

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA

Ana Olívia Martins Laurentino

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E SUBCRÔNICA DE LEVAMISOL, UM
ADULTERANTE DA COCAÍNA, EM RATOS**

Porto Alegre

2020

Ana Olívia Martins Laurentino

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E SUBCRÔNICA DE LEVAMISOL, UM
ADULTERANTE DA COCAÍNA, EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Farmacologia e Terapêutica.

Orientadora: Profa. Dra. Mirna Bairy Leal.

Porto Alegre

2020

CIP - Catalogação na Publicação

Laurentino, Ana Olívia Martins
Avaliação da toxicidade aguda e subcrônica de
levamisol, um adulterante da cocaína, em ratos / Ana
Olívia Martins Laurentino. -- 2020.
63 f.
Orientadora: Mirna Bainy Leal.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Porto Alegre,
BR-RS, 2020.

1. Levamisol. 2. Toxicidade. 3. Cocaína. 4.
Adulteração. 5. Neurotoxicidade. I. Leal, Mirna Bainy,
orient. II. Título.

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E SUBCRÔNICA DE LEVAMISOL, UM ADULTERANTE DA COCAÍNA, EM RATOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia e Terapêutica.

Aprovado em 24 de setembro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Herrmann – UFRGS

Prof^a. Dr^a. Flávia Valladão Thiesen – PUCRS

Prof^a. Dr^a. Renata Pereira Limberger – UFRGS

Prof^a. Dr^a. Mirna Bairy Leal – UFRGS (orientadora)

*Dedico este trabalho aos meus pais e à minha tia, Eziane, que
sempre acreditaram no meu potencial, até quando
eu mesma não acreditei.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus que me ajudou a chegar onde estou agora e que encheu esta trajetória de dádivas mesmo eu não sendo merecedora na maioria das vezes. Sou grata aos meus pais, que são meus guias e meus exemplos, à minha tia Eziane, ao meu primo João Pedro e à Nilceane. Agradeço por sempre terem acreditado nos meus sonhos, por me acolherem e por sempre me incentivarem. Obrigada por sempre me tratarem com amor, carinho e respeito. Eu amo infinitamente vocês.

Agradeço à Prof. Dra. Mirna Bainy Leal por ter me aceitado sem nem me conhecer direito e por ter sido uma orientadora magnífica. Obrigada por sempre me tratar com tanto carinho e paciência, por me entender e me apoiar, por ter se preocupado com o meu aprendizado e com o meu crescimento pessoal e profissional, e por sempre ser tão presente. Admiro muitíssimo a profissional e a pessoa que és.

Sou extremamente grata também ao Prof. Dr. Marcelo Dutra Arbo, à Profa. Dra. Eliane Dallegrave, aos seus alunos, à Janaína Solomón e ao Douglas Marquez que me auxiliaram com tanta apazibilidade durante a execução dos procedimentos experimentais e análise de dados. Agradeço também ao Prof. Dr. Elvino Barros e o Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela colaboração, à equipe sensacional do CREAL/UFRGS que tão solícitamente me auxiliaram durante este projeto e aos órgãos de fomento que tornaram possível a execução deste.

Sou grata ao meu grande amigo e colega de trabalho André Luís Oenning Tschiedel por ter sido tão compreensivo comigo durante os períodos que precisei me ausentar do laboratório para viajar e me dedicar ao mestrado, por ter me ajudado diversas vezes a entender meus resultados e por compartilhar comigo os ônus e os bônus da vida. Obrigada às minhas companheiras de jornada acadêmica, Amanda Gressler Moreira e Franciele Kich Giongo, pela cumplicidade, pelos auxílios, pelas conversas e por compartilharem esta parte do caminho comigo. Vocês fizeram toda a diferença. Agradeço também aos meus amigos por sempre estarem ao meu lado e por sempre me incentivarem a buscar mais. E, finalmente, gostaria de agradecer a todas as pessoas não mencionadas que contribuíram na execução deste trabalho.

Por isso, ou por tudo isso, eu lhes sou muitíssimo grata.

RESUMO

O anti-helmíntico levamisol (LVS) é uma das principais substâncias utilizadas na adulteração da cocaína. Estudos demonstram que sua presença em amostras de cocaína aumentou em todo o mundo, assim como, o desenvolvimento de patologias associadas a esta combinação, tais como: vasculite sistêmica, agranulocitose, neutropenia, necrose tecidual, hemorragia pulmonar e lesão renal. Contudo, os dados sobre a toxicidade do LVS são escassos, portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos tóxicos agudos e subcrônicos do LVS em ratos. Grupos de ratos *Wistar*, machos receberam (via intraperitoneal) salina ou LVS nas doses de 12, 24 e 36 mg/kg no teste de toxicidade aguda (N=5/grupo) e de 3, 6 e 12 mg/kg no teste de toxicidade subcrônica (N=10/grupo). A toxicidade foi avaliada através de parâmetros comportamentais, cognitivos, renais, hematológicos, bioquímicos e histopatológicos. A administração aguda de LVS causou alterações comportamentais severas, congestão dos órgãos, aumento da excreção urinária de K⁺ e creatinina e diminuição dos níveis séricos de GSH, sendo estes efeitos mais proeminentes nas doses de 24 e 36 mg/kg. A administração subcrônica causou alterações comportamentais e cognitivas, congestão dos órgãos, aumento do peso relativo do fígado, alterações hematológicas, aumento dos níveis de FAL, aumento da excreção urinária de mAlb e Na⁺, aumento dos níveis séricos de GSH e diminuição dos níveis de tióis totais no fígado, sendo estes efeitos mais acentuados nas doses de 6 e 12 mg/kg. Desta forma, observamos que os tratamentos causaram efeitos tóxicos de relevância clínica, fazendo do LVS um perigoso adulterante. Contudo, são necessários mais estudos para elucidar os mecanismos envolvidos nas alterações observadas e para verificar os efeitos da combinação com a cocaína.

Palavras-chave: Levamisol. Toxicidade. Cocaína. Adulteração. Neurotoxicidade.

ABSTRACT

The anthelmintic levamisole (LVS) is one of the main substances used in adulteration of cocaine. Studies show that its presence in cocaine samples has increased worldwide, as well as the development of pathologies associated with this combination, such as: systemic vasculitis, agranulocytosis, neutropenia, tissue necrosis, pulmonary hemorrhage, and kidney injury. However, data about toxicity of LVS are scarce, therefore, the aim of this study was to evaluate the acute and subchronic toxic effects of LVS in rats. Groups of male Wistar rats received (intraperitoneal route) saline or LVS at doses of 12, 24 and 36 mg/kg in the acute toxicity test (N=5/group) and 3, 6 and 12 mg / kg in the subchronic toxicity test (N=10/group). Toxicity was assessed using behavioral, cognitive, renal, hematological, biochemical, and histopathological parameters. Acute administration of LVS caused severe behavioral alterations, congestion of the organs, increased urinary excretion of K⁺ and creatinine, and decreased serum levels of GSH. These effects were more prominent at the doses of 24 and 36 mg/kg. Subchronic administration caused behavioral and cognitive alterations, congestion of the organs, increase in the relative weight of the liver, hematological changes, increased levels of FAL, increased urinary excretion of mAlb and Na⁺, increased serum levels of GSH and decreased total thiols levels in the liver. These effects were more pronounced at doses of 6 and 12 mg/kg. Thus, we observed that the treatments produced toxic effects of clinical relevance, making LVS a dangerous adulterant. However, further studies are needed to elucidate the mechanisms involved in the observed alterations and to verify the effects of the combination with cocaine.

Keywords: Levamisole. Toxicity. Cocaine. Adulteration. Neurotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figure 1 – Experimental design of acute toxicity test.	30
Figure 2 – Experimental design of subchronic toxicity test.	31
Figure 3 – Percentage of survivors in the control, LVS 12 mg/kg, LVS 24 mg/kg and LVS 36 mg/kg after the acute administrations. * $p < 0,05$ vs control (Log-rank test). ...	35
Figure 4 – Serum levels of reduced glutathione (GSH) after acute administration of LVS. Data are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0,05$ vs control (ANOVA + post hoc Bonferroni).	37
Figure 5 – Latency to fall (s) in the rotarod test (A), average speed (B) and total distance traveled (B) observed in the spontaneous locomotor activity test conducted on the 25th and 35th day of treatment of subchronic toxicity test, respectively. Data are expressed as mean \pm SEM. ** $p \leq 0,001$ vs control and **** $p < 0,0001$ vs control (ANOVA + post hoc Bonferroni).	38
Figure 6 – Interaction time in seconds with the object A1 and A2 during the training session (A), object recognition index observed in the short-term (B) and in the long-term (C) memory test. Data are expressed as mean \pm SEM (A) and median (interquartile ranges) (B and C). ** $p < 0,05$ vs control (one-way ANOVA + post hoc Bonferroni). STM=short-term memory; LTM=long-term memory.	39
Figure 7 – Serum levels of reduced glutathione (GSH) (A) and total thiols levels in liver (B) after subchronic administration of LVS. Data are expressed as mean \pm SEM. ** $p < 0,01$ vs control (Kruskal-Wallis + post hoc Dunn's) and *** $p \leq 0,0001$ vs control (ANOVA + post hoc Bonferroni).	42

LISTA DE TABELAS

Table 1 – Toxic signs evaluated after acute LVS administration.	355
Table 2 – Excretion of urinary biomarkers after acute administration of LVS. Data are expressed as mean ± SEM. *p<0,05 vs control (ANOVA + post hoc Bonferroni). K+=potassium ion; Na+=sodium ion; mAlb=microalbuminuria.....	36
Table 3 – Relative organs weight collected after the subchronic administration of LVS. Data are expressed as mean ± SEM. ****p<0.0001 vs control (ANOVA + post hoc Bonferroni).....	39
Table 4 – Complete blood count evaluated after subchronic LVS administration. Data are expressed as mean ± SEM. *p<0,05 vs control (ANOVA + post hoc Bonferroni or Kruskal-Wallis + post hoc Dunn's). MPV = mean platelet volume.....	40
Table 5 – Levels of serum biomarkers after subchronic administration of LVS. Data are expressed as mean ± SEM. *p<0.05 vs control (ANOVA + post hoc Bonferroni). AST=aspartate aminotransferase; ALT=alanine aminotransferase; γ-GT=γ-glutamyltranspeptidase; ALP=alkaline phosphatase; LDH=lactate dehydrogenase..	40
Table 6 – Excretion of urinary biomarkers after subchronic administration of LVS. Data are expressed as mean ± SEM. *p<0.05 vs control (ANOVA + post hoc Bonferroni). K+=potassium ion; Na+=sodium ion; mAlb=microalbuminuria.....	41
Table S1 – Relative organs weight collected after the acute administration of LVS. Data are expressed as mean ± SEM.....	53
Table S2 – Complete blood count evaluated after acute LVS administration. Data are expressed as mean ± SEM.....	53
Table S3 – Levels of serum biomarkers after acute administration of LVS. Data are expressed as mean ± SEM. AST = aspartate aminotransferase; ALT = alanine aminotransferase; γ-GT = γ-glutamyltranspeptidase; ALP = alkaline phosphatase; LDH = lactate dehydrogenase.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

- AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida (do inglês: *Acquired immunodeficiency syndrome*)
- ALP – *Alkaline phosphatase*
- ALT - *Alanine aminotransferase*
- AST – *Aspartate aminotransferase*
- ANCA – Anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos
- CNS – *Central Nervous System*
- DAT – Transportador de dopamina (do inglês: *Dopamine transporter*)
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- FAL – Fosfatase alcalina
- FDA – *Food and drug administration*
- GSH – Glutathiona reduzida
- I.P. – *Intraperitoneal route*
- IUPAC – União internacional de química pura e aplicada (do inglês: *International Union of Pure and Applied Chemistry*)
- K⁺ - *Potassium ion*
- LDH – *Lactate dehydrogenase*
- LTM – *Long term memory*
- LVS – Levamisol
- mAlb – Microalbuminúria
- MAO – Monoamina oxidase
- MDA – Malondialdeído
- MPO – Mieloperoxidase
- MPV – *Mean platelet volume*
- Na⁺ - *Sodium ion*
- nAChRs – *Nicotinic acetylcholine receptors*
- NAG – *N-acetyl-beta-D glucosaminidase*
- NMDA – *N-methyl-D-aspartate*
- NT – Neurotransmissores
- NET – Transportador de norepinefrina (do inglês: *Norepinephrine transporter*)
- OECD – Organização para a cooperação e desenvolvimento econômico (do inglês: *Organization for Economic Co-operation and Development*)

p-ANA – *Positive anti-nuclear antibody*

p-ANCA – Anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos positivo

RBC – *Red blood cells*

SERT – Transportador de serotonina (do inglês: *Serotonin transporter*)

SNC – Sistema nervoso central

STM – *Short term memory*

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês: *Thiobarbituric acid reactive substances*)

TNAP – *Tissue non-specific alkaline phosphatase*

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está estruturada de forma a tentar tornar a leitura mais fluida e objetiva. Sendo assim, há primeiro uma introdução geral abordando os principais aspectos do levamisol e da cocaína, bem como, os efeitos da sua associação, seguida pelos objetivos. A metodologia, os resultados e a discussão desta dissertação estão apresentados na forma de um artigo científico que será submetido ao periódico *Journal of Toxicology and Applied Pharmacology*. Na sequência, são apresentadas as conclusões finais abordando os principais resultados, as perspectivas e as referências utilizadas na introdução.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. LEVAMISOL	15
1.2. A COCAÍNA E SEUS EFEITOS	16
1.3. PRINCIPAIS ADULTERANTES DA COCAÍNA	19
1.4. PORQUE A COCAÍNA É ADULTERADA COM LEVAMISOL?	20
1.5. CONSEQUÊNCIAS CLÍNICAS DO USO DE COCAÍNA ADULTERADA COM LEVAMISOL	21
2. OBJETIVOS	24
2.1. OBJETIVO GERAL.....	24
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3. ARTIGO EM PREPARAÇÃO	25
4. CONCLUSÕES GERAIS.....	56
5. PERSPECTIVAS.....	58
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA	63

1. INTRODUÇÃO

O levamisol (LVS) é um anti-helmíntico utilizado na farmacoterapia veterinária e humana, é um agonista nicotínico e exerce sua ação nas junções neuromusculares dos vermes causando paralisia nos mesmos o que, por consequência, facilita a sua eliminação por via fecal (MARQUEZ *et al.*, 2017). Todavia, estudos demonstram que desde meados de 2002 o LVS começou a ser utilizado também como um importante adulterante da cocaína (BRUNT *et al.*, 2017).

A cocaína é um alcaloide obtido a partir das folhas da planta *Erythroxylum coca* Lam. e é uma das drogas recreativas mais utilizadas no mundo devido a sua ação psicoestimulante (KUDLACEK *et al.*, 2017). Ela age bloqueando os transportadores das monoaminas causando um acúmulo dessas substâncias nos receptores pré e pós-sinápticos e gerando os efeitos associados à droga (BRUNT *et al.*, 2017). Atualmente, pode ser encontrada de duas formas diferentes, sendo elas: o sal (cloridrato), conhecido como o pó de cocaína, e a base livre, que quando é incorporada a amônia ou ao bicarbonato de sódio pode ser fumada (crack) (KUDLACEK *et al.*, 2017).

Pesquisas demonstram que o número de amostras contendo LVS vem crescendo a cada ano (BRUNT *et al.*, 2017). Casale *et al.* (2012) e Van Laar *et al.* (2015), por exemplo, afirmam que, em nível mundial, mais de 65% das amostras de cocaína contém LVS. Neste sentido, muito tem se discutido na literatura acerca da utilização do LVS como adulterante e atualmente acredita-se que ele seja utilizado por três razões, sendo elas: 1) promover o aumento da massa da droga vendida; 2) potencializar os níveis de dopamina no Sistema Nervoso Central (SNC) e levar a um aumento na ativação do sistema de recompensa; 3) prolongar os efeitos da cocaína devido ao fato de seu metabólito, o aminorex, ter propriedades cujos efeitos são semelhantes aos proporcionados pelo uso de compostos anfetamínicos (NOLAN & JEN, 2015; MARQUEZ *et al.*, 2017).

Contudo, apesar dos “benefícios” alegados que a adulteração com LVS traz, diversos estudos têm descrito a ocorrência de manifestações clínicas associadas ao uso de cocaína adulterada com LVS, tais como: neutropenia, agranulocitose,

glomerulonefrite, leucoencefalopatia, insuficiência renal e vasculite (NOLAN & JEN, 2015; MARQUEZ *et al.*, 2017; BRUNT *et al.*, 2017).

Apesar de haver diversos estudos de caso relatando os efeitos da adulteração da cocaína com LVS, pesquisas que envolvam a metabolização de droga bruta são escassas, bem como, pesquisas que elucidem a fisiopatologia e as manifestações clínicas apresentadas por usuários de droga adulterada. Sendo assim, torna-se interessante avaliar os efeitos sistêmicos do uso de LVS em diferentes doses.

1.1. LEVAMISOL

O LVS foi registrado em 1966 como um anti-helmíntico utilizado tanto na farmacoterapia veterinária quanto na humana. Sua nomenclatura usual segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*) é (S)-6-phenyl-2,3,5,6-tetrahydroimidazo[2,1-b][1,3]thiazole e sua fórmula química é $C_{11}H_{12}N_2S$. Ele pode ser encontrado na forma de sal (cloridrato), sendo o cloridrato de LVS um pó branco, inodoro e hidrofílico (POPE *et al.*, 2018; BRUNT *et al.*, 2017).

Além de anti-helmíntico ele também já foi utilizado devido aos seus efeitos imunomoduladores para o tratamento da artrite reumatoide, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), colite ulcerativa, síndrome nefrótica e como um adjuvante na quimioterapia do câncer colorretal. Entretanto, este medicamento precisou ser retirado do mercado em alguns países devido aos efeitos colaterais graves gerados como, por exemplo: a agranulocitose, caracterizada pela diminuição drástica do número dos leucócitos polimorfonucleares (BRUNT *et al.*, 2017; WOLFORD *et al.*, 2012). No Brasil ele ainda é comercializado para uso humano.

Quanto aos parâmetros farmacocinéticos, sua absorção por via oral é rápida, sendo que a concentração máxima é atingida dentro de 1,5–2 horas, porém não existem dados sobre a absorção por via nasal ou intravenosa, vias mais utilizadas pelos usuários de cocaína (REID *et al.*, 1998). Uma única dose de 150 mg por via oral,

por exemplo, gera um pico de concentração plasmática de $0,7 \pm 0,2$ mg/L e uma biodisponibilidade de 60–70%. O LVS é metabolizado no fígado, sendo o seu principal metabólito o aminorex, apresenta uma meia-vida de 2-6 horas e é eliminado pela urina (LUYCKX *et al.*, 1982; HESS *et al.*, 2014).

Sua função anti-helmíntica se dá porque ele age como um agonista dos receptores nicotínicos colinérgicos, causando espasmos musculares seguidos de paralisia nos vermes, impedindo que eles se locomovam e facilitando a eliminação deles nas fezes (BRUNT *et al.*, 2017). Além disso, estudos experimentais mostraram que o LVS também é capaz de exercer efeitos sobre os receptores nicotínicos em humanos, de alterar o metabolismo dos neurotransmissores (NT) monoaminérgicos através da inibição da ação da monoaminaoxidase (MAO), de elevar os níveis de opioides endógenos e de ativar a liberação de dopamina em certas áreas cerebrais, porém, os mecanismos pelos quais esses efeitos ocorrem permanecem desconhecidos (HERNANDO *et al.*, 2012; HOFMAIER *et al.*, 2014; SPECTOR *et al.*, 1998).

Segundo Kudlacek *et al.* (2017), o LVS pode também exercer efeitos parecidos com as anfetaminas, porém autores sugerem que este efeito esteja mais relacionado ao seu metabólito, o aminorex, do que ao LVS de fato. O aminorex é um metabólito que possui propriedades inibitórias dos transportadores da dopamina (DAT, do inglês *dopamine transporter*), da noradrenalina (NET, do inglês *norepinephrine transporter*) e da serotonina (SERT, do inglês *serotonin transporter*), agindo mais especificamente nos DAT e NET. Tal fato contribui para o aumento extracelular dos níveis de dopamina e estudos mostram que o potencial inibitório do aminorex sobre os DAT é bastante similar ao da cocaína (HOFMAIER *et al.*, 2014).

1.2. A COCAÍNA E SEUS EFEITOS

O alcaloide 3-benzoiloxi-8-metil-8-azabicyclo[3,2,1]octano-4-carboxílico, conhecido como cocaína, é umas das drogas recreativas mais utilizadas em todo o

mundo. Ele é extraído das folhas das plantas do gênero *Erythroxylum*, popularmente conhecida como coca, sendo estas nativas da América do Sul, do México, das Índias Ocidentais e da Indonésia (KUDLACEK *et al.*, 2017).

A coca era muito utilizada por civilizações andinas antigas em cerimônias religiosas e na medicina tradicional como um potente anestésico local, porém, as folhas e todas as substâncias derivadas dela foram consideradas como substâncias entorpecentes pelo Decreto-Lei nº 891, de 25 de novembro de 1938, sendo seu comércio ilegal e proibido em território nacional (DE SOUSA LIMA *et al.*, 2018; SENA, 2016); atualmente a regulação se dá através da Portaria SVS/MS nº 344, de 12 de maio de 1998.

Os alcaloides totais da coca podem ser encontrados em proporções de 0,5 a 1,5% nas folhas da planta, sendo que destes em torno de 75% corresponde à cocaína (UNODC, 2008). Para que a extração seja a mais efetiva possível é necessário que a planta seja jovem e, para tal, as folhas devem ser maceradas e a pasta da coca resultante da maceração deve ser tratada com ácido clorídrico para formar um sal, o cloridrato de cocaína (SENA, 2016).

O cloridrato de cocaína tem a aparência de um pó branco cristalino, inodoro e hidrossolúvel (LIU *et al.*, 2016). Os usuários geralmente fazem sua utilização através da via nasal ou através da via intravenosa após a diluição. Além disso, do sal pode ser extraído com amônia ou bicarbonato de sódio a base livre de cocaína, que é insolúvel e só é utilizada fumada. Esta forma é conhecida popularmente como “*crack*” devido ao som crepitante que faz durante a queima da mistura ao ser fumada (BRUNT *et al.*, 2017; MARQUEZ *et al.*, 2017; KUDLACEK *et al.*, 2017).

Estima-se que cerca de 17 milhões de pessoas frequentemente utilizem cocaína no mundo e isso se dá devido aos efeitos psicoestimulantes que a droga causa (BRUNT *et al.*, 2017). Estes efeitos ocorrem porque ela age como um potente bloqueador dos transportadores que fazem a recaptação das monoaminas, principalmente da dopamina, mas também da noradrenalina e da serotonina. Este bloqueio gera o acúmulo destes NT na fenda sináptica, levando à estimulação dos receptores monoaminérgicos (SENA, 2016; MARQUEZ *et al.*, 2017).

Esta superestimulação dos receptores, principalmente dos dopaminérgicos, ocorre na via mesolímbica que se origina na área tegmental e segue para a amígdala, córtex pré-frontal, córtex cingulado anterior e núcleo *accumbens*. Esta via é responsável pelo sistema de recompensa e quando ativada gera os efeitos de euforia e agitação, reconhecidamente associados ao uso da droga (MARQUEZ *et al.*, 2017; FRAZER *et al.*, 2018). Além disso, seu uso ocasiona também diminuição da necessidade de dormir, aumento da libido, redução do apetite, estado de hiperatividade com aceleração do pulso, aumento do ritmo respiratório, hipertermia, hipertensão arterial, tremor nas mãos e agitação psicomotora (MARQUEZ *et al.*, 2017; BRUNT *et al.*, 2017).

Devido à rápida metabolização da cocaína, sua meia vida é curta e após os efeitos estimulantes há uma queda brusca nos níveis de dopamina no SNC que gera, por consequência, a disforia. Este fato contribui para a farmacodependência à cocaína, pois faz com que o usuário sinta necessidade de utilizar novamente a droga para manter seus níveis de dopamina elevados e sentir os efeitos psicoestimulantes novamente (SENA, 2016; FRAZER *et al.*, 2018).

Além da dependência, que geralmente envolve processos neuroadaptativos, o indivíduo que faz o uso crônico de cocaína tende a apresentar uma habituação à droga, chamada de tolerância. Isso ocorre porque quando a via dopaminérgica é acionada há uma sub-regulação dos receptores a fim de reduzir sua ativação (MARQUEZ *et al.*, 2017). Desta forma, para o usuário sentir os mesmos efeitos recompensatórios será necessário consumir uma quantidade cada vez maior da droga (FRAZER *et al.*, 2018).

Neste contexto, vale ressaltar que o uso crônico de cocaína é capaz de causar diversos outros efeitos sistêmicos prejudiciais. Estudos demonstram que a inalação da cocaína pode causar necrose da mucosa nasal, hemorragia pulmonar, cardiopatias, hemorragia cerebral, vasculite sistêmica e doenças renais (NOLAN; JEN, 2015).

Segundo Kudlacek *et al.* (2017), muitos desses danos têm sido agravados pela adulteração da cocaína. Uma pesquisa conduzida pelo programa austríaco “checkit!”, um programa que analisa anônima e gratuitamente amostras de cocaína trazidas por usuários, mostrou que 90% das amostras de cocaína analisadas entre 2012 e 2015

(n total = 524 amostras) estavam adulteradas e que havia mais de 20 substâncias diferentes utilizadas como adulterantes.

1.3. PRINCIPAIS ADULTERANTES DA COCAÍNA

Os motivos para adulterar a cocaína são muitos e variam desde aumentar o peso bruto da droga para aumentar a porcentagem de lucro até a mistura com outras substâncias para potencializar seus efeitos (KUDLACEK *et al.*, 2017). Um estudo conduzido por Maldaner *et al.* (2015) no Distrito Federal (Brasil) mostrou que cerca de 60% das 159 amostras de cocaína analisadas estavam adulteradas. Dentre os principais adulterantes descritos na literatura estão: fenacetina, paracetamol, cafeína e LVS.

A fenacetina e o paracetamol são analgésicos que, quando em pó, apresentam uma aparência bastante similar à da cocaína, porém, apesar de haver alguns relatos de que eles sejam capazes de exercer um limitado potencial eufórico essa parece uma razão improvável para sua utilização como adulterante. Sugere-se que estes dois medicamentos sejam utilizados por serem legais na maioria dos países e por apresentarem propriedades químicas semelhantes às da cocaína, como gosto e ponto de fusão (KUDLACEK *et al.*, 2017; BRUNT *et al.*, 2017).

Segundo Kudlacek *et al.* (2017), a cafeína é o composto psicoativo mais popular do mundo. Ela atua nos receptores de adenosina e exerce efeitos estimulantes, como: agitação, taquicardia, broncodilatação e aumento da concentração. A cafeína pode potencializar os efeitos da cocaína e isto junto ao seu gosto amargo poderiam explicar sua utilização na adulteração da cocaína (BERNARDO *et al.*, 2003).

O uso de LVS como adulterante tem aumentado consideravelmente ao longo dos últimos dez anos. Estudos recentes realizados nos Estados Unidos e na Europa mostraram que cerca de 65% das amostras de cocaína do mundo contém LVS e alguns autores sugerem que este é o composto mais utilizado para a adulteração da

cocaína atualmente (LAROCQUE; HOFFMANN, 2017; POPE *et al.*, 2018). Além disso, Lapachinske *et al.* (2015) mostraram que de 54 amostras de cocaína apreendidas pela Polícia Federal em São Paulo mais de 50% continham LVS, indicando que houve um acréscimo considerável de LVS nas amostras de cocaína no Brasil quando comparado com outros estudos brasileiros, como o de Maldaner *et al.* (2015).

1.4. PORQUE A COCAÍNA É ADULTERADA COM LEVAMISOL?

Estima-se que a concentração de LVS nas amostras de cocaína varie de menos de 1% a mais de 70%, sendo a média estabelecida na literatura de 10% (BRUNT *et al.*, 2017; VERONESE *et al.*, 2016; FIORENTIN *et al.*, 2018). Contudo, ainda permanece obscura a razão pela qual se utiliza este medicamento como adulterante. Dentre as hipóteses mais aceitas está a fácil e barata aquisição do mesmo e a promoção do aumento da massa da droga vendida, visto que, ele é muito semelhante fisicamente com a droga e não interfere em testes colorimétricos para testar a presença de cocaína. Ainda sobre as propriedades físicas, o ponto de fusão da base livre de LVS é inferior ao da base livre de cocaína, o que faz com que o usuário absorva primeiro o LVS sem que sobre resíduos do mesmo (BRUNT *et al.*, 2017; COOPER *et al.*, 2011).

Outra justificativa bastante discutida por alguns autores é a capacidade de aumentar os níveis de dopamina no SNC, através da inibição das MAO, e de levar a um aumento na ativação do sistema de recompensa. Estas características poderiam, segundo Brunt *et al.* (2017), potencializar os efeitos da cocaína a partir de um sinergismo ocasionado pela utilização concomitante destas duas substâncias.

Do mesmo modo, postula-se que o aminorex, por ter propriedades e efeitos semelhantes aos proporcionados pelo uso de compostos anfetamínicos, pode auxiliar também na potencialização dos efeitos da droga (HOFMAIER *et al.*, 2014). Outro estudo mostrou que o aminorex possui um tempo de meia-vida maior do que a cocaína e que isto poderia contribuir também para um aumento do tempo de duração dos

efeitos psicoestimulantes (NOLAN & JEN, 2015; MARQUEZ *et al.*, 2017). Neste sentido, segundo Brunt *et al.* (2017), o LVS poderia até ser considerado como uma pró-droga para o aminorex.

1.5. CONSEQUÊNCIAS CLÍNICAS DO USO DE COCAÍNA ADULTERADA COM LEVAMISOL

A partir do ano de 2010 começaram a surgir na literatura diversos relatos de caso de complicações clínicas decorrentes da adulteração de cocaína com LVS, caracterizando o uso desta associação como um problema de saúde pública (GARCÉS-MONTOYA *et al.*, 2015 VERONESE *et al.*, 2016, JUANENA *et al.*, 2017). Os sintomas mais citados estão relacionados com manifestações hematológicas, neurológicas, circulatórias, dérmicas, pulmonares e renais (NOLAN & JEN, 2015; PATNAIK *et al.*, 2015; KHAN *et al.*, 2018).

Uma das principais consequências hematológicas relacionadas com esta adulteração é a agranulocitose (KHAN *et al.*, 2018). O primeiro relato de caso de agranulocitose associada ao uso crônico de cocaína foi feito por Buchanan *et al.* (2010), no qual ele identificou através de amostras de sobras que havia a presença de LVS na droga consumida pelo indivíduo. Segundo Brunt *et al.* (2017), após este relato houve mais de 200 trabalhos publicados até julho de 2016 somente sobre casos de agranulocitose associados ao uso de cocaína adulterada com LVS.

Outra anormalidade hematológica bastante discutida é a neutropenia, caracterizada como a depleção significativa do número de neutrófilos sanguíneos. Os sintomas destas duas complicações hematológicas geralmente incluem maior susceptibilidade a infecções, febre e sintomas semelhantes aos da gripe (NOLAN; JEN, 2015).

Segundo Long *et al.* (2015), outra complicação grave que pode ocorrer é a leucoencefalopatia. Esta é uma desordem neurológica potencialmente fatal caracterizada por desmielinização e lesões na substância branca do cérebro. Seus

sintomas incluem déficits motores, cognitivos e sensoriais (BRUNT *et al.*, 2017) e, de acordo com Liu *et al.* (2006), os casos de leucoencefalopatia estão associados com pouco tempo de uso de doses diárias mais baixas de LVS.

Além disso, esta associação em diferentes doses pode causar também vasculite sistêmica e leucocitoclástica (GARG *et al.*, 2015). A vasculite é definida como a inflamação dos vasos sanguíneos e ocasiona nos usuários manchas vermelhas nos lobos auriculares, na região do arco zigomático e no nariz que podem evoluir para uma necrose tecidual, além de contribuir para o agravamento de lesões em outros órgãos (PATNAIK *et al.*, 2015). Estes sintomas podem ser revertidos se o uso da droga adulterada for cessado, porém, como a maioria dos usuários são dependentes da mesma, o tratamento se torna bastante desafiador (VERONESE *et al.*, 2016; NOLAN; JEN, 2015).

Há na literatura também a descrição de complicações pulmonares gerada pelo uso de cocaína e LVS. Karch *et al.* (2014) descreveram um caso de um usuário de cocaína adulterada com LVS que apresentava hipertensão pulmonar idiopática. Segundo Brunt *et al.* (2017), isso provavelmente ocorreu não só pela ação da combinação de LVS e cocaína, mas também pela ação do aminorex que, segundo os autores, pode causar este tipo de patologia.

Um estudo publicado por Veronese *et al.* (2016) relatou o caso de um paciente do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Brasil) que apresentava perda de peso espontânea, artralgia, lesões púrpuras cutâneas nos lobos auriculares e nas coxas e glomerulonefrite *pauci-imune*. O exame toxicológico da urina foi positivo para cocaína e LVS, e a porcentagem de cada composto quantificado na primeira amostra de cocaína em pó foi de 62,8% de cocaína, 32,2% de LVS e 5% de uma substância não identificada.

Segundo Nolan & Jen (2015), a glomerulonefrite *pauci-imune* gerada pela utilização de cocaína e LVS é associada à sorologia positiva aos anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA) sem anticorpos substanciais contra a mieloperoxidase (MPO), o alvo típico do p-ANCA. Além disso, MacGrath *et al.* (2011) reportou que encontrou proteinúria e hematúria em pacientes com p-ANCA anormalmente elevada após o uso de cocaína, sendo que dois desenvolveram insuficiência renal aguda.

A cocaína isoladamente pode provocar vasculite associada à ANCA e lesão renal, mas em menor escala. Segundo Veronese *et al.* (2016), a nefrotoxicidade da cocaína causa “[...] alterações na hemodinâmica intrarrenal, estresse oxidativo, síntese e degradação da matriz extracelular e aterogênese renal”, porém, os efeitos tóxicos do LVS parecem exacerbar estes efeitos gerados pela cocaína e ocasionar o agravamento das lesões (POPE *et al.*, 2018). Contudo, faltam estudos elucidando a toxicologia desta associação.

Segundo Nolan & Jen (2015), a identificação correta dos sintomas característicos desta combinação pode auxiliar no tratamento e na prevenção de futuras complicações mais graves. Contudo, apesar de haver estudos de casos relatando os efeitos típicos da adulteração da cocaína com LVS, pesquisas que envolvam a metabolização das drogas brutas são raras, bem como, pesquisas que elucidem a toxicologia e as manifestações clínicas apresentadas por usuários de droga adulterada.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a toxicidade aguda e subcrônica de levamisol em diferentes doses em ratos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a toxicidade aguda de levamisol em ratos;
- Avaliar a toxicidade subcrônica de levamisol em ratos e a neurotoxicidade através do desempenho no teste do Rota-rod, teste de atividade locomotora e teste de memória de reconhecimento de objetos;
- Avaliar parâmetros hematológicos e biomarcadores do estresse oxidativo periféricos, como a glutathiona reduzida (GSH), em sangue e tecidos após tratamento agudo e subcrônico com levamisol em ratos;
- Avaliar biomarcadores precoces de dano renal, como creatinina, sódio e potássio, na urina de ratos após tratamento agudo e subcrônico com levamisol em ratos.

3. ARTIGO EM PREPARAÇÃO

LEVAMISOLE, AN ADULTERANT OF COCAINE, INDUCES SYSTEMIC ALTERATIONS IN WISTAR RATS

Ana Olívia Martins Laurentino; Janaína Solómon; Bruna Ducatti Tonietto; Larissa Vivan Cestonaro; Nicolás Guimarães dos Santos; Lucas Izolan; Douglas Marques; Marina Tuerlinckx Costa-Valle; Solange Cristina Garcia; Viviane Sebben; Eliane Dallegrove; Elvino José Barros; Marcelo Dutra Arbo; Mirna Bainy Leal

Este artigo será submetido ao periódico *Journal of Toxicology and Applied Pharmacology* e está nas normas exigidas pelo mesmo.

LEVAMISOLE, AN ADULTERANT OF COCAINE, INDUCES SYSTEMIC ALTERATIONS IN WISTAR RATS

Ana Olívia Martins Laurentino ^{a,b}; Janaína Solómon^b; Bruna Ducatti Tonietto^{c,d}; Larissa Vivan Cestonaro^{c,d}; Nicolás Guimarães dos Santos^c; Lucas Izolan^e; Douglas Marques^{e,b}; Marina Tuerlinckx Costa-Valle^f; Solange Cristina Garcia^{c,d}; Viviane Sebben^g; Eliane Dallegrave^f; Elvino José Barros^h; Marcelo Dutra Arbo^{c,d}; Mirna Bainy Leal^{a,b,e}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmento Leite, 500/305, 90050-170 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

^b Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Neurocomportamental, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmento Leite, 500/305, 90050-170 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^c Laboratório de Toxicologia (LATOX), Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga 2752/605B, 90610-000 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^d Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga 2752/1º andar, 90610-000 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^e Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmento Leite, 500/209, 90046-900 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^f Departamento de Farmacociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSA), Rua Sarmento Leite, 245, 90050-170 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^g Centro de Informações Toxicológicas, Av. Ipiranga, 5400, 90610-000 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

^h Faculdade de Medicina, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), R. Ramiro Barcelos, 2350, 90035-007 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Corresponding author at: Mirna Bainy Leal. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmento Leite, 500/305, 90050-170 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Tel.: +55 51 3308-3121. E-mail: mirnablufrgs@gmail.com

ABSTRACT

The use of anthelmintic levamisole (LVS) as a cocaine adulterant increased worldwide. Complications caused by this association include systemic vasculitis, agranulocytosis, neutropenia, tissue necrosis, pulmonary hemorrhage, and renal injury. Data about toxicity of LVS are scarce, therefore the aim of this study was to evaluate the acute and subchronic toxic effects of LVS in rats. Male Wistar rats received saline or LVS by intraperitoneal route at the doses of 12, 24 and 36 mg/kg in the acute toxicity test; and at 3, 6 and 12 mg/kg in the subchronic toxicity test. Toxicity was evaluated using behavioral, cognitive, renal, hematological, biochemical and histopathological parameters. Acute administration of LVS caused behavioral alterations in all doses used ($p < 0.05$); seizure, death, and congestion of the organs at a dose of 36 mg/kg ($p < 0.05$); increased urinary excretion of K^+ and creatinine ($p < 0.05$), and decreased serum GSH levels at a dose of 24 mg/kg ($p < 0.05$). Subchronic administration caused behavioral and cognitive alterations ($p < 0.0001$ and $p < 0.05$, respectively), congestion of the organs and increased relative weight of liver ($p < 0.0001$), hematological changes at the doses of 6 and 12 mg/kg ($p < 0.05$); increased ALP levels at a dose of 6 mg/kg ($p < 0.05$); increased excretion of mAlb and Na^+ at a doses of 3 and 6 mg/kg, respectively ($p < 0.05$); increased serum GSH levels at a dose of 12 mg/kg ($p < 0.01$); and decreased levels of total thiols in the liver ($p \leq 0.0001$). Both administrations produced toxic effects of clinical relevance, which make LVS a dangerous cutting agent. Furthermore, the knowledge of these effects can contribute to the correct diagnosis and treatment.

Keywords: Levamisole. Toxicity. Cocaine. Adulteration. Neurotoxicity.

1. INTRODUCTION

Levamisole (LVS) is an anthelmintic discovered in 1960's that acts at the neuromuscular junctions of the worms causing paralysis, due to its affinity to nicotinic receptors (Marquez et al, 2017; Solomon & Hayes, 2017). In mid-2000, it was withdrawn from the USA market due to its serious side effects (Brunt et al, 2017). Notwithstanding, LVS has been added as a cocaine adulterant (Lee, Ladizinski & Federman, 2012). Since this, there was an important increase in the amount of LVS in cocaine samples and in complications associated with the concomitant use of these substances, which was characterized as a public health challenge (Nolan & Jen, 2015).

The number of samples contaminated with LVS has increased every year (Brunt et al, 2017). It is estimated that 65% of cocaine samples worldwide have the presence of LVS (Casale, Colley & LeGatt, 2012; Laar et al, 2015). In Brazil, more than 50% of the analyzed cocaine samples contained LVS (Lapachinske et al, 2015), indicating that the number of Brazilian samples adulterated increased considerably compared to other studies (Maldaner et al, 2015).

Considering that cocaine is a widely used psychostimulant drug that exerts its effects by blocking monoamine transporters (Brunt et al, 2017), the use LVS as adulterant has three reasons: a) to promote an increase in mass of the street drug due to its physical similarity with cocaine and to its easy and cheap acquiree; b) to enhance dopamine levels in central nervous system (CNS) and increase the activation of reward system and; c) to prolong the effects of cocaine due to its metabolite, aminorex, that has amphetamine-like effects (Nolan & Jen, 2015; Marquez et al, 2017).

LVS could be considered as a pro-drug of aminorex (Brunt et al, 2017). Aminorex is an anorectic drug, capable of inhibiting dopamine, noradrenaline and serotonin transporters (DAT, NET and SERT, respectively). However, it acts more specifically on DAT and NET, which contribute to the extracellular increase of dopamine levels (Ho et al, 2009). Therefore, aminorex can potentiate the cocaine effects (Hofmaier et al, 2014). In addition, aminorex has a longer half-life than cocaine, which could also contribute to an increase in the duration of psychostimulating effects (Nolan & Jen, 2015; Marquez et al, 2017).

Several studies described the occurrence of clinical manifestations associated with LVS-adulterated cocaine, such as: agranulocytosis, neutropenia, leukoencephalopathy, vasculitis, glomerulonephritis and pulmonary hypertension (Nolan & Jen, 2015; Marquez et al, 2017; Brunt et al, 2017). However, studies elucidating the toxic mechanisms of these drugs, isolated or in association, are absent.

According to Nolan and Jen (2015), the correct identification of the clinical manifestations of this combination can contribute in the treatment and prevention of future more serious complications. Therefore, many case studies report the effects of LVS-adulterated cocaine, but research involving the drug metabolism is scarce. The aim of this study was to evaluate the acute and subchronic effects induced by LVS in Wistar rats.

2. METHODS

2.1. Animals

Male adult Wistar rats (60 day-old), weighing 250–300 g, obtained from Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL-UFRGS) were allocated in polypropylene cages (41 × 34 × 16 cm, 4 rats per cage) with free access to food and water on a 24-h light/dark cycle (lights on 7–19 h), in a controlled-temperature environment (22 ± 2 °C) with monitored humidity. The experiments were approved by the University Ethics Committee (Number 34357) and were executed in accordance with the Brazilian law nº 11.794/08, the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act (1986) and related international guidelines. The number of animals per group was 5 for the acute toxicity test (OECD 420) and 10 for the subchronic toxicity test (OECD 407).

2.2. Drug treatments

LVS was obtained from Noxon® (São Paulo, BR) and dissolved in saline solution. The administrations by intraperitoneal route (i.p.) occurred always in the morning between 08-11h a.m. Doses for the treatment were set through the calculation

of relative doses usually ingested by consumers and were in accordance with other studies (Tallarida, Tallarida & Rawls, 2015; Moretti et al, 2016; Fiorentin et al, 2019).

Twenty-four hours after the last administration in both protocols, all animals were anesthetized (100 mg/kg of thiopental and 10 mL/kg of lidocaine by i.p.). Then, we made an incision in the abdomen to collect blood from the inferior vena cava and urine from the urinary bladder, and euthanasia occurred by exsanguination. Organs (liver, heart, kidneys, and spleen) were removed to observe macroscopic alterations and relative organs weight (Bulcão et al., 2014). Additionally, in the subchronic toxicity test we also evaluated microscopic alterations through histopathological analysis.

2.3. Acute toxicity test

This test was based on the protocol developed by the Organization for Economic Cooperation & Development (OECD) guideline 420 (Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure) and was adapted as follows: immediately after the administration of saline, LVS 12 mg/kg, LVS 24 mg/kg or LVS 36 mg/kg (i.p.), the animals were observed for 1 minute in the periods of 0, 15, 30, 60, 120, 180, 240, and 360 min for the presence of stimulant, depressor or autonomic signals (Costa-Valle et al, 2018) (Figure 1).

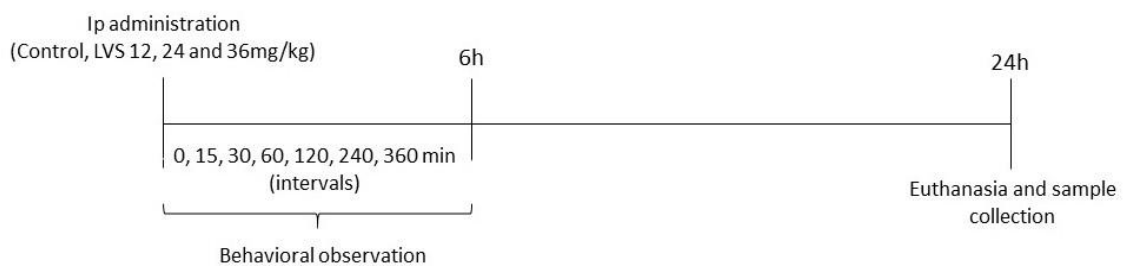


Figure 1 – Experimental design of acute toxicity test.

2.4. Subchronic toxicity test

The test was based on the OECD guideline 407 (Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study), however the time of treatment was extended to 45 consecutive days to evaluate the LVS neurotoxic effects. Animals were observed daily for signs of toxicity and mortality for 1 hour. Neurotoxicity was measured in three behavioral tests that

were executed before each daily administration at the 25th, 35th, 44th and 45th treatment days as described below. Groups of 10 animals were daily administered with saline (control) and LVS 3, 6 or 12 mg/kg by i.p. (Figure 2).

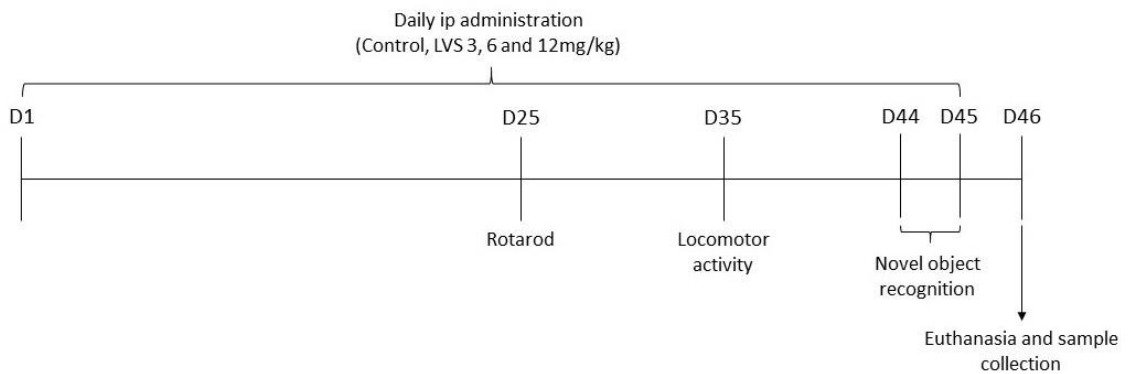


Figure 2 – Experimental design of subchronic toxicity test.

2.4.1. Behavioral tests

Rota-rod performance test

The test was conducted on the 25th day after the beginning of the daily treatments. One hour before the test, a training session, in which the animals had three trials to stay on the bar at 18 rpm for at least 90 s, was performed. The test was carried out 1 h after the training. The latency to fall from the rota-rod apparatus (Insight Equipment Ltda, Ribeirão Preto, Brazil) was recorded after one trial of 90 s (maximum) at 18 rpm (Costa-Valle et al, 2018).

Locomotor activity

On the 35th treatment day, the spontaneous locomotor activity was evaluated. The locomotor activity cage (Insight Ltda Ribeirão Preto, Brazil) consists of a 50 x 48 x 50 cm box equipped with six bars, each with 16 infrared light sensors that detect the relative position of the animal on the box. The parameters assessed were total distance traveled and average speed for 15 min (5 initial minutes considered exploratory activity and the 10 final minutes the test session). The test was performed in a dark room with no noise (Maciel et al, 2014).

Novel object recognition memory

On the 44th and 45th after the beginning of the treatments, animals were exposed to the object recognition test based on the protocol described by Laurentino et al (2019). This test was performed in the same arena where the animals were evaluated by locomotor activity. Training was conducted by placing individual rats into the arena, in which two identical objects (objects A1 and A2; Duplo Lego toys) were positioned in two adjacent corners, 9 cm from the walls. Animals were left to explore the objects for 5 min. In a short-term memory (STM) test, given 1.5 h after training, the rats explored the cages for 5 min in the presence of one familiar (A) and one novel (B) object. In a long-term memory (LTM) test, given 24 h after training, the same rats explored the cages for 5 min in the presence of the familiar object (A) and a novel object (C). All objects presented similar textures, colors, and sizes, but distinctive shapes. The recognition index was calculated by the exploration time of the new object divided by the total exploration time (time spent exploring the familiar + novel objects) (Lueptow, 2014). Between trials the objects were washed with 10% ethanol solution. Exploration was defined as sniffing or touching the object with the nose and/or forepaws. Sitting on the object was not considered exploration.

2.5. Hematological and biochemical analysis

The following hematological parameters were determined using an ABX Pentra XL 80 Hematology analyzer (ABX Horiba®, Montpellier, France) in whole blood collected with EDTA: number of red blood cells (RBC), hemoglobin, hematocrit, total number of leukocytes, percentage of neutrophils, lymphocytes, eosinophils, monocytes, and basophils, and platelet counts.

For the serum biochemical analysis, commercial laboratory kits (BioClin®, Belo Horizonte, Brazil) and the automated equipment BS-120 (Mindray Co., Shenzhen, China) were used. The parameters analyzed included: alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), γ -glutamyltranspeptidase (γ -GT), alkaline phosphatase (ALP), lactate dehydrogenase (LDH), urea, and creatinine.

2.6. Oxidative stress evaluations

Reduced glutathione (GSH) levels was measured in erythrocytes as non-protein thiols by spectrophotometry (Ellman, 1959). After subchronic treatment, the tissues (liver, kidney, heart and spleen) were washed with saline to remove blood. Then, they were weighed to calculate the relative organ weight, placed on ice and homogenized in cold 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.4. Oxidative status was measured through thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) analyzed at 532 nm (Esterbauer & Cheeseman, 1990) and total non-protein thiols as described for the erythrocytes.

2.7. Urinary biomarkers

Nephrotoxicity was assessed by measuring microalbuminuria (mAlb) and creatinine in automated equipment (Mindray®, BS-120, Shenzhen, China) using commercial kits (BioClin®, Belo Horizonte, Brazil). Sodium (Na⁺) and potassium (K⁺) ions were determined by ion selective electrode ADVIA 1800 (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, NY, USA). N-acetyl-beta-D glucosaminidase (NAG) activity in urine, according to Horak, Hopfer and Sunderman (1981).

2.8. Comet assay

Comet assay was performed to assess potential deoxyribonucleic acid (DNA) damage after subchronic treatment. Comet assay was performed in heparin blood samples under alkaline conditions (pH > 13) according to Göethel et al. (2014). GelRed-stained slides were examined at x500-magnification in a fluorescence microscope (Olympus BX60F-3, Olympus Optical, Japan). Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of the two replicated slides) were analyzed from each blood sample. The comet parameter to measure DNA damage was the percentage of DNA in the tail (% Tail DNA).

2.9. Histopathological analysis

All tissues removed (liver, heart, kidney, and spleen) were fixed with 10% formaldehyde buffer. Sample processing for histopathological analysis was performed as described by Bulcão et al. (2014).

2.10. Statistical analysis

Data from the behavioral observation of the acute toxicity test (expressed as %) and the histopathological alterations were analyzed using the chi-square test. Data were presented as mean \pm SEM. Normal distribution of data was evaluated with the Kolmogorov-Smirnov test. Parametric comparisons were made by one-way or repeated measures analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni post hoc test. Qualitative data and/or those that do not have a normal distribution were evaluated by Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparisons test. The level of significance was set at 5%. All the analysis was performed using GraphPad Prism 8.4.2 software.

3. RESULTS

3.1. Acute toxicity test

3.1.1. Behavioral observation

Data presented in Table 1 show that 80% of LVS 12 mg/kg group presented a significant increase in epistaxis during the 60 to 240 min observation intervals when compared to control group ($p < 0,05$, chi-square test). In addition, 80% of LVS 24 mg/kg group showed a significant increase in the parameters of ambulation ($p < 0,05$, chi-square test) and presence of eyelid ptosis ($p < 0,05$, chi-square test) during the first 15 min of observation and in the intervals of 15 to 240 min, respectively, compared to control group. In addition, animals of LVS 36 mg/kg group showed a significant decrease in grooming behavior when compared to the control group ($p < 0,05$, chi-square test), seizures during the first 15 minutes ($p < 0,05$, chi-square test) and 80% died in the same period compared to other groups ($p < 0,05$, Log-rank test). The percentage of survivors remained unchanged after 60 minutes of observation, as shown in figure 3.

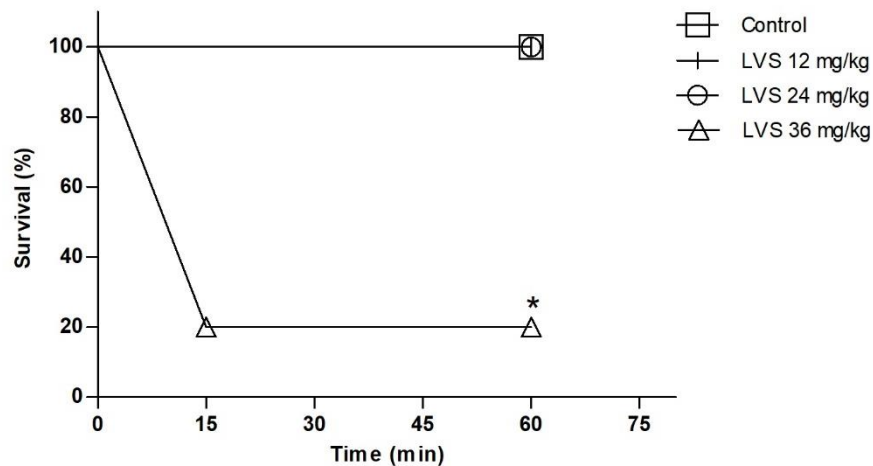


Figure 3 – Percentage of survivors in the control, LVS 12 mg/kg, LVS 24 mg/kg and LVS 36 mg/kg after the acute administrations. * $p < 0,05$ vs control (Log-rank test).

3.1.2. Histopathological alterations

No significant differences were observed in relative organs weight (Table S1, supplementary material). Control, LVS 12 mg/kg and 24 mg/kg groups did not show any significant macroscopic changes. However, the four animals in the LVS 36 mg/kg group who died presented congestion in heart, kidneys and liver (2 of them with an increase in the total heart volume and 2 with an increase in the atrium volume), pulmonary and cerebral hemorrhages. In addition, two animals had scrotum ischemia.

Table 1 – Toxic signs evaluated after acute LVS administration.

Males (%)				
Toxic Signs (occurrence interval)	Control (NaCl 0,9%)	LVS 12 mg/kg	LVS 24 mg/kg	LVS 36 mg/kg
Increased ambulation	0	40	80*	60
(min)	(0-360)	(0-15)	(0-15)	(0-15)
Rearing	60	80	100	100
(min)	(0-30)	(0-240)	(0-15)	(0-15)
Grooming	80	60	80	0*
(min)	(0-240)	(120-360)	(0-360)	(0-360)
Vocalization	0	0	0	20
(min)	(0-360)	(0-360)	(0-360)	(0-30)
Decreased ambulation	80	100	100	20
(min)	(240-360)	(15-360)	(15-360)	(15-360)
Tremor	0	40	40	0
(min)	(0-360)	(120-360)	(60-240)	(0-360)
Eyelid ptosis	0	60	80*	20
(min)	(0-360)	(15-120)	(15-240)	(15-120)
Piloerection	0	60	40	20
(min)	(0-360)	(60-360)	(120-360)	(15-360)
Seizure	0	0	0	100*
(min)	(0-360)	(0-360)	(0-360)	(0-15)
Epistaxis	0	80*	40	20
(min)	(0-360)	(60-240)	(60-360)	(240-360)
Dyspnea	0	0	40	20
(min)	(0-360)	(0-360)	(30-120)	(30-60)

Data are expressed as percentage of animals (n=5) that express the signs during the observation period (until 6 h). *p<0,05 vs control (Chi-Square test).

Hematological and biochemical parameters

There were no significant changes between the groups in the erythrogram, platelet and leukogram (Table S2, supplementary material). In addition, there were no significant differences in serum biomarkers regarding of liver and kidney function between groups (Table S3, supplementary material).

3.1.3. Total GSH levels

LVS 24 mg/kg treated group showed a significant decrease in GSH compared to control group (F=5,889; p<0,05, ANOVA/Bonferroni). Noteworthy, it was not possible to perform the analysis of the LVS 36 mg/kg group because 80% of the animals died before the end of the experiment (Figure 4).

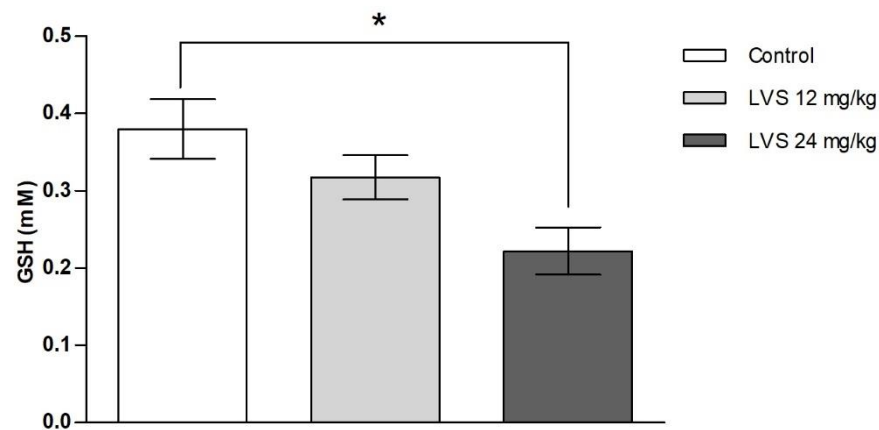


Figure 4 – Serum levels of reduced glutathione (GSH) after acute administration of LVS. Data are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0,05$ vs control (ANOVA + post hoc Bonferroni).

3.1.4. Urinary markers

LVS 24 mg/kg group showed a significant increase in excretion of K^+ ($F=5,457$; $p < 0,05$, ANOVA/Bonferroni) and creatinine ($F=5,681$; $p < 0,05$, ANOVA/Bonferroni) when compared to control group (Table 2).

Table 2 – Excretion of urinary biomarkers after acute administration of LVS.

Urinary biomarkers	Control	LVS 12 mg/kg	LVS 24 mg/kg	LVS 36 mg/kg
K^+ (mEq/L)	14.56 \pm 2.70	33.78 \pm 9.08	48.06 \pm 8.09*	20.80 \pm 0.0
Na^+ (mEq/L)	26.28 \pm 5.05	57.30 \pm 11.88	50.70 \pm 4.98	48.70 \pm 0.0
Creatinina (mg/dL)	7.14 \pm 1.06	13.86 \pm 3.52	23.88 \pm 4.89*	8.10 \pm 0.0
mAlb (mg/g creatinina)	0.17 \pm 0.16	0.0 \pm 0.0	0.21 \pm 0.1	0.49 \pm 0.0

Data are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0,05$ vs control (ANOVA + post hoc Bonferroni). K^+ =potassium ion; Na^+ =sodium ion; mAlb=microalbuminuria.

3.2. Subchronic toxicity test

3.2.1. Behavioral observation

The animals of LVS 12 mg/kg seemed to be more active after the administration and a few animals of 12 mg/kg group presented seizures in the first 15-20 minutes since the 21st treatment-day, and progressively more animals presented the same behavior. At the end of the experiment (45th treatment-day), 50% of this group presented, at least, one episode of seizure.

3.2.2. Rotarod test

Rotarod test was performed on the 25th day of treatment to evaluate balance and motor learning. According to figure 5A, there was a difference between the treatments ($F=19,11$; $p<0,0001$, ANOVA/Bonferroni). Post hoc analysis indicated that LVS 6mg/kg ($p\leq 0,001$, ANOVA/Bonferroni) and LVS 12 mg/kg ($p<0,0001$, ANOVA/Bonferroni) groups had a significant increase in latency to fall when compared to control.

3.2.3. Spontaneous locomotor activity test

No significant alterations between the groups, both in average speed ($F=2,828$; $p=0,0541$, ANOVA/Bonferroni) and in total distance traveled ($F=2,819$; $p=0,0546$, ANOVA/Bonferroni), were observed (Figure 5B and 5C), which indicates that the LVS in the doses used is not able to cause changes in the locomotor activity of the animals.

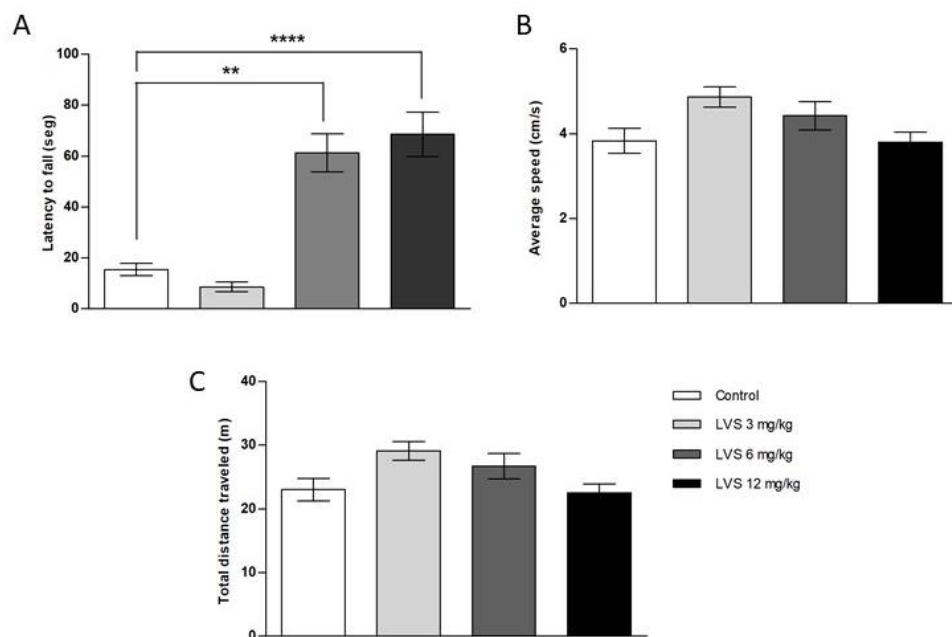


Figure 5 – Latency to fall (s) in the rotarod test (A), average speed (B) and total distance traveled (C) observed in the spontaneous locomotor activity test conducted on the 25th and 35th day of treatment of subchronic toxicity test, respectively. Data are expressed as mean \pm SEM. ** $p\leq 0,001$ and **** $p<0,0001$ vs control (ANOVA + post hoc Bonferroni).

3.2.4. Novel object recognition test

There was no difference in the training session ($F=3,852$; $p=0,0839$), but, there was a significant decrease in recognition index of test session in LVS 6 mg/kg ($p<0,05$, ANOVA/Bonferroni) group compared to control in both STM (Figure 6B) and LTM (Figure 6C) tests.

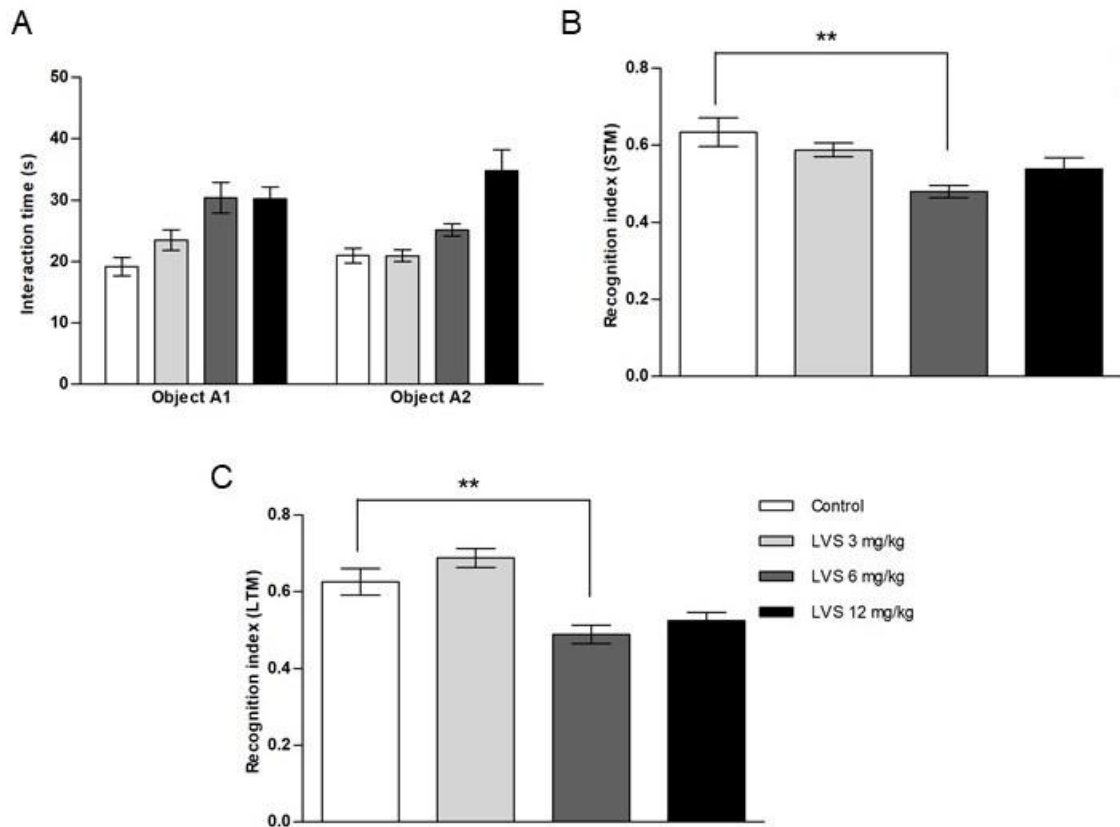


Figure 6 – Interaction time in seconds with the object A1 and A2 during the training session (A), object recognition index observed in the short-term (B) and in the long-term (C) memory test. Data are expressed as mean \pm SEM. ** $p<0,05$ vs control (one-way ANOVA + post hoc Bonferroni). STM=short-term memory; LTM=long-term memory.

3.2.5. Histopathological alterations

There were no significant changes in the relative organs weight in control and LVS 3 mg/kg groups (Table 3). However, there was a significant increase in the liver relative weight of LVS 6 and 12 mg/kg groups when compared to the control group ($F=1,048$; $p<0,0001$, ANOVA/Bonferroni).

No macroscopic alterations were observed in control group. However, in LVS 3 mg/kg group there was a renal cyst with 13 ml of fluid volume inside the renal capsule

(10%); in LVS 6 mg/kg group there was congestion in kidneys (90%), liver (30%) and lungs (20%); and in LVS 12 mg/kg group there was congestion in liver, kidneys and lungs (100%). No alterations were observed in the histopathological analysis.

Table 3 – Relative organs weight collected after the subchronic administration of LVS.

	Control	LVS 3 mg/kg	LVS 6 mg/kg	LVS 12 mg/kg
Heart	0,30 ± 0,02	0,29 ± 0,02	0,32 ± 0,02	0,30 ± 0,02
Liver	3,20 ± 0,18	3,33 ± 0,29	3,95 ± 0,23****	3,78 ± 0,16****
Kidneys	0,76 ± 0,03	0,71 ± 0,05	0,79 ± 0,02	0,76 ± 0,04
Spleen	0,24 ± 0,04	0,25 ± 0,03	0,24 ± 0,03	0,25 ± 0,03

Data are expressed as mean ± SEM. ****p<0.0001 vs control (ANOVA + post hoc Bonferroni).

3.2.6. Hematological and biochemical analysis

According to table 4, the LVS 6 mg/kg group presented a significant decrease in the percentage of neutrophils ($F=4,374$; $p<0,05$, ANOVA/Bonferroni) and a significant increase in the percentage of lymphocytes ($F=4,936$; $p<0,05$, ANOVA/Bonferroni) and basophils ($p<0,05$, Kruskal-Wallis/Dunn's), both compared to control group. In addition, the LVS 12 mg/kg group showed a significant decrease in erythrocyte ($F=4,384$; $p<0,05$, ANOVA/Bonferroni), hemoglobin ($F=4,427$; $p<0,05$, ANOVA/Bonferroni), hematocrit ($F=4,500$; $p<0,05$, ANOVA/Bonferroni), and platelet ($F=4,032$; $p<0,05$, ANOVA/Bonferroni) levels when compared to control group.

Table 4 – Complete blood count evaluated after subchronic LVS administration.

	Control	LVS 3 mg/kg	LVS 6 mg/kg	LVS 12 mg/kg
Erythrogram				
Erythrocytes ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	8.39 ± 0.51	8.93 ± 0.18	7.13 ± 0.83	5.34 ± 1.19*
Hemoglobin (g/dL)	16.13 ± 0.42	15.99 ± 0.39	13.19 ± 1.55	9.97 ± 2.22*
Hematocrit (%)	46.21 ± 1.17	46.22 ± 1.01	38.01 ± 4.35	28.93 ± 6.26*
Platelet count				
Platelets ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	685.5 ± 39.6	691.4 ± 27.0	681.0 ± 34.7	445.8 ± 111.5*
MPV (μm^3)	6.55 ± 0.11	6.36 ± 0.07	6.29 ± 0.05	6.43 ± 0.15
Plateletcrit (%)	0.45 ± 0.02	0.44 ± 0.02	0.43 ± 0.02	0.31 ± 0.06
Leukogram				

Leukocytes ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	6.63 \pm 0.42	6.81 \pm 0.20	6.91 \pm 0.37	6.04 \pm 0.55
Neutrophils (%)	6.44 \pm 0.26	6.69 \pm 0.48	4.95 \pm 0.19*	6.28 \pm 0.43
Lymphocytes (%)	89.17 \pm 0.41	89.87 \pm 0.49	91.21 \pm 0.30*	88.54 \pm 0.75
Monocytes (%)	4.36 \pm 0.32	3.38 \pm 0.15	3.80 \pm 0.22	4.93 \pm 0.52
Eosinophils (%)	0.02 \pm 0.01	0.04 \pm 0.02	0.14 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01
Basophils (%)	0.01 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.11 \pm 0.02*	0.06 \pm 0.02

Data are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0,05$ vs control (ANOVA + post hoc Bonferroni). MPV = mean platelet volume.

In serum biochemistry, there were no significant changes in AST, ALT, γ -GT, LDH, urea and creatinine after the subchronic treatment. However, a significant increase in ALP activity was observed in LVS 6 mg/kg group compared to control (Table 5) ($F=5,136$; $p < 0,05$, ANOVA/Bonferroni).

Table 5 – Levels of serum biomarkers after subchronic administration of LVS.

Serum biomarkers	Control	LVS 3 mg/kg	LVS 6 mg/kg	LVS 12 mg/kg
AST (U/L)	70.3 \pm 2.8	69.9 \pm 4.3	65.3 \pm 2.2	78.2 \pm 7.3
ALT (U/L)	53.0 \pm 2.4	48.2 \pm 2.9	49.0 \pm 2.7	53.4 \pm 2.2
γ -GT (U/L)	15.8 \pm 1.9	13.4 \pm 0.2	15.5 \pm 1.6	16.0 \pm 1.7
Creatinine (mg/dL)	0.45 \pm 0.01	0.50 \pm 0.01	0.46 \pm 0.02	0.49 \pm 0.01
Urea (mg/dL)	48.1 \pm 1.2	49.2 \pm 2.6	47.5 \pm 1.6	46.3 \pm 1.2
ALP (U/L)	117.0 \pm 6.3	133.3 \pm 10.2	174.6 \pm 15.3**	141.9 \pm 4.5
LDH (U/L)	120.3 \pm 13.3	101.0 \pm 13.7	86.8 \pm 10.4	107.8 \pm 5.4

Data are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0,05$ vs control (ANOVA + post hoc Bonferroni). AST=aspartate aminotransferase; ALT=alanine aminotransferase; γ -GT= γ -glutamyltranspeptidase; ALP=alkaline phosphatase; LDH=lactate dehydrogenase.

3.2.7. Oxidative stress evaluations

In LVS 12 mg/kg group, there was a significant increase in erythrocytes GSH levels when compared to control group ($p < 0,01$, Kruskal-Wallis/Dunn's) (Figure 7A). Besides, there was a significant decrease in the levels of total thiols in the liver of all LVS groups when compared to the control ($F=2,719$; $p \leq 0,0001$, ANOVA/Bonferroni) (Figure 7B). No alterations were observed in both total thiol and TBARS levels in other analyzed organs.

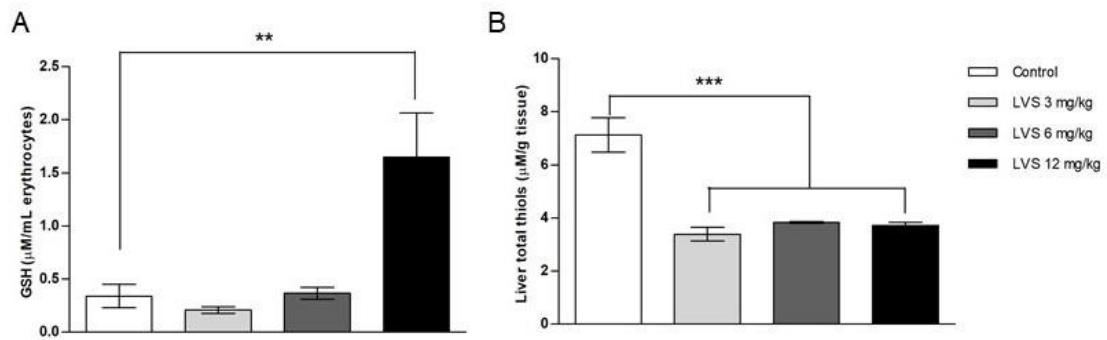


Figure 7 – Serum levels of reduced glutathione (GSH) (A) and total thiols levels in liver (B) after subchronic administration of LVS. Data are expressed as mean \pm SEM. ** $p < 0,01$ vs control (Kruskal-Wallis + post hoc Dunn´s) and *** $p \leq 0,0001$ vs control (ANOVA + post hoc Bonferroni).

3.2.8. Urinary markers

There were no significant changes in urinary creatinine, K^+ excretion or NAG activity at the end of the subchronic treatment. However, significant increases in mAlb excretion of LVS 3 mg/kg group ($F=4,093$; $p < 0,05$, ANOVA/Bonferroni) and Na^+ excretion of LVS 12 mg/kg group were observed when compared to control (Table 6) ($F=3,462$; $p < 0,05$, ANOVA/Bonferroni).

Table 6 – Excretion of urinary biomarkers after subchronic administration of LVS.

Urinary biomarkers	Control	LVS 3 mg/kg	LVS 6 mg/kg	LVS 12 mg/kg
K^+ (mEq/L)	55.7 \pm 12.4	31.6 \pm 4.3	61.9 \pm 8.6	64.8 \pm 10.7
Na^+ (mEq/L)	72.3 \pm 5.9	87.4 \pm 6.5	76.6 \pm 4.1	98.5 \pm 7.7*
Creatinine (mg/dL)	21.62 \pm 3.49	16.07 \pm 3.13	19.19 \pm 3.98	17.09 \pm 3.95
mAlb (mg/g creatinina)	0.28 \pm 0.09	1.03 \pm 0.26*	0.34 \pm 0.15	0.34 \pm 0.14
NAG (U/g creatinina)	26.16 \pm 2.13	41.62 \pm 6.45	33.65 \pm 5.39	43.85 \pm 6.88

Data are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs control (ANOVA + post hoc Bonferroni). K^+ =potassium ion; Na^+ =sodium ion; mAlb=microalbuminuria.

3.2.9. Comet assay

No single- or double-strand breaks of DNA were observed subchronic treatment in all experimental groups compared to control (data not shown).

4. DISCUSSION

LVS treatment induced behavioral alterations in rats. As a nicotinic agonist, LVS acts as a ganglionic stimulant in mammals, acting on both parasympathetic and

sympathetic receptors (Van Nueten, 1972). This stimulation induces cardiovascular effects, such as an increase of cardiac frequency, tachycardia, and hypertension (Marik & Varon, 2007). Hypertension seems to occur through the stimulation of the sympathetic nervous system which causes vasoconstriction through activation of adrenergic receptors, a condition that is also common in cocaine users because of its sympathomimetic effects (Marik & Varon, 2007). Studies correlated this condition with epistaxis for a long time (Herkner et al, 2000; Sarhan & Algamal, 2015; Payne et al, 2020). The rate of epistaxis, or nosebleed, in patients with hypertension ranges from 24% to 64% (Herkner et al, 2020). In a systematic review and meta-analysis, Min et al (2017) showed a significant association between hypertension and the risk of epistaxis.

At low doses, the effects of ganglionic stimulants in CNS, such as nicotine, cause mild analgesia while high doses cause tremors and seizures (Alkam & Nabeshima, 2019). Seizures related with nicotine effects seems to be associated with its action on the neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). LVS is also an allosteric modulator of neuronal nAChRs (Lewis, Yakel & Pandya, 2017). The activation of $\alpha 7$ -nAChRs, which are highly distributed in the amygdala, an area involved in epileptogenesis, stimulates the glutamate release, which consequently activates N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors and causes the seizures (Fryman et al, 2020). Therefore, the seizures presented by LVS 36 mg/kg group in the first 15 minutes of behavioral observation in the acute toxicity test and in the subchronic toxicity test may be related to this mechanism.

On the other hand, studies show that the initial stimulation caused by high doses of ganglionic stimulants, such as nicotine, are followed by CNS depression, bradycardia, hypotension and respiratory insufficiency which lead to death (Benowitz, 2008; Alkam & Nabeshima, 2019). The respiratory insufficiency occurs through the activation of nAChRs present in the neuromuscular junctions leading to the depolarization of the end plate and, subsequently, the blockade of the depolarization (Pappano et al, 1998). This blockade causes weakness and muscle paralysis, including the paralysis of the breathing muscles. It is possible to assume that, after the initial stimulation caused by LVS, there was transmission blockade which lead to the eyelid ptosis in 80% of the LVS 24 mg/kg group, which is a CNS depressor effect and to the fatal outcome. Noteworthy, the doses used in this study were under the DL50 and this fatal outcome was not expected.

Stimulatory effects of LVS might be also responsible for the increase in motor coordination. LVS is metabolized by the liver into some active metabolites, like aminorex (Benowitz, 2008; Brunt et al, 2017). Aminorex has a cocaine-like effect on DAT and NET and an amphetamine-like effect on human SERT, which leads to increased extracellular levels of dopamine and serotonin (Hofmaier et al, 2014; Kudlacek et al, 2017). These facts associated with the prolonged permanency of aminorex in the organism when compared to cocaine and levamisole may explain its use as an adulterant. Hofmaier et al (2014) suggests that LVS is used to prolong the cocaine effects, since the aminorex effects may appear after the cocaine's. Therefore, after a rapid initial stimulation, there was a new late stimulatory effect generated by aminorex.

A preclinical study used three doses of LVS (1, 5 and 10 mg/kg) and evaluated locomotor activity right after administration. They observed locomotor activation only in the 5 mg/kg group and LVS (0,1 mg/kg, "inactive" dose) enhanced locomotor activation produced by cocaine at 10 mg/kg but not at 30 mg/kg (Tallarida; Tallarida & Rawls, 2015). Otherwise, they suggest that these effects occurred due to the activation of nAChRs by LVS which enhanced mesolimbic dopamine output through the activation of $\alpha 3\beta 4$ nAChRs of medial habenula or the $\alpha 4\beta 2$ and $\alpha 6\beta 2$ nAChRs in the ventral tegmental area. Our results are remarkably similar with these, but we presume that the chosen doses for our study were not capable to promote the increased locomotor activity after 24 hours of administration.

Subchronic treatment with LVS at the dose of 6 mg/kg induced cognitive impairment in short- and long-term memory. LVS-adulterated cocaine could be related to neurotoxic effects. Chronic cocaine users, with low or high doses of LVS, had cognitive impairment of working memory when compared to individuals in the control group, who used only cocaine (Vonmoos et al, 2018).

There are many case studies describing severe alterations produced by LVS-adulterated cocaine use, including hematological, hepatic, cardiovascular and renal complications. Among the hematological alterations are agranulocytosis and neutropenia. The significant decrease in the number of neutrophils in LVS 6 mg/kg group, observed in our study, corroborates with the neutropenia described in individuals who use LVS-adulterated cocaine (Martinez et al, 2015).

Thrombocytopenia, or decreased number of platelets, was also observed in LVS 12 mg/kg. This was one of the reasons that made LVS withdrawn from the market in 1999 by Food and Drug Administration (FDA) (Arora et al, 2012). In 2015, there was a case report of a chronic cocaine user who had a recurrent febrile neutropenia and thrombocytopenia after consumption of cocaine adulterated with LVS (Martinez et al, 2015). In addition, the presence of anemia, neutropenia and thrombocytopenia was associated with bone marrow failure due to the use of LVS for the treatment of vitiligo (George et al, 2019).

Furthermore, Sayadi & Laub (2018) described the case of a patient with history of drug addiction who developed leukocytic vasculitis induced by LVS shortly after the consumption of crack. The patient also had neutropenia, hand necrosis, leukopenia, microcytic anemia, positive anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (p-ANCA) and positive anti-nuclear antibody (p-ANA). The administration of LVS associated with p-ANCA has been strongly related to the development of leukocytic vasculitis and renal diseases, such as glomerulonephritis (Veronese et al, 2016; Lötscher et al, 2019). For this reason, serum and urinary biomarkers were evaluated to verify renal functions. Our results demonstrate that acute and subchronic administration of LVS can promote a nonspecific electrolyte imbalance excretion. Under normal dietary conditions, the imbalance of one or more electrolytes may indicate a possible early kidney damage. However, the excretion of electrolytes, such as Na⁺ and K⁺, in urine, can also vary according to the urinary concentration. More concentrated urine due to decreased water intake, may lead to a false increase in the excretion of these cations (Palmer & Clegg, 2019).

An increase in microalbuminuria excretion was also observed. Epidemiological evidence demonstrates that the presence of microalbuminuria is associated with increased cardiovascular morbidity and mortality without the involvement of other risk factors (Chatzikyrkou et al, 2017). There is a positive relationship between microalbuminuria and the development of acute myocardial infarction or strokes (Schmitz & Vaeth, 1988). In addition, there is a strong relationship between the presence of microalbuminuria and the development of chronic kidney disease, mainly involving an increase in systemic blood pressure and glomerular capillary pressure (Zanella, 2006; Márquez et al, 2019).

In serum biochemistry, an increase in ALP activity was observed. It is a group of enzymes located on the extracellular side of cells. There are four types of ALPs in humans: intestinal ALP, germinal ALP, placental ALP and tissue non-specific ALP (TNAP). TNAP can be found in various tissues, such as: blood vessels, bones, kidney and liver. Furthermore, it is also located in the lining membranes of the bile ducts and is found elevated in disorders of the biliary tract, as well as in bone and liver disorders (Telli, Frigeri & Mello, 2016). However, when there is liver damage, there is also a change in other serum enzymes such as γ -GT, AST and ALT, which was not observed. Therefore, it is possible to assume that the increased ALP activity in serum could be related to some bone or biliary damage.

LVS-induced apoptosis seems to be related to oxidative stress (Artwohl et al (2000), which is counteracted by the antioxidant system, such as GSH. This is an important non-enzymatic antioxidant that contributes to the regulation of oxidative stress and in the biotransformation of xenobiotics (Schott, 2005). A decrease of its levels can increase the toxicity of substances by reducing the body's antioxidant defenses (Hayes, 1994). This was observed in erythrocytes after acute treatment, suggesting that the LVS can exert an oxidative imbalance, which may be associated with a greater susceptibility to the toxic effects generated by the drug. On the contrary, after subchronic treatment, an increase in erythrocytes GSH was observed. This effect may be related to the phase II detoxifying biotransformation process (Zhang et al, 2019). Besides, enhancing GSH, the major cellular redox system, could lead to a reverse effect, i.e., a pro-oxidant effect, since, this process generates the hydrogen peroxide formation and can lead to cell apoptosis (Pérez-Torres, Guarner-Lans & Rubio-Ruiz, 2017). In addition, lipid peroxidation and levels of total thiols were also evaluated in the organs. There was a significant decrease in the levels of total thiols only in the liver of all LVS groups, which are in agreement with the involvement of thiol groups, such as GSH, in the LVS biotransformation process (Pérez-Torres, Guarner-Lans & Rubio-Ruiz, 2017).

Our study has some limitations, but it provided a comprehensive overview of the systemic toxicology of LVS. The main limitation of our study was to assess the toxic effects of LVS without the association with cocaine. Second, we do not evaluate important metabolites in the blood and urine, such as aminorex, and other substances

related with the metabolism of LVS, like p-ANCA, which are important to understand if any observed effects are related to it.

CONCLUSION

In summary, the acute and subchronic administration of LVS produced toxic effects of clinical relevance, characterized by behavioral, cognitive, biochemical, and hematological changes. These changes make LVS a dangerous cutting agent, since the toxic effects found in this study can cause severe damage to individuals who use it. However, further studies are needed to explain the mechanisms involved in the symptoms presented by the animals and to verify the impacts of the combination with cocaine.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Andre Luís Oenning Tshciedel and Franciele Kich Giongo for technical support. The research was supported by the following Brazilian funding agencies: National Council for Scientific and Technological Development - CNPq; Committee for the Development of Higher Education Personnel – CAPES, Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and PROPG/UFRGS.

REFERENCES

- Alkam, T., & Nabeshima, T., 2019. Molecular mechanisms for nicotine intoxication. *Neurochemistry international*, 125, 117-126.
- Artwohl, M., Hölzenbein, T., Wagner, L., Freudenthaler, A., Waldhäusl, W., & Baumgartner-Parzer, S. M. (2000). Levamisole induced apoptosis in cultured vascular endothelial cells. *British journal of pharmacology*, 131(8), 1577-1583.
- Arora, N. P., Jain, T., Bhanot, R., & Natesan, S. K., 2012. Levamisole-induced leukocytoclastic vasculitis and neutropenia in a patient with cocaine use: an extensive

case with necrosis of skin, soft tissue, and cartilage. *Addiction science & clinical practice*, 7(1), 19.

Benowitz, N. L., 2008. Clinical pharmacology of nicotine: implications for understanding, preventing, and treating tobacco addiction. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 83(4), 531-541.

Brunt, T. M., van den Berg, J., Pennings, E., & Venhuis, B., 2017. Adverse effects of levamisole in cocaine users: a review and risk assessment. *Archives of Toxicology*, 91(6), 2303-2313..

Bulcão, R. P., de Freitas, F. A., Dallegrave, E., Venturini, C. G., Baierle, M., Durgante, J., ... & Salvador, M., 2014. In vivo toxicological evaluation of polymeric nanocapsules after intradermal administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 86(2), 167-177.

Casale, J. F., Colley, V. L., & LeGatt, D. F., 2012. Determination of Phenyltetrahydroimidazothiazole Enantiomers (Levamisole/Dexamisole) in Illicit Cocaine Seizures and in the Urine of Cocaine Abusers via Chiral Capillary Gas Chromatography–Flame-Ionization Detection: Clinical and Forensic Perspectives. *Journal of analytical toxicology*, 36(2), 130-135.

Chatzikyrkou, C., Menne, J., Izzo, J., Viberti, G., Rabelink, T., Ruilope, L. M., ... & Haller, H., 2017. Predictors for the development of microalbuminuria and interaction with renal function. *Journal of hypertension*, 35(12), 2501-2509.

Costa-Valle, M. T., Tonieto, B. D., Altknecht, L., Cunha, C. D., Fão, N., Cestonaro, L. V., ... & Arbo, M. D., 2018. Energy drink and alcohol combination leads to kidney and liver alterations in rats. *Toxicology and applied pharmacology*, 355, 138-146.

Ellman, G. L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*, 82(1), 70-77.

Esterbauer, H., & Cheeseman, K. H., 1990. [42] Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. In *Methods in enzymology* (Vol. 186, pp. 407-421). Academic Press.

Fiorentin, T. R., Fogarty, M., Limberger, R. P., & Logan, B. K., 2019. Determination of cutting agents in seized cocaine samples using GC–MS, GC–TMS and LC–MS/MS. *Forensic science international*, 295, 199-206.

Fryman, C., Lou, B., Weber, A. G., Steinberg, H. N., Khanijo, S., Iakovou, A., & Makaryus, M. R., 2020. Acute respiratory failure associated with vaping. *Chest*, 157(3), e63-e68.

George, T. C., Freet, D. J., Cross, J. M., & Huzar, T. F., 2019. Levamisole-induced vasculitis. *Journal of the American Academy of PAs*, 32(1), 23-27.

Göethel, G., Brucker, N., Moro, A. M., Charão, M. F., Fracasso, R., Barth, A., ... & Saldiva, P. H., 2014. Evaluation of genotoxicity in workers exposed to benzene and atmospheric pollutants. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 770, 61-65.

Hayes, Wallace A. *Principles and Methods of toxicology*. 3rd ed. New York, Raven Press, 1994. Chapter 3, p. 81-88.

Herkner, H., Laggner, A. N., Müllner, M., Formanek, M., Bur, A., Gamper, G., ... & Hirschl, M. M., 2000. Hypertension in patients presenting with epistaxis. *Annals of emergency medicine*, 35(2), 126-130.

Hofmaier, T., Luf, A., Seddik, A., Stockner, T., Holy, M., Freissmuth, M., ... & Kudlacek, O., 2014. Aminorex, a metabolite of the cocaine adulterant levamisole, exerts amphetamine like actions at monoamine transporters. *Neurochemistry international*, 73, 32-41.

Ho, E. N. M., Leung, D. K. K., Leung, G. N. W., Wan, T. S. M., Wong, A. S. Y., Wong, C. H. F., ... & Sams, R., 2009. Aminorex and rexamino as metabolites of levamisole in the horse. *Analytica chimica acta*, 638(1), 58-68.

Horak, E., Hopfer, S. M., & Sunderman Jr, F. W., 1981. Spectrophotometric assay for urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity. *Clinical chemistry*, 27(7), 1180-1185.

Kudlacek, O., Hofmaier, T., Luf, A., Mayer, F. P., Stockner, T., Nagy, C., ... & Sitte, H. H., 2017. Cocaine adulteration. *Journal of chemical neuroanatomy*, 83, 75-81.

- Laurentino, A. O. M., de Medeiros, F. D., de Oliveira, J., da Rosa, N., Gomes, T. M., de Medeiros Peretti, E., ... & Fortunato, J. J., 2019. Effects of prenatal exposure to temephos on behavior and social interaction. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 15, 669.
- Lee, K. C., Ladizinski, B., & Federman, D. G., 2012. Complications associated with use of levamisole-contaminated cocaine: an emerging public health challenge. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 87, No. 6, pp. 581-586). Elsevier.
- A Lewis, J., L Yakel, J., & A Pandya, A., 2017. Levamisole: A positive allosteric modulator for the $\alpha 3\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptors prevents weight gain in the CD-1 mice on a high fat diet. *Current pharmaceutical design*, 23(12), 1869-1872.
- Lötscher, F., Krusche, M., Ruffer, N., Kubacki, T., Person, F., & Kötter, I., 2019. Cocaine-induced ANCA-associated renal disease: a case-based review. *Rheumatology international*, 39(11), 2005-2014.
- Lueptow, L. M., 2017. Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (126), e55718.
- Maciel, E. S., Biasibetti, R., Costa, A. P., Lunardi, P., Schunck, R. V. A., Becker, G. C., ... & Garcia, S. C., 2014. Subchronic oral administration of Benzo [a] pyrene impairs motor and cognitive behavior and modulates S100B levels and MAPKs in rats. *Neurochemical research*, 39(4), 731-740.
- Maldaner, A. O., Botelho, É. D., Zacca, J. J., Camargo, M. A., Braga, J. W., & Grobério, T. S., 2015. Brazilian Federal District cocaine chemical profiling-mass balance approach and new adulterant routinely quantified (aminopyrine). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 26(6), 1227-1231.
- Marik, P. E., & Varon, J., 2007. Hypertensive crises: challenges and management. *Chest*, 131(6), 1949-1962.
- Marquez, J., Aguirre, L., Muñoz, C., Echeverri, A., Restrepo, M., & Pinto, L. F., 2017. Cocaine-levamisole-induced vasculitis/vasculopathy syndrome. *Current Rheumatology Reports*, 19(6), 36.

- Márquez, D. F., Ruiz-Hurtado, G., Segura, J., & Ruilope, L., 2019. Microalbuminuria and cardiorenal risk: old and new evidence in different populations. *F1000Research*, 8.
- Martinez, E., Alvi, R., Venkatram, S., & Diaz-Fuentes, G., 2015. Recurrent febrile neutropenia and thrombocytopenia in a chronic cocaine user: a case of levamisole induced complications. *Case reports in critical care*, 2015.
- Min, H. J., Kang, H., Choi, G. J., & Kim, K. S., 2017. Association between hypertension and epistaxis: systematic review and meta-analysis. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*, 157(6), 921-927.
- Moretti, E. G., Yujra, V. Q., Claudio, S. R., Silva, M. J. D., Vilegas, W., Pereira, C. D. S., ... & Ribeiro, D. A., 2016. Acute crack cocaine exposure induces genetic damage in multiple organs of rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(8), 8104-8112.
- Nolan, A. L., & Jen, K. Y., 2015. Pathologic manifestations of levamisole-adulterated cocaine exposure. *Diagnostic pathology*, 10(1), 1-6.
- Palmer, B. F., & Clegg, D. J., 2019. The use of selected urine chemistries in the diagnosis of kidney disorders. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 14(2), 306-316.
- Pappano, A. J., 1998. Cholinoceptor-activating and cholinesterase-inhibiting drugs. *Basic and clinical pharmacology*, 12, 97-113.
- Payne, S. C., Feldstein, D., Anne, S., & Tunkel, D. E., 2020. Hypertension and epistaxis: why is there limited guidance in the nosebleed clinical practice guidelines?. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*, 162(1), 33-34..
- Pérez-Torres, I., Guarner-Lans, V., & Rubio-Ruiz, M. E., 2017. Reductive stress in inflammation-associated diseases and the pro-oxidant effect of antioxidant agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), 2098.
- Sarhan, N. A., & Algamal, A. M., 2015. Relationship between epistaxis and hypertension: A cause and effect or coincidence?. *Journal of the Saudi Heart Association*, 27(2), 79-84.
- Sayadi, L., & Laub, D., 2018. Levamisole-induced vasculitis. *Eplasty*, 18.

Schmitz, A., & Vaeth, M. (1988). Microalbuminuria: a major risk factor in non-insulin-dependent diabetes. A 10-year follow-up study of 503 patients. *Diabetic Medicine*, 5(2), 126-134.

SCHOTT, K. L., 2005. Quantificação da glutatona reduzida em eritrócitos humanos por cromatografia líquida de alta eficiência-uv: validação e aplicação. *Dissertação de mestrado*. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica. Universidade Federal de Santa Maria.

Solomon, N., & Hayes, J., 2017. Levamisole: a high performance cutting agent. *Academic forensic pathology*, 7(3), 469-476.

Tallarida, C. S., Tallarida, R. J., & Rawls, S. M., 2015. Levamisole enhances the rewarding and locomotor-activating effects of cocaine in rats. *Drug and alcohol dependence*, 149, 145-150.

Telli, E. M. P. R., Frigeri, M., & Mello, S. R., 2016. Avaliação da atividade de enzimas hepáticas em dependentes, ex-dependentes e não usuários do etanol. *Rev Bras Análises Clínicas*, 48(3), 245-52.

Laar, M. V., Cruys, G., Ooyen-Houben, M. V., Croes, E., Pol, P., Meijer, R., & Ketelaars, T., 2015. *The Netherlands drug situation 2014*. Trimbos-Institute.

Veronese, F. V., Dode, R. S. O., Friderichs, M., Thomé, G. G., da Silva, D. R., Schaefer, P. G., ... & Barros, E. J. G., 2016. Cocaine/levamisole-induced systemic vasculitis with retiform purpura and pauci-immune glomerulonephritis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 49(5).

Vonmoos, M., Hirsiger, S., Preller, K. H., Hulka, L. M., Allemann, D., Herdener, M., & Quednow, B. B., 2018. Cognitive and neuroanatomical impairments associated with chronic exposure to levamisole-contaminated cocaine. *Translational psychiatry*, 8(1), 1-12.

Zanella, M. T., 2006. Microalbuminúria: fator de risco cardiovascular e renal subestimado na prática clínica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*.

Zhang, C., Li, H., Qin, L., Ge, J., Qi, Z., Talukder, M., ... & Li, J. L., 2019. Nuclear receptor AHR-mediated xenobiotic detoxification pathway involves in atrazine-induced nephrotoxicity in quail (*Coturnix C. coturnix*). *Environmental Pollution*, 253, 889-898.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Table S1 – Relative organs weight collected after the acute administration of LVS.

	Control	LVS 12 mg/kg	LVS 24 mg/kg	LVS 36 mg/kg
Heart	0,35 ± 0,05	0,33 ± 0,03	0,32 ± 0,03	0,32 ± 0.0
Liver	3,56 ± 0,36	3,70 ± 0,23	3,59 ± 0,24	3,81 ± 0.0
Kidneys	0,75 ± 0,05	0,74 ± 0,04	0,73 ± 0,04	0,72 ± 0.0
Spleen	0,26 ± 0,02	0,27 ± 0,02	0,25 ± 0,04	0,29 ± 0.0

Data are expressed as mean ± SEM.

Table S2 – Complete blood count evaluated after acute LVS administration.

	Control	LVS 12 mg/kg	LVS 24 mg/kg	LVS 36 mg/kg
<i>Erythrogram</i>				
Erythrocytes (x10 ⁶ /mm ³)	7.99 ± 0.10	7.48 ± 0.20	7.97 ± 0.23	8.03 ± 0.0
Hemoglobin (g/dL)	15.32 ± 0.22	14.74 ± 0.36	15.62 ± 0.42	16.00 ± 0.0
Hematocrit (%)	43.92 ± 0.61	42.26 ± 0.83	44.58 ± 0.99	45.10 ± 0.0
<i>Platelet count</i>				
Platelets (x10 ³ /mm ³)	786.8 ± 24.3	717.2 ± 26.3	753.6 ± 37.8	912.0 ± 0.0
MPV (µm ³)	6.30 ± 0.06	6.34 ± 0.09	6.36 ± 0.07	6.80 ± 0.0
Plateletcrit (%)	0.49 ± 0.01	0.45 ± 0.01	0.48 ± 0.02	0.41 ± 0.0
<i>Leukogram</i>				
Leukocytes (x10 ³ /mm ³)	7.02 ± 0.65	8.58 ± 0.45	8.66 ± 0.47	9.40 ± 0.0
Neutrophils (%)	7.90 ± 0.90	6.06 ± 0.89	12.40 ± 2.19	16.90 ± 0.0
Lymphocytes (%)	88.78 ± 1.12	91.06 ± 0.95	83.76 ± 2.72	78.60 ± 0.0
Monocytes (%)	3.30 ± 0.37	2.84 ± 0.23	3.70 ± 0.48	4.30 ± 0.0
Eosinophils (%)	0.0 ± 0.0	0.04 ± 0.02	0.14 ± 0.11	0.20 ± 0.0
Basophils (%)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

Data are expressed as mean ± SEM.

Table S3 – Levels of serum biomarkers after acute administration of LVS.

Serum biomarkers	Control	LVS 12 mg/kg	LVS 24 mg/kg	LVS 36 mg/kg
AST (U/L)	111.8 ± 9.1	88.6 ± 7.9	112.4 ± 14.6	105.0 ± 0.0
ALT (U/L)	44.7 ± 3.8	48.2 ± 1.2	46.2 ± 2.7	59.0 ± 0.0
γ-GT (U/L)	11.0 ± 0.3	12.6 ± 0.6	10.6 ± 1.7	14.0 ± 0.0
Creatinine (mg/dL)	0.48 ± 0.02	0.46 ± 0.04	0.48 ± 0.04	0.50 ± 0.0
Urea (mg/dL)	57.0 ± 3.9	53.6 ± 4.4	49.0 ± 2.5	37.0 ± 0.0
ALP (U/L)	124.6 ± 12.2	156.6 ± 6.9	136.6 ± 9.6	120.0 ± 0.0
LDH (U/L)	159.4 ± 15.3	94.7 ± 5.7	166.0 ± 31.5	148.0 ± 0.0

Data are expressed as mean ± SEM. AST = aspartate aminotransferase; ALT = alanine aminotransferase; γ-GT = γ-glutamyltranspeptidase; ALP = alkaline phosphatase; LDH = lactate dehydrogenase.

4. CONCLUSÕES GERAIS

O uso do LVS como adulterante da cocaína vem ganhando notoriedade nos últimos anos, principalmente devido aos efeitos adversos causados pela combinação destas substâncias. Estudos já haviam demonstrado que o uso de LVS em doses terapêuticas poderia causar efeitos colaterais importantes, tais como: neutropenia, agranulocitose e leucoencefalopatia. Contudo, poucos são os estudos que verificam estes efeitos em doses tóxicas como as utilizadas na adulteração da cocaína.

Neste sentido, nós investigamos os efeitos sistêmicos causados pela exposição aguda e subcrônica ao LVS em doses altas. Nossos resultados demonstram que a administração aguda de LVS em diferentes doses foi capaz de causar alterações comportamentais severas condizentes com um quadro de toxicidade aguda, letalidade, congestão dos órgãos vitais, e diminuição dos níveis de GSH, sendo estes efeitos mais proeminentes nas doses de 24 e 36 mg/kg. Além disso, a administração subcrônica de LVS causou alteração no desempenho dos animais nos testes de rotarod e de reconhecimento de objetos, alteração no hemograma, congestão de órgãos vitais, e aumento dos níveis séricos de FAL, da excreção de biomarcadores urinários, da massa relativa do fígado e dos níveis de GSH, sendo estes efeitos mais pronunciados nas doses de 6 e 12 mg/kg.

De maneira geral, nossos resultados demonstram que o LVS é um perigoso adulterante, capaz de causar efeitos tóxicos tanto na administração aguda quanto subcrônica – sendo estes efeitos relacionados à dose de LVS na qual o animal é exposto.

O conhecimento das alterações causadas por sua administração pode auxiliar no correto diagnóstico e tratamento dos indivíduos que possuem histórico de uso de cocaína, visto que, a variedade e inespecificidade de alguns sintomas podem levar a diagnósticos clínicos errôneos, devido ao fato de serem semelhantes aos de outras patologias que não estão relacionadas com o consumo de drogas de abuso, e gerar complicações no quadro clínico do paciente. Além disso, através dos nossos resultados é possível direcionar futuras pesquisas para tentar elucidar os mecanismos

envolvidos na fisiopatologia das alterações observadas e fornecer, desta forma, um subsídio maior para investigação de intervenções mais eficazes.

5. PERSPECTIVAS

Considerando que há poucos estudos sobre a toxicidade do levamisol em combinação com a cocaína e sobre os seus aspectos farmacodinâmicos, observamos que há um longo caminho pela frente. Como perspectiva subsequente, temos a realização dos protocolos experimentais utilizando a cocaína para verificar se as alterações encontradas neste trabalho podem ser agravadas ou não pela sua combinação, sendo que estes protocolos já eram previstos, porém, devido a questões burocráticas para a aquisição ou recebimento de doação de cocaína não foi possível realizá-lo.

Além disso, devido às alterações comportamentais e cognitivas encontradas, pretendemos futuramente investigar os efeitos do levamisol sobre alguns receptores nicotínicos específicos de modo a tentar desvendar por quais mecanismos ele age no SNC.

Acreditamos que uma compreensão mais ampla dos efeitos e dos meios pelos quais o levamisol atua pode contribuir de forma significativa na prática clínica, melhorando o diagnóstico e o tratamento de pacientes e contribuindo para a melhoria da qualidade de vida destes indivíduos e de suas famílias.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERNARDO, Naissa Prévide et al. Caffeine and other adulterants in seizures of street cocaine in Brazil. *International Journal of Drug Policy*, v. 14, n. 4, p. 331-334, 2003.
- BRUNT, Tibor Markus et al. Adverse effects of levamisole in cocaine users: a review and risk assessment. ***Archives of Toxicology***, v. 91, n. 6, p. 2303-2313, 2017.
- BUCHANAN, Jennie A. et al. A confirmed case of agranulocytosis after use of cocaine contaminated with levamisole. ***Journal of Medical Toxicology***, v. 6, n. 2, p. 160-164, 2010.
- CASALE, John F.; COLLEY, Valerie L.; LEGATT, Donald F. Determination of Phenyltetrahydroimidazothiazole Enantiomers (Levamisole/Dexamisole) in Illicit Cocaine Seizures and in the Urine of Cocaine Abusers via Chiral Capillary Gas Chromatography–Flame-Ionization Detection: Clinical and Forensic Perspectives. ***Journal of analytical toxicology***, v. 36, n. 2, p. 130-135, 2012.
- COOPER, Kevin Mark et al. Stability during cooking of anthelmintic veterinary drug residues in beef. ***Food Additives and Contaminants***, v. 28, n. 2, p. 155-165, 2011.
- DE SOUSA LIMA, Matheus Eugenio et al. Uso da cocaína: de Chernoviz (1904) aos dias atuais. ***Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade***, v. 11, n. 1, 2018.
- FIORENTIN, Taís Regina et al. Determination of cutting agents in seized cocaine samples using GC–MS, GC–TMS and LC–MS/MS. ***Forensic science international***, v. 295, p. 199-206, 2019.
- FRAZER, Kirsten M.; RICHARDS, Qwynten; KEITH, Diana R. The long-term effects of cocaine use on cognitive functioning: A systematic critical review. ***Behavioural brain research***, v. 348, p. 241-262, 2018.
- GARCÉS-MONTOYA, Jovanny; BERROUET-MEJÍA, Marie Claire, VELÁSQUEZ-ESCOBAR, María Camila. 3 Cases of cocaine – levamisole syndrome in Medellín. ***Revista CES Medicine*** v.29, n. 2, p. 295-304, 2015.

GARG, Lohit et al. Levamisole/cocaine induced systemic vasculitis and immune complex glomerulonephritis. **Case reports in nephrology**, v. 2015, 2015.

HERNANDO, Guillermina et al. Contribution of subunits to *Caenorhabditis elegans* levamisole-sensitive nicotinic receptor function. **Molecular pharmacology**, v. 82, n. 3, p. 550-560, 2012.

HESS, Cornelius et al. Determination of levamisole, aminorex, and pemoline in plasma by means of liquid chromatography-mass spectrometry and application to a pharmacokinetic study of levamisole. **Drug testing and analysis**, v. 6, n. 10, p. 1049-1054, 2014.

HOFMAIER, Tina et al. Aminorex, a metabolite of the cocaine adulterant levamisole, exerts amphetamine like actions at monoamine transporters. **Neurochemistry international**, v. 73, p. 32-41, 2014.

JUANENA, Carolina et al. Cocaína adulterada con levamisol: reporte de tres casos clínicos. **Revista Médica Del Uruguay** v. 33, n.2, p.138-144, 2017.

KARCH, Steven B. et al. Aminorex associated with possible idiopathic pulmonary hypertension in a cocaine user. **Forensic Science International**, v. 240, p. e7-e10, 2014.

KHAN, Mohammad Saud et al. Recurrent levamisole-induced agranulocytosis complicated by bowel ischemia in a cocaine user. **The American journal of case reports**, v. 19, p. 630, 2018.

KUDLACEK, Oliver et al. Cocaine adulteration. **Journal of chemical neuroanatomy**, v. 83, p. 75-81, 2017.

LAPACHINSKE, Silvio Fernandes et al. Analysis of cocaine and its adulterants in drugs for international trafficking seized by the Brazilian Federal Police. **Forensic science international**, v. 247, p. 48-53, 2015.

LAROCQUE, Alexandre; HOFFMAN, Robert S. Levamisole in cocaine: unexpected news from an old acquaintance. **Clinical Toxicology**, v. 50, n. 4, p. 231-241, 2012.

LIU, H. M. et al. Leukoencephalopathy induced by levamisole alone for the treatment of recurrent aphthous ulcers. **Neurology**, v. 67, n. 6, p. 1065-1067, 2006.

LIU, Yi-Wei Justin et al. Levamisole-adulterated cocaine nephrotoxicity: ultrastructural features. **American journal of clinical pathology**, v. 145, n. 5, p. 720-726, 2016.

LONG, Lili et al. Levamisole-induced leukoencephalopathy mimicking Baló disease. **Neurology**, v. 84, n. 3, p. 328-328, 2015.

LUYCKX, M. et al. Pharmacokinetics of levamisole in healthy subjects and cancer patients. **European journal of drug metabolism and pharmacokinetics**, v. 7, n. 4, p. 247-254, 1982.

MALDANER, Adriano O. et al. Brazilian Federal District cocaine chemical profiling-mass balance approach and new adulterant routinely quantified (aminopyrine). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 6, p. 1227-1231, 2015.

MARQUEZ, Javier et al. Cocaine-levamisole-induced vasculitis/vasculopathy syndrome. **Current Rheumatology Reports**, v. 19, n. 6, p. 36, 2017.

MCGRATH, Martina M. et al. Contaminated cocaine and antineutrophil cytoplasmic antibody-associated disease. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 6, n. 12, p. 2799-2805, 2011.

NOLAN, Amber L.; JEN, Kuang-Yu. Pathologic manifestations of levamisole-adulterated cocaine exposure. **Diagnostic pathology**, v. 10, n. 1, p. 1-6, 2015.

PATNAIK, Soumya et al. Is levamisole-induced vasculitis a relegated diagnostic possibility? A case report and review of literature. **The American journal of case reports**, v. 16, p. 658, 2015.

POPE, Jeffrey D.; DRUMMER, Olaf H.; SCHNEIDER, Hans G. The cocaine cutting agent levamisole is frequently detected in cocaine users. **Pathology**, v. 50, n. 5, p. 536-539, 2018.

REID, Joel M. et al. Clinical and pharmacokinetic studies of high-dose levamisole in combination with 5-fluorouracil in patients with advanced cancer. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 41, n. 6, p. 477-484, 1998.

SENA, L. C. S. Desenvolvimento de método analítico para determinação dos principais adulterantes da cocaína em urina humana. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. 2016.

SPECTOR, Sydney; MUNJAL, Inam; SCHMIDT, Dennis E. Effects of the immunostimulant, levamisole, on opiate withdrawal and levels of endogenous opiate alkaloids and monoamine neurotransmitters in rat brain. **Neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 5, p. 417-427, 1998.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME (UNODC). Coca Cultivation in the Andean Region: A Survey of Bolivia, Colombia and Peru. Viena: United Nation publication. 2008. 134p.

VAN LAAR, M. et al. The netherlands drug situation in 2014. **Trimbos institute, Utrecht, The Netherlands**, 2015.

VERONESE, F. V. et al. Cocaine/levamisole-induced systemic vasculitis with retiform purpura and pauci-immune glomerulonephritis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 5, 2016.

WOLFORD, Angela et al. Immune-mediated agranulocytosis caused by the cocaine adulterant levamisole: a case for reactive metabolite (s) involvement. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 40, n. 6, p. 1067-1075, 2012.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA CEUA/UFRGS



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 35347

Título: AVALIACAO DA TOXICIDADE DE LEVAMISOL E COCAINA, ISOLADOS OU EM ASSOCIACAO, EM RATOS

Vigência: 18/05/2018 à 31/12/2020

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

MIRNA BAINY LEAL - coordenador desde 18/05/2018
MARCELO DUTRA ARBO - pesquisador desde 18/05/2018
HELENA BEATRIZ LARROSA OLIVEIRA - Laboratorista desde 18/05/2018
Ana Olívia Martins Laurentino - Aluno de Mestrado desde 18/05/2018

Equipe Externa:

ELVINO JOSE BOHN GASS - coordenador desde 18/05/2018
Viviane Cristina Sebben - pesquisador desde 18/05/2018
Verônica Antunes - pesquisador desde 18/05/2018
Gustavo Gomes Thomé - pesquisador desde 18/05/2018
Pedro Guilherme Schaefer - pesquisador desde 18/05/2018
Francisco Veríssimo Veronese - pesquisador desde 18/05/2018
Eliane Dallegrove - pesquisador desde 18/05/2018
Alberto Nicoletta - pesquisador desde 18/05/2018

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 03/12/2018 - Sala 323 - Anexo I do prédio da Reitoria - Campus Centro da UFRGS- Bairro Farroupilha - Porto Alegre, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 150 ratos Wistar, machos, com 60 dias de idade, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da UFRGS (CREAL/UFRGS), de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 14 de Dezembro de 2018

MARCELO MELLER ALIEVI
Coordenador da comissão de ética