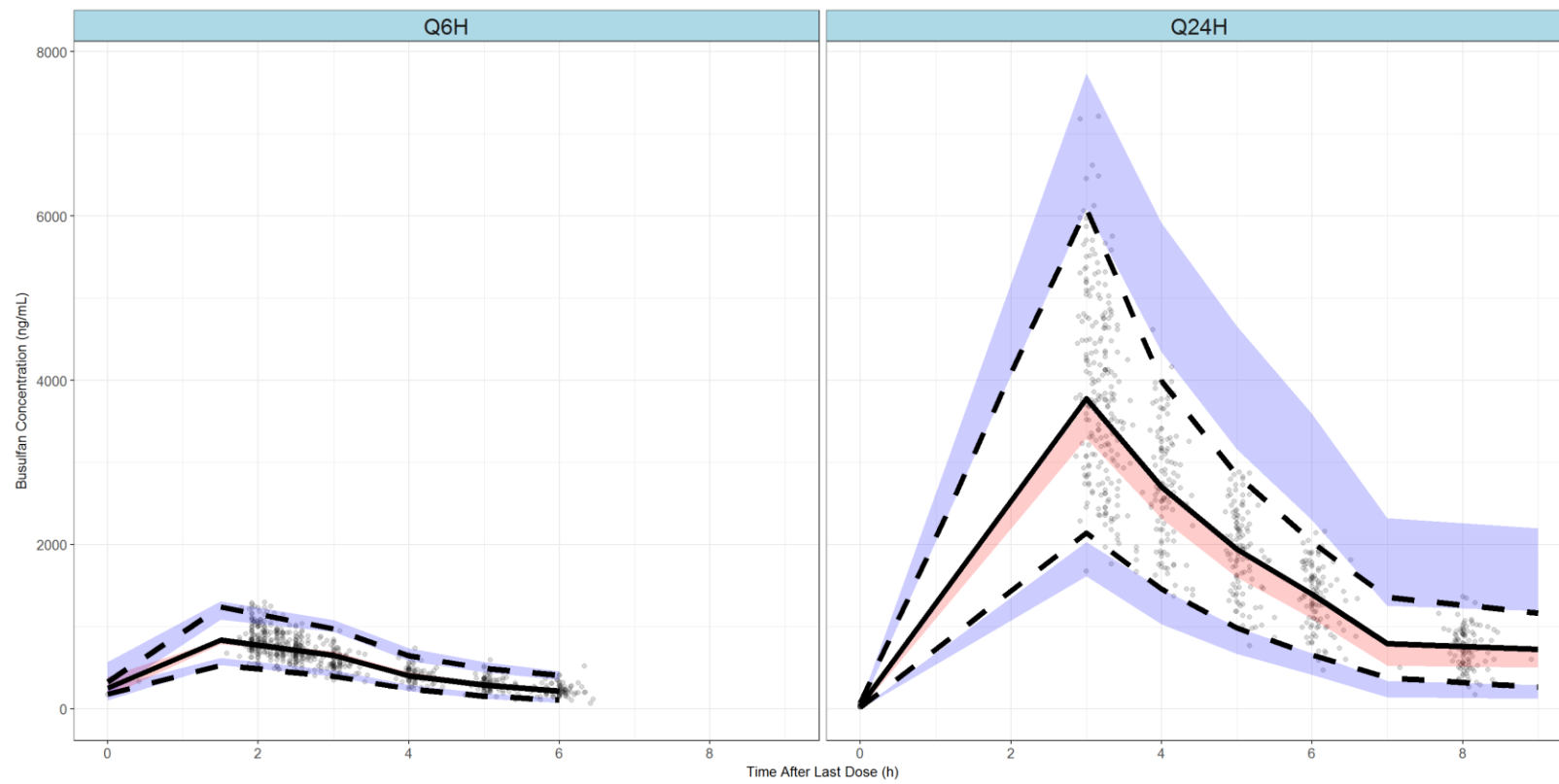


Figure 2



SUPPLEMENTAL MATERIAL

Haplotype	Nucleotide Change			
	-69 (C>T)	-513 (A>G)	-631 (T>G)	-1142(C>G)
<i>*A1</i>	C	A	T	C
<i>*A2</i>	C	A	G	C
<i>*A3</i>	C	A	T	G
<i>*B1a</i>	T	A	G	G
<i>*B1b</i>	T	G	G	G
<i>*B2</i>	T	A	G	C

Table S1. Haplotype composition based on single nucleotides variants of *GSTA1* (13).

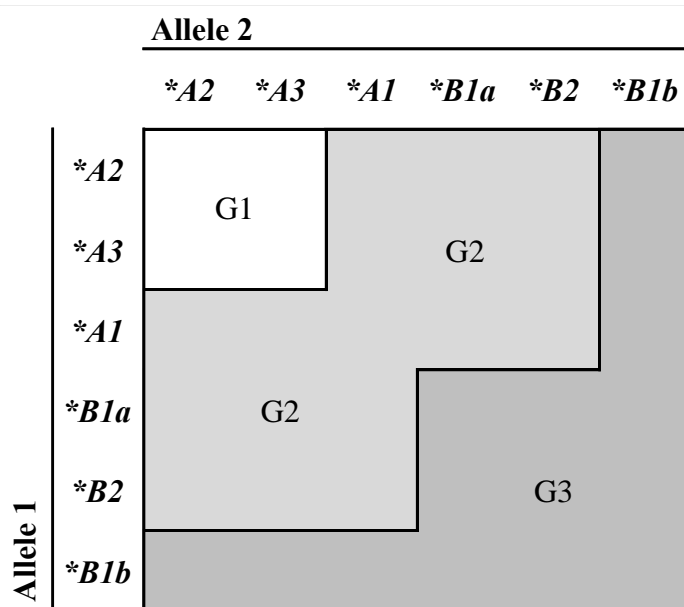


Figure S1. Composition of groups based on *GSTA1*-diploypes.

<p>FFM (<i>free fat mass</i>, Kg)</p> <p>Female: $WHS_{max}=37.99$, $WHS_{50}=35.98$ Male: $WHS_{max}=42.92$, $WHS_{50}=30.93$</p>	$FFM = WHS_{max} \times HT^2 \times \left(\frac{ABW}{WHS_{50} \times HT + ABW} \right)$	(A)
<p>NFM (<i>normal fat mass</i>, Kg);</p> <p>$FFat_{CL}=0.51$ e $FFat_V=0.20$ (25)</p>	$NFM_{CL \text{ or } V} = FFM + FFat_{CL \text{ ou } V} \times (ABW - FFM)$	(B)
<p>Fsize, where $pwr = 1$ for V and 0.75 for CL</p>	$F_{size} = \left(\frac{NFM}{70} \right)^{pwr}$	(C)
<p>Fmat, where $TM50=46$; Hill's coefficient=2,3 (25)</p>	$F_{mat} = \left(\frac{1}{1 + \left(\frac{IPM}{TM50} \right)^{-Hill}} \right)$	(D)
<p>PMA</p>	$PMA = \left(\frac{Age \text{ (years)}}{52} \right) + 40$	(E)
<p>Predicted Bu dose (mg) using target C_{ss}, individualized CL and dose frequency (t).</p>	$Dose_{pred} = CL_{pred} \left(\frac{L}{h} \right) \times C_{ss} \left(\frac{mg}{L} \right) \times t \text{ (h)}$	(F)

Table S2. Equations used in McCune's models (25). Abbreviations: FFM: free fat mass (Kg); ABW: actual body weight (Kg); HT: height (m); WHS_{max} : maximum FFM for na given height; WHS_{50} : ABW value when FFM is half of WHS_{max} ; NFM: normal fat mass (Kg); $FFat_{CL}$ and $FFat_V$: fraction of fat mass respectively implicated in clearance (CL) and volume of distribution (V); Fsize: size function; Fmat: maturation function; PMA: post-menstrual age; TM50: PMA when Bu metabolism reaches 50% of adult levels; C_{ss} : concentration of steady-state; t: dose frequency.

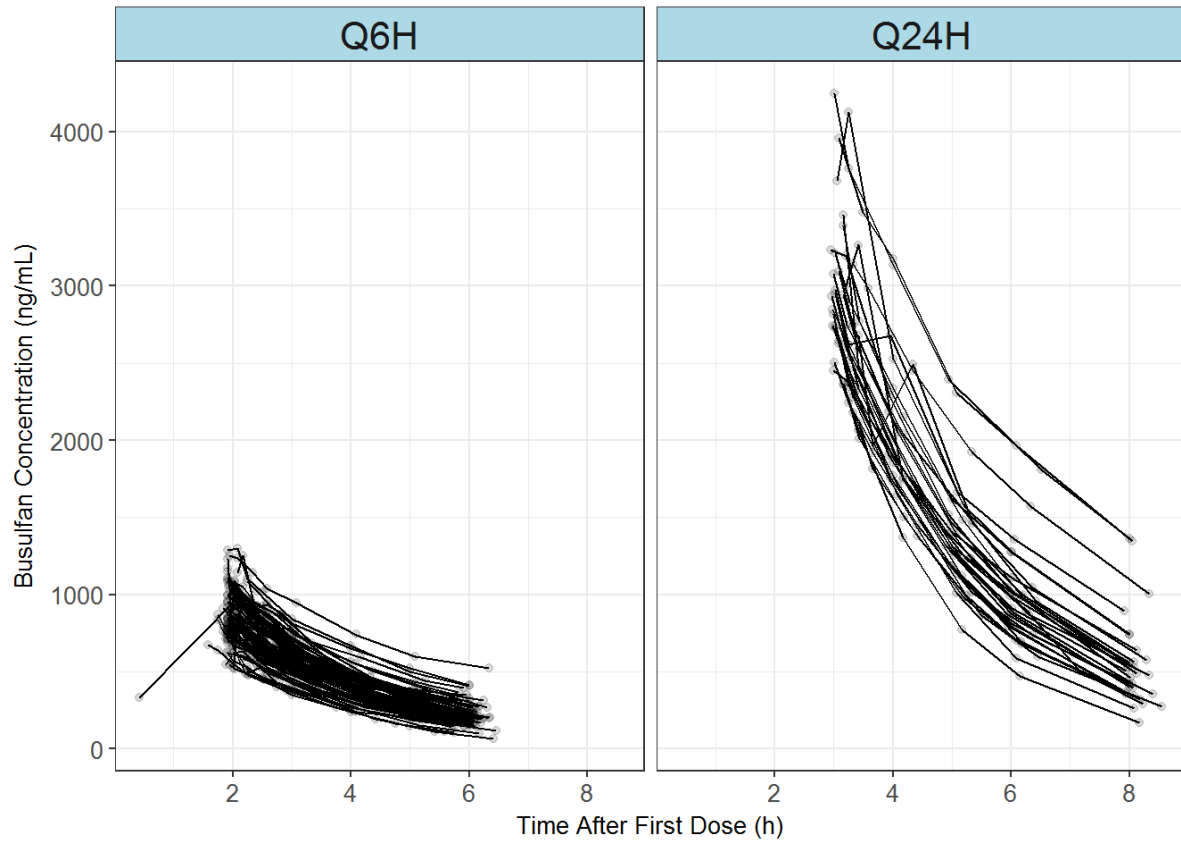


Figure S2. Blood Bu concentration vs. time after first dose. Q6H for doses every 6 hours and Q24H for doses every 24 hours.

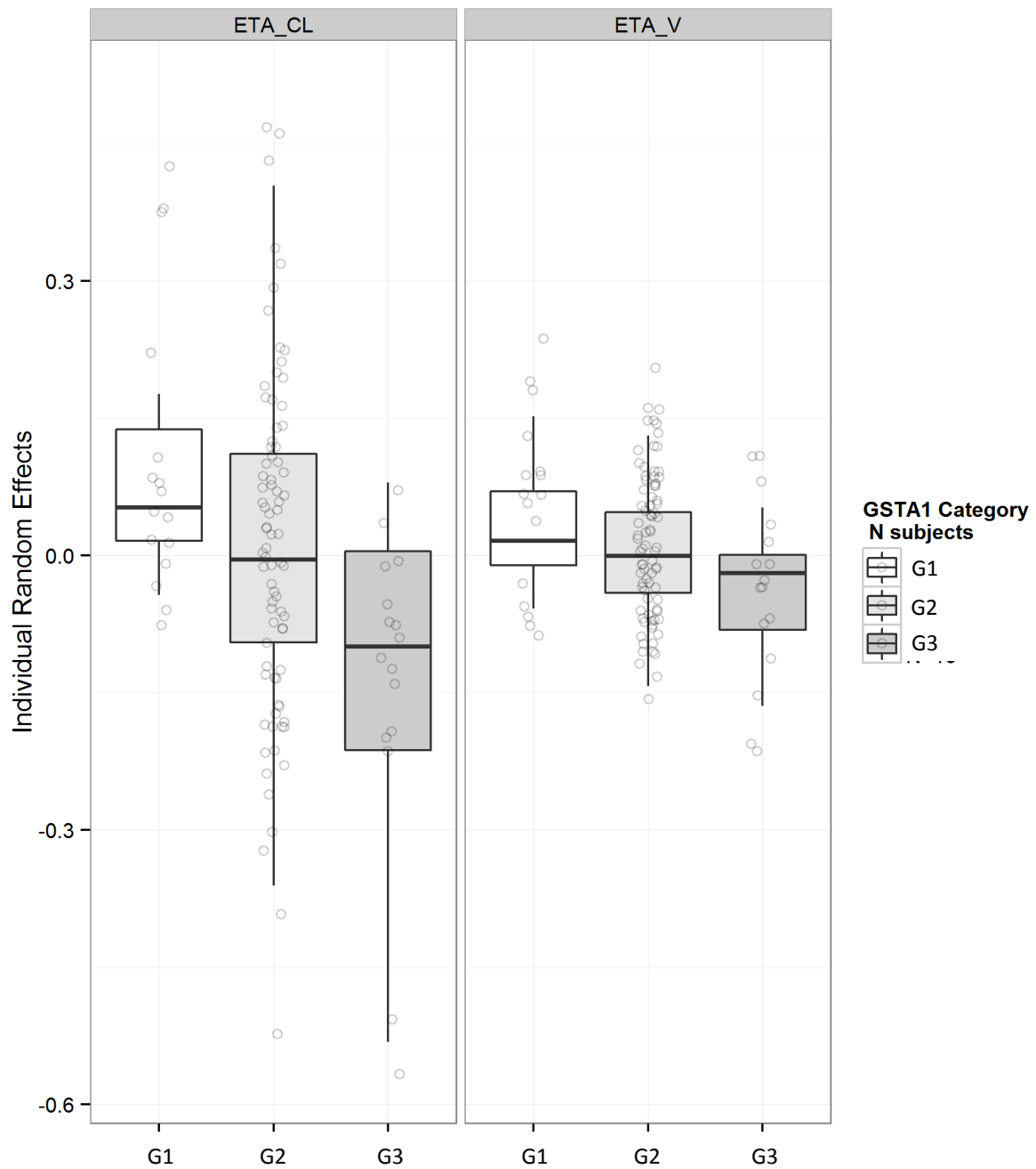


Figure S3. Box plot of random effects (ETA) on clearance (CL) and volume of distribution (V) from structural model according to GSTA1-based groups before their inclusion as covariates.

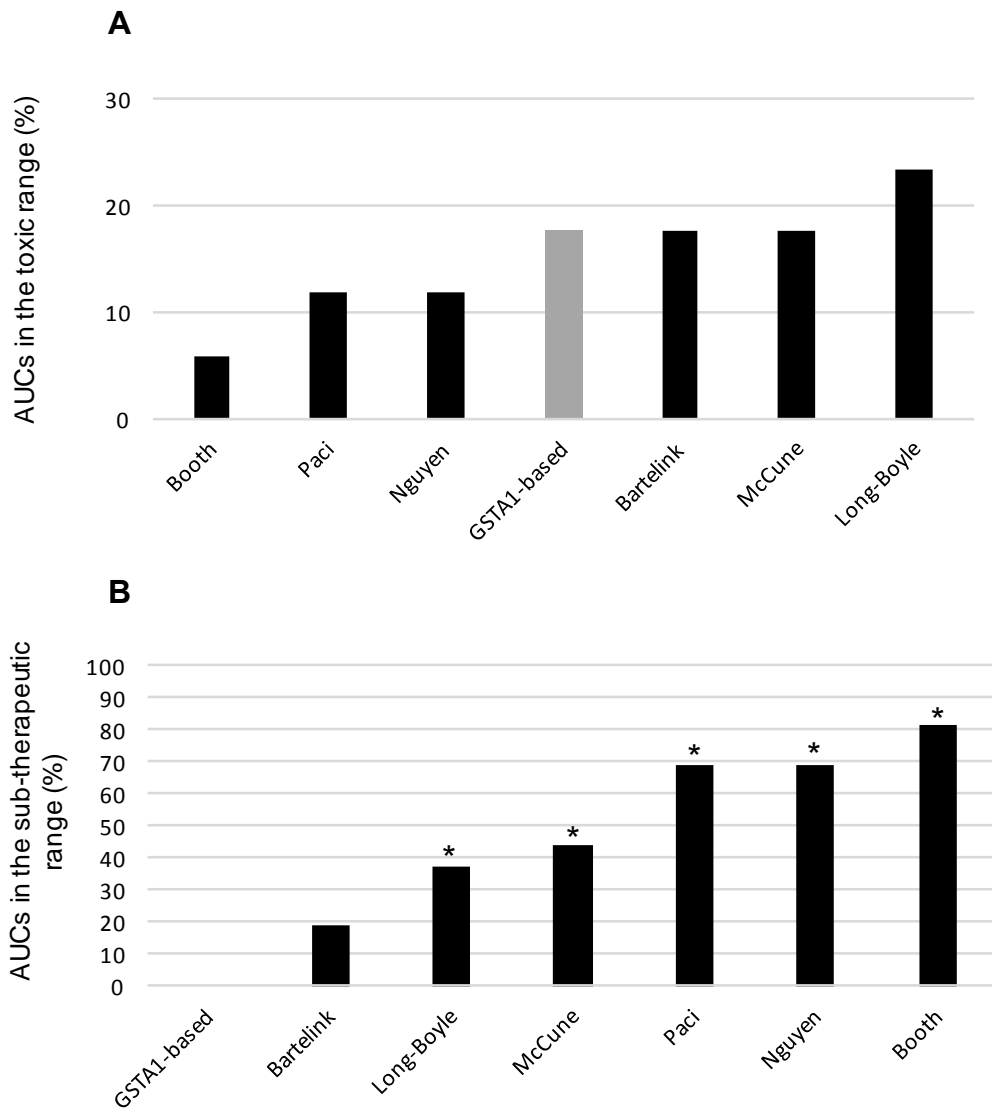


Figure S4. Models' performance in G1 and G3 patients. Predicted first dose AUCs in the toxic range among G3 patients (A) and sub-therapeutic first dose predicted AUCs among G1 patients (B). *Significant differences between respective models and GSTA1-based model ($p < 0.05$).

Author	N	Age range (years)	Via	τ (h)	Base model	PK parameters	Covariates	Reference
Long-Boyle	90	0.1-24	IV	6	1-compartment with theoretical allometric scaling	CL _{22Kg} = 4.32 L/h V _{22Kg} = 15.7 L	ABW and age	(26)
McCune	1,481 (133 available ABW)	0.1 - 65.8	IV	6, 8, 12, 24	2-compartment with theoretical allometric scaling	CL _{62Kg NFM} = 11.4 L/h V _{159Kg NFM} = 13.9 L Q _{62Kg NFM} = 135.2 L/h V _{259Kg NFM} = 29.9 L	F _{size} and F _{mat}	(25)
Savic	149	0.1-3.3	IV	6	1-compartment with theoretical allometric scaling	CL _{8Kg} = 2.3 L/h V _{8Kg} = 6.4 L	ABW, age, Mag _{mat} and K _{mat}	(27)
Bartelink	245	0.1-26	IV	6, 12, 24	2-compartment with empirical allometric scaling changing with body weight (1.2 to 0.55)	CL _{15.3Kg} = 3.47 L/h V _{15.3Kg} = 11.1 L Q _{15.3Kg} = 0.5 L/h V _{215.3Kg} = 76.8 L	ABW and age	(24)
Paci	115	0-12.3	IV	6	1-compartment with empirical allometric scaling with 2 allometric exponentials: 1.25 if ABW < 9Kg and 0.76 if ABW ≥ 9Kg	CL _{9Kg} = 2.18 L/h V _{9Kg} = 6.62 L	ABW	(28)
Trame	94	0.4-18.8	46% IV	6 (PO) 24 (IV)	Two 1-compartment models: 1) function of BSA and 2) ABW raised to 0.75	BSA model: CL = 4.2 L/h/m ² V = 18.4 L/Kg ABW model: CL _{11.9Kg} = 4.88 L/h V _{11.9Kg} = 218 L	ABW or BSA	(31)
Booth	24	0.25-16.7	IV	6	1-compartment with empirical allometric scaling (0.742 for CL and 0.843 for V)	CL _{20Kg} = 4.04 L/h V _{20Kg} = 12.8 L	ABW	(30)
Nguyen	24	0.45-16.7	IV	6	1-compartment with empirical allometric scaling for V (0.85). CL was a log-linear function of ABW	CL _{22.9Kg} = 3.10 L/h V _{22.9Kg} = 14.3 L	ABW	(32)
Veal	63	0.7-13.1	60% IV	6	1-compartment with theoretical allometric scaling	CL _{13Kg} = 13.1 L/h V _{13Kg} = 9.8 L	ABW	(21)
Zwaveling	77	0.2-23	IV	6, 24	1-compartment with empirical allometric scaling (0.84 for CL and 0.98 for V)	CL _{19Kg} = 4.8 L/h V _{19Kg} = 15 L	ABW	(34)

Table S3. Available PopPK models in paediatric population. ABW: actual body weight; BSA: body surface area; CL: clearance; V and V1: central volume of distribution; V2: volume of distribution in the peripheral compartment; Q: inter-compartmental clearance; Fsize: Size factor; Fmat: factor of maturation of Bu metabolism; Magmat: magnitude of maturation of Bu metabolism; Kmat: maturation coefficient.

Reference	N	Age range (years)	Conditioning	Tested genes	Clinical findings	PK findings
(48)	66	25 – 70	3% BuCy2 94% NMA	<i>GSTAI</i> , <i>GSTP1</i> , <i>GSTMI</i>	NS	Bu CL reduced by 14% for each allele <i>GSTAI</i> * <i>B</i> was present
(22)	24	0.9 – 18.1	70.8% BuFlu	<i>GSTAI</i> , <i>GSTT1</i> , <i>GSTMI</i>	NS	NS
(49)	18	4 – 16	100%Bu(VO)Cy4	<i>GSTAI</i> , <i>GSTT1</i> , <i>GSTM</i> , <i>GSTP1</i>	NS	Homozygous <i>GSTP1</i> 313A>G had C _{max} 15% lower than in heterozygous Bu C _{max} 25-30% higher in <i>GSTAI</i> * <i>A</i> / <i>*B</i> than <i>GSTAI</i> * <i>A</i> / <i>*A</i> or <i>*B</i> / <i>*B</i>
(34)	77	0.2 – 23	40% Bu q6h 60% Bu q24h	<i>GSTAI</i> , <i>GSTT1</i> , <i>GSTM</i> , <i>GSTP1</i>	<i>GSTMI</i> -null 1.7-fold higher risk of SOS	NS
(50)	66	16 – 58	39.7% BuCy2	<i>GSTAI</i> , <i>GSTT1</i> , <i>GSTM</i> , <i>GSTP1</i>	NA	Higher AUCs in presence of <i>GSTAI</i> * <i>A</i> (dominant allele) Lower Bu CL in <i>GSTMI</i> / <i>GSTT1</i> -double-null patients
(35)	69	0.1 – 19.9	89.9% BuCy4	<i>GSTAI</i> , <i>GSTP1</i> , <i>GSTMI</i>	<i>GSTAI</i> * <i>B</i> / <i>*B</i> e <i>GSTAI</i> * <i>B1b</i> / <i>*B1b</i> higher risk of SOS (HR 10 and 5.6, respectively) <i>GSTMI</i> -null 4-fold higher risk of aGVHD	Bu CL higher in presence of <i>GSTAI</i> * <i>A2</i> (dominant allele) Lower Bu CL in <i>GSTMI</i> -null patients

Reference	N	Age range (years)	Conditioning	Tested genes	Clinical findings	PK findings
(51)	44	1.5 – 17	100% Bu(160m2)Cy4	<i>GSTAI</i> , <i>GSTM1</i>	<i>GSTM1</i> -null 5-fold higher risk of aGVHD	Higher Bu CL in presence of <i>GSTAI</i> *A (dominant allele) Lower Bu CL in <i>GSTAI</i> *A/*B than *A/*A patients
(44)	25	13 – 61	100% BuCy2 (1,8m ² /d) BU IV 1x/dia	<i>GSTAI</i> , <i>GSTP1</i>	NS	Lower Bu CL in presence of <i>GSTP1</i> 313A>G (dominant allele) Bu CL/F 11% and 18% lower when 1 or 2 <i>GSTAI</i> *B allele are present, respectively.
(52)	114	16 – 65	100% Bu(PO)Cy2	<i>GSTAI</i> , <i>GSTT1</i> , <i>GSTM</i> , <i>GSTP1</i>	<i>GSTM1</i> -null associated with higher mortality within the first 30 days post-HSCT	Css 60% higher in patients <i>GSTAI</i> *B/*B and <i>GSTT1</i> / <i>GSTM1</i> -double-null
(53)	114	2 – 16	100% Bu(PO)Cy4	<i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i>	<i>GSTM1</i> -null 3-fold higher risk of SOS	Lower Bu CL/F in <i>GSTM1</i> -null patients
(33)	36	18 – 64	42% BuCy2	<i>GSTAI</i> , <i>GSTT1</i> , <i>GSTM</i> , <i>GSTP1</i>	NS	Bu CL 15% lower in heterozygous <i>GSTAI</i> *B
(54)	29	0.1 – 18.3	86% BuCy4	<i>GSTAI</i> , <i>GSTM1</i> , <i>GSTP1</i>	NA	Bu CL 30% lower in <i>GSTAI</i> *B or *B/*B patients.
(55)	12	20 – 60	50%Bu(PO)Cy2	<i>GSTAI</i>	NA	Bu CL/F lower in <i>GSTAI</i> *B
(56)	61	17 – 52	100% BuCy2 (PO e IV)	<i>GSTAI</i>	<i>GSTAI</i> *B 2.7-fold higher risk of aGVHD	NA

Table S4. Evidence of the GSTs genetic variations as associated factor with clinical and/or PK outcomes. Cy2: cyclophosphamide 60mg/kg/day for 2 consecutive days; Cy4: cyclophosphamide 50mg/kg/day for 4 consecutive days; Flu: fludarabine; NS: not significant; NA: not available; SOS: sinusoidal obstructive syndrome; aGVHD: acute graft versus host disease; CL: clearance; C_{max}: maximal concentration; AUC: area under the curve. CL/F: apparent clearance; C_{ss}: concentration of *steady-state*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo possibilitou concluir que mesmo os métodos mais atuais e mais eficazes de predição dos parâmetros farmacocinéticos do Bu demonstram desvios importantes, associados às diferentes capacidades de expressão da enzima glutationa S-transferase $\alpha 1$, aqui representados pelas variantes do seu gene, *GSTAI*. Diplótipos cujos potenciais de expressão são semelhantes, combinados em três grupos distintos, mostraram estar relacionados significativamente com o erro de predição, mais evidente naqueles considerados metabolizadores lentos (G3) e metabolizadores rápidos (G1). Após esta constatação, com base na mesma classificação em três grupos de diplótipos, *GSTAI* foi incluído em um modelo de FC de população, através do qual valores de *clearance* individualizados puderam ser preditos e, a partir desses, doses personalizadas do Bu. Dessa forma, determinou-se que, na definição das doses do Bu devem ser consideradas, além dos fatores peso do paciente e seu grau de maturação do metabolismo da droga, também as variantes de *GSTAI* presentes em cada indivíduo, o que resultou em doses 12% menores em pacientes considerados metabolizadores lentos (G3) e 7% maiores em metabolizadores rápidos (G1). Além disso, o presente modelo mostrou-se eficaz em todo o *continuum* de idade entre 0 e 21 anos, comparativamente melhor que os outros métodos atuais, evidenciando vantagem na inclusão deste fator genético. Assim sendo, entende-se que estamos diante do primeiro modelo de FC de população do Bu baseado em farmacogenética a ser descrito em pediatria, fato que o qualifica, salvo melhor juízo, como o modelo que melhor descreve a capacidade do metabolismo individual do Bu, ao combinar características inatas (*GSTAI*), antropométricas e de amadurecimento da via

de metabolização da droga ao curso dos primeiros anos de vida. O cálculo de dose baseado neste modelo, por seu desempenho, pode contribuir para uma melhor previsibilidade da FC do Bu e, em decorrência, para uma predição mais acurada da exposição de crianças e adolescentes à droga, de acordo com a capacidade metabólica de cada indivíduo.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Os achados apresentados neste estudo contribuem para o aprimoramento das recomendações de prescrição de Bu em pediatria por meio da integração de um fator genético no cálculo da dose a ser utilizada durante condicionamento para TCTH. Até o presente momento baseadas unicamente em idade e antropometria, essas recomendações são definidas, muitas vezes, a partir de modelos de FC de população de pequeno porte, alguns destes apresentando um desempenho questionável ao longo de toda a faixa etária pediátrica. Contudo, para melhor avaliação da eficácia e da segurança das doses previstas pelo proposto modelo, sugere-se fortemente um estudo prospectivo em que este possa ser comparado a outras formas de cálculo de dose do Bu em pediatria, não baseadas em farmacocinética. Da mesma forma, uma vez confirmada a capacidade preditiva do modelo proposto, este pode ser considerada uma ferramenta útil a empregar-se em outros estudos, principalmente visando à comprovação do conceito intuitivo de que uma distribuição mais homogênea da exposição ao Bu ao longo do condicionamento estaria associada a uma menor toxicidade associada ao tratamento.