

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Farmácia
Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO LEVAMISOL

Janaína Lucas de Oliveira Salomón

Porto Alegre, dezembro de 2019.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Farmácia
Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Avaliação da toxicidade aguda de Levamisol

Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia apresentado a Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob a orientação da Profa. Dra. Mirna Bainy Leal para obtenção do título de Farmacêutica.

Porto Alegre, dezembro de 2019.

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, Yamil Alcibíades Salomón Rodriguez e Zelly Beatriz Dória Lucas de Oliveira, pelo apoio, incentivo, amor e compreensão.

A minha avó, Ruth Dória Lucas de Oliveira, pelas doces palavras, pelo carinho, preocupação e companhia em todos os momentos.

A meu avó, Antônio Lucas de Oliveira Netto (*in memoriam*), pelos valores ensinados no qual carregou comigo. Suas palavras e ensinamentos conduziram meus passos até aqui.

A prof^a Mirna Bainy Leal, pela atenção, disponibilidade e presença constante, não somente no decorrer deste trabalho, mas ao longo da vida acadêmica. Literalmente, abriu as portas na iniciação científica, e a partir disso contribuiu muito para meu crescimento, não somente no âmbito profissional, mas também pessoal, agradeço por muito agregar nessa etapa.

A vocês, dedico com amor.

“Não é a força, mas a constância dos bons resultados que conduz os homens à felicidade.”

Friedrich Nietzsche

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram diretamente ou indiretamente pela conclusão desta etapa, em especial:

- aos meus pais, Zelly Beatriz Dória Lucas de Oliveira e Yamil Alcibíades Salomón Rodriguez, pelo apoio e incentivo em toda minha trajetória acadêmica, vocês sempre foram meus maiores exemplos e determinação nessa vida;
- aos meus avós Ruth Dória Lucas de Oliveira e Antônio Lucas de Oliveira Netto (*in memorian*), pelas palavras de incentivo, carinho e otimismo ao longo da minha vida, jamais saberei retribuir tudo o que já fizeram por mim;
- aos meus irmãos, Said Lucas de Oliveira Salomón, e em especial ao Yamil Lucas de Oliveira Salomón, pela paciência e por contribuir com sua experiência e ajuda durante a escrita deste trabalho;
- a minha orientadora Mirna Bainy Leal, pela oportunidade de aprendizado na minha formação científica e pela confiança depositada, minha gratidão eterna;
- a Ana Olivia Laurentino, pelo suporte e toda atenção que teve durante este trabalho, alguém muito agradável em se trabalhar, grata pela paciência e ensinamentos;
- a todo corpo docente da Faculdade de Farmácia, por além de proporcionarem conhecimento, estimularam pensamento crítico no processo de formação profissional;
- as amigas de longa data, Anahy, Gabriela, Betty, Camila (*in memorian*), Lili, Ana, Dani, Carol e Dé, que souberam compreender minha ausência pelo tempo dedicado aos estudos, ao longo da jornada acadêmica, no qual sempre me apoiaram, vocês foram imensamente importantes nesta etapa e na vida;
- as colegas de faculdade, que se tornaram grandes amigas, Ana Júlia, Bárbara, Amanda, Carol, Bruna, Mel, Thaís e Sílvia, obrigada pelo apoio incondicional em todos os sentidos, esse período tornou-se mais fácil com vocês ao meu lado;
- ao meu namorado, Rodrigo Israel Teixeira Fraga, pelo companheirismo, compreensão, incentivo, e principalmente pelos cafés oferecidos nas horas oportunas;
- aos meus colegas de graduação pela ajuda, sendo nos estudos, nas dicas antes das provas ou palavras de incentivo;
- aos meus familiares pelas carinhosas palavras de otimismo, em especial a minha família dominicana, que mesmo longe, sempre na torcida.
- a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo ensino público de qualidade e excelência, no qual tenho enorme orgulho.

RESUMO

A maioria das drogas ilegais comercializadas são adulteradas. Dentre essas, a cocaína é a droga recreativa mais utilizada no mundo, além de ser a que mais apresenta compostos adicionais. Uma substância farmacologicamente ativa, presente na cocaína, é o levamisol (LVS). Este medicamento é um anti-helmíntico, de uso humano e veterinário, no qual o seu mecanismo possui ação agonista no receptor nicotínico. No entanto, o uso recorrente de cocaína associada com LVS implica em complicações sistêmicas entre os usuários, sendo as manifestações clínicas mais presentes: agranulocitose, neutropenia, vasculite sistêmica, insuficiência renal e vasculite pulmonar. Dessa forma, o uso de cocaína com LVS, sendo este cada vez mais utilizado como adulterante, se torna um problema de saúde pública, causando implicações na saúde do usuário que utiliza essa combinação. O motivo da incorporação do LVS ainda é desconhecido, levando a diversas hipóteses, porém, alguns estudos demonstraram que o LVS associado a cocaína apresenta um efeito aditivo a droga, além de ser uma substância barata e de fácil acesso. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – protocolo nº 35347/2018. Objetivo do estudo foi avaliar a toxicidade aguda do LVS (12, 24 e 36 mg/kg) por via intraperitoneal em ratos Wistar, machos, através de observações comportamentais, dosagem sérica de biomarcadores renal e hepático e necropsia dos órgãos coração, rim, cérebro, baço e fígado. Os resultados demonstraram que o grupo LVS 12 mg/kg apresentou aumento significativo da epistaxe e o grupo de 24 mg/kg apresentou aumento significativo da ambulância e da ptose palpebral, em comparação com controle. Os animais tratados com LVS na dose 36 mg/kg apresentaram convulsões e 80% dos animais vieram a óbito até 15 minutos após a administração. Os animais necropsiados dos grupos controle, LVS 12 mg/kg e LVS 24 mg/kg não apresentaram alterações macroscópicas, porém os órgãos dos animais do grupo LVS 36 mg/kg indicaram alterações no coração, fígado, rim, pulmões e cérebro. Alterações hematológicas e bioquímicas no sangue não foram detectadas, entretanto foi verificado um aumento significativo da excreção de K^+ e creatinina urinária após o tratamento com 24 mg/kg de LVS, quando comparado ao grupo controle. Estes resultados permitem concluir que o LVS, especialmente na dose de 36 mg/kg, apresentou sinais comportamentais e anatomopatológicos condizentes com um quadro de toxicidade aguda.

Palavras-chave: Levamisol, Cocaína, Adulterante, Toxicidade, Aguda.

ABSTRACT

Most illegal drugs marketed are adulterated. Among these, cocaine is the most widely used recreational drug in the world, and it has the most additional compounds. A pharmacologically active substance present in cocaine is Levamisole (LVS). This medicine is an anthelmintic, for human and veterinary use, in which its mechanism has agonist action on the nicotinic receptor. However, recurrent use of cocaine associated with LVS implies systemic complications among users, the most common clinical manifestations being: agranulocytosis, neutropenia, systemic vasculitis, renal failure and pulmonary vasculitis. Thus, the use of cocaine with LVS, being increasingly used as an adulterant, becomes a public health problem, causing implications for the health of the user who uses this combination. The reason for incorporating LVS is still unknown, leading to several hypotheses, but some studies have shown that cocaine-associated LVS has a drug addictive effect, as well as being a cheap and easily accessible substance. The project was approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) - protocol n° 35347/2018. Objective to evaluate acute intraperitoneal LVS toxicity (12, 24 and 36 mg/kg) in male Wistar rats through behavioral observations, serum renal and hepatic biomarkers, and heart, kidney, brain organ necropsy. The results showed that the LVS 12 mg/kg group showed a significant increase in epistaxis and the 24 mg/kg group presented a significant increase in ambulation and eyelid ptosis compared to control. Animals treated with LVS at 36 mg/kg had convulsions and 80% of the animals died within 15 minutes of administration. The necropsied animals of the control groups, LVS 12 mg/kg and LVS 24 mg/kg showed no macroscopic alterations, but the organs of the animals of the LVS 36 mg/kg group indicated changes in the heart, liver, kidney, lungs and brain. Hematological and biochemical changes in the blood were not detected, however, a significant increase in K⁺ and urinary creatinine excretion was observed after treatment with 24 mg/kg LVS when compared to the control group. These results allow us to conclude that the LVS, especially at the dose of 36 mg/kg, presented behavioral and anatomopathological signs consistent with acute toxicity.

Keywords: Levamisol, Cocaine, Adulterant, Toxicity, Acute.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LVS - Levamisol

TGO - Transaminase glutâmico-oxalacética

TGP - Transaminase glutâmico-pirúvica

GGT - γ -glutamiltanspeptidase

LDH - Lactato desidrogenase

FAL - Fosfatase alcalina

mAlb - Microalbumina

CHCM - Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média

VCM - Volume Corpuscular Médio

HCM - Hemoglobina Corpuscular Média

RDW - *Red Cell Distribution Width* (Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos)

VPM - Volume Plaquetário Médio

PDW - Amplitude de variação do tamanho das plaquetas

K⁺ - Potássio

Na⁺ - Sódio

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sinais tóxicos observados durante seis horas após a administração aguda de levamisol	16
Tabela 2 - Massas absolutas e relativas dos órgãos coletados após administração aguda ao levamisol	17
Tabela 3 - Alterações macroscópicas dos órgãos do grupo administrado com levamisol 36 mg/Kg.....	18
Tabela 4 - Hemograma realizado após a administração aguda de levamisol.....	19
Tabela 5 - Níveis séricos dos biomarcadores de função hepática e renal dos animais tratados com levamisol	20
Tabela 6 - Biomarcadores urinários analisados após a administração aguda de levamisol	20

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO	11
2.0	OBJETIVOS	13
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	13
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3.0	METODOLOGIA.....	13
3.1.	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA.....	14
3.2.	EUTANÁSIA E ANÁLISES DOS ÓRGÃOS E DO SORO	14
3.3.	AVALIAÇÃO DE DANO RENAL PRECOCE	14
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	15
4.0	RESULTADOS E DISCUSSÕES	15
4.1.	TESTE DE OBSERVAÇÃO COMPORTAMENTAL	15
4.2.	MASSAS ABSOLUTAS E RELATIVAS DOS ÓRGÃOS	16
4.3.	ANÁLISE MACROSCÓPICAS DOS ÓRGÃOS E NECROPSIA	17
4.4.	AVALIAÇÃO DO HEMOGRAMA.....	18
4.5.	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DOS BIOMARCADORES DE FUNÇÃO HEPÁTICA E RENAL	19
4.6.	AVALIAÇÃO DOS BIOMARCADORES URINÁRIOS.....	20
5.0	CONCLUSÃO.....	21
6.0	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

1. INTRODUÇÃO

O consumo de drogas ilícitas aumentou 30% se comparado ao ano de 2009, conforme dados do Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (UNODC, 2019), tornando-se um problema de saúde pública. A cocaína é uma droga psicoestimulante que age no sistema nervoso central, inibindo os transportadores dos neurotransmissores serotonina, dopamina, noradrenalina (POPE et al., 2018; KLUDLACEK et al., 2017). A maior parte da cocaína comercializada mundialmente apresenta substâncias adicionais, denominados adulterantes, que podem também ter atividade farmacológica (SCHNEIDER; MEYS et al., 2011; KLUDLACEK et al., 2017; MALDANER, et al., 2015). Além da dependência à cocaína, o uso de adulterantes tornou-se uma ameaça adicional a saúde dos usuários.

Entre os adulterantes adicionados a cocaína, encontra-se a presença de substâncias farmacologicamente inativas, como amido e açúcares, (SCHNEIDER; MEYS, 2011; LAPACHINSKE et al., 2015), ou substâncias ativas que regularmente são detectados em amostras de cocaína, tais como a benzocaína, fenacetina, cafeína, lidocaína, levamisol, hidroxizina, procaína e diltiazem (MALDANER et al., 2015; SCHNEIDER; MEYS et al., 2011). Segundo Pope et al. (2018), agência antidrogas dos Estados Unidos da América (EUA), informou pela primeira vez, em 2003, a presença de levamisol, em amostras de cocaína. Porém, já havia relato na literatura da presença de levamisol como adulterante da cocaína desde 2001 (MONTROYA et al., 2015). Entretanto, nos últimos anos ocorreu um aumento significativo do uso do levamisol como adulterante da cocaína (LATIF; POUR-GHAZ; BERGERON, 2019; MONTROYA et al., 2015; JUANENA et al., 2017; VERONESE et al., 2016).

O levamisol é um anti-helmíntico de uso humano e veterinário (CHUNG et al., 2011), e pertencente à classe dos derivados do imidazotiazol, (GUPTA, 2016). Atua como agonista do receptor nicotínico de acetilcolina (BRUNT et.al., 2017), apresentando como mecanismo de ação o estímulo de espasmos musculares e, consequentemente, paralisia nos parasitas.

Ele foi sintetizado na década de 60, porém, em meados da década de 70, foi descoberto que também possuía propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias (MONTROYA et al., 2015; NOLAN; JEN, 2015). Além disso, foi utilizado no tratamento de doenças autoimunes como artrite reumatóide, artrite reumatóide juvenil, síndrome nefrótica, doença de Crohn e vitiligo e é adicionado a terapia primária com 5-

fluorouracil como recurso terapêutico do câncer de cólon, mama e pulmão (MONTROYA et al., 2015; BUCHANAN et al., 2010; MARQUEZ et al., 2017). Estudos afirmam que os relatos de efeitos adversos não são frequentes, por outro lado, ele foi proibido para uso humano nos EUA e Canadá, pelos efeitos adversos observados com o seu uso (BRUNT et al., 2017; CASALE et al., 2012).

Embora haja especulações sobre a utilização desse agente farmacologicamente ativo como adulterante, presume-se uma ampla variação de justificativas, sendo elas:

- a) Se apresentar como um pó branco e por ser amplamente disponível e barato, possibilitando o aumento de volume, visando fins lucrativos (BRUNT et al., 2017; TALLARIDA et al., 2015);
- b) Potencializar os efeitos da cocaína, pois especula-se que possa potencializar efeitos eufóricos quando associado a cocaína por aumentar os níveis de dopamina no sistema nervoso central (ZHU et al., 2009, TALLARIDA et al., 2015) ;
- c) Possuir um metabólito ativo, o aminorex, que apresenta efeitos semelhantes a anfetamina atuando nos transportadores de monoaminas (NOLAN; JEN, 2015; MARQUEZ et al., 2017; ZHU et al., 2009; HOFFMAIER et al., 2013, LAPACHISKE et al., 2015).

Estudos conduzidos por Hoffmaier et al. (2013) e Kludlacek et al. (2017) , atribuíram o uso do levamisol como adulterante da cocaína às suas propriedades farmacológicas. Contudo, desde 2010 existem relatos de complicações clínicas de usuários de cocaína associado a levamisol (BRUNT et al., 2017). Sendo o levamisol um dos adulterantes mais frequentes da cocaína, torna-se relevante compreender os riscos específicos que a cocaína adulterada com levamisol proporciona nos usuários. O número de relatos de casos publicados demonstrando manifestações clínicas tais como: insuficiência renal grave, neutropenia, agranulocitose, vasculite sistêmica e casos fatais de vasculite pulmonar em usuários de cocaína associada ao levamisol (NOLAN; JEN, 2015; MARQUEZ et al., 2017; BRUNT et al., 2017; VERONESE et al., 2016; KARCH et al., 2014, MONTROYA et al., 2015; JUANENA et al., 2017; PELLEGRINI et al., 2013) reforçam a idéia que está emergindo um problema de saúde pública. Assim, torna-se necessário o estudo para a compreensão de possíveis complicações a longo prazo induzidas pelo levamisol associado a cocaína, embora ainda não haja conhecimento sobre o mecanismo destes efeitos (NOLAN; JEN, 2015). Nesse sentido,

torna-se necessário realizar estudos que avaliem também a toxicidade do levamisol isolado.

2.OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a toxicidade aguda do levamisol em ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o hemograma e biomarcadores de função hepática e renal: transaminases (TGO e TGP), γ -glutamyltranspeptidase (GGT), ureia, creatinina, lactato desidrogenase (LDH), fosfatase alcalina (FAL) no soro de ratos após tratamento agudo com levamisol;
- Investigar biomarcadores urinários precoces de dano renal, como atividade da microalbumina, creatinina, sódio e potássio na urina de ratos após tratamento agudo com levamisol.

3.METODOLOGIA

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS sob o protocolo nº 35347/2018.

Animais: Foram utilizados 20 ratos *Wistar*, machos, adultos (60 dias), provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da UFRGS (CREAL-UFRGS). Antes de se iniciar os experimentos os animais foram adaptados por 15 dias no biotério do CREAL – UFRGS, mantidos em caixas de polipropileno (41 x 34 x 16 cm) (3-4 ratos por caixa) com livre acesso a água e alimento em ciclos de claro/escuro de 12h (7 – 19h), em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade monitorada.

Tratamentos: O protocolo usado foi baseado no teste de toxicidade aguda de dose fixa – *Organization for Economic Cooperation & Development* (OECD 420). As doses de levamisol (Noxon®) foram definidas através de cálculo relativo às doses usuais consumidas e com base nos estudos de Tallarida et al. (2015), Moretti et al. (2016) e

Fiorentin et al. (2018). Os animais foram tratados com salina (grupo controle), levamisol 12 mg/kg, 24 mg/kg e 36 mg/kg por via intraperitoneal (ip) e as drogas foram diluídas em solução salina. Os grupos contaram com 5 animais/grupo conforme indicado no protocolo OECD 420.

3.1 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA

Nos ensaios de toxicidade aguda foram observados comportamentos indicativos de atividade depressora, estimulante do SNC e manifestações autonômicas. Para tal, cada animal foi observado durante 1 minuto nos períodos de 0, 15, 30, 60, 120, 240, 360 min e 24 horas após a administração dos tratamentos. Os sinais indicativos de toxicidade analisados foram: alteração da locomoção, reação a estímulos, piloereção, diarreia, sialorreia, tremor, ptose, alteração do tônus muscular, hipnose, convulsões e contorções abdominais. A letalidade foi observada durante as primeiras 24 h.

3.2 EUTANÁSIA E ANÁLISES DOS ÓRGÃOS E DO SORO

Vinte quatro horas após a administração dos tratamentos todos os animais sobreviventes foram anestesiados por via ip. com a associação de tiopental (100 mg/kg) e lidocaína (10 mg/ml), eutanasiados e necropsiados. Para tanto, os procedimentos foram realizados em ambiente propício, sem a presença de outros animais (vivos ou mortos), com a contensão usual, por profissional treinado e de forma rápida, conforme as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, 2013 (CONCEA).

Os órgãos (fígado, rins, coração, baço e cérebro) foram removidos para análise macroscópica, pesados e o sangue foi coletado através de veia cava e aliqüotado em dois tubos, um sem anticoagulante e outro com EDTA. O tubo sem anticoagulante foi centrifugado para obtenção do soro, sendo analisados os seguintes marcadores: transaminases (TGO e TGP), γ -glutamiltanspeptidase (GGT), ureia, creatinina, lactato desidrogenase (LDH), fosfatase alcalina (FAL) através de equipamento automatizado (Mindray® BS-120), utilizando kits comerciais (BioClin).

3.3 AVALIAÇÃO DE DANO RENAL PRECOCE

A urina foi obtida por punção da bexiga sob anestesia e a nefrotoxicidade foi avaliada através da medida da atividade da microalbumina, creatinina, sódio e potássio

urinário quantificadas através do equipamento automatizado (Mindray[®], BS-120) utilizando kits comerciais (BioClin[®]).

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados paramétricos com distribuição normal foram apresentados como média \pm EPM e a análise estatística foi realizada por ANOVA de medidas repetidas ou de uma via. Os dados qualitativos e/ou os que não apresentarem distribuição normal foram apresentados como mediana e quartis e avaliados pelo teste *Mann Whitney*.

4.RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 TESTE DE OBSERVAÇÃO COMPORTAMENTAL

Na Tabela 1 estão demonstrados os sinais de toxicidade observados durante seis horas após a administração de levamisol. Os animais do grupo LVS de 12 mg/kg apresentaram maior frequência de epistaxe quando comparados com o grupo controle. Este efeito pode estar relacionado com a ativação dos receptores nicotínicos exercidos pelo LVS. Neste caso, pode ter ocorrido uma superestimulação destes receptores os quais, segundo alguns autores pode levar a um quadro de hipertensão quando estimulados, haja visto que a presença de epistaxe é comum em quadros hipertensivos (SARHAN; ALGAMAL, 2015; MIN et al., 2017).

O grupo de LVS 24 mg/kg apresentou aumento na ambulação e maior presença de ptose palpebral quando comparado ao grupo controle. O aumento na ambulação indica que o LVS pode ter causado um efeito estimulante no SNC durante os primeiros 15 minutos de observação e que este fato pode ter relação com descrito por Brunt et al. (2017) e Spector et al. (1998), onde os autores afirmam que o LVS pode alterar o metabolismo das monoaminas e induzir a liberação ativa de dopamina em algumas áreas cerebrais. Já a ptose palpebral, ocorrida no intervalo de tempo posterior ao aumento da ambulação, é um sinal indicativo de atividade depressora do SNC, o que pode indicar que, após a superestimulação inicial dos receptores, pode ter ocorrido um quadro de fadiga sináptica (BOWERS; SCHIMIDT, 1992).

Os animais que receberam a maior dose, LVS 36 mg/kg, apresentaram diminuição de movimentos de auto-limpeza quando comparado com o grupo controle além de convulsão e morte em alguns animais quando comparado a todos os demais grupos. O qual permite concluir que a diminuição dos movimentos de auto-limpeza tenha ocorrido

devido ao fato de os animais logo após a administração do LVS já terem apresentado episódios de convulsão, sem pausas, até o momento do óbito. As convulsões, por outro lado, são sinais característicos de estimulação do SNC e acredita-se que, mais especificamente, isto tenha ocorrido devido a uma superestimulação colinérgica que, segundo alguns autores, pode causar convulsões, hipertensão e taquicardia, e, em casos mais graves, lesões neurológicas que poderiam estar relacionadas com a causa do óbito (BRUNT et al., 2017).

Tabela 1. Sinais tóxicos observados durante seis horas após a administração aguda de levamisol (LVS).

Sinais tóxicos (intervalo de ocorrência)	Grupos (% de presença do sinal observado)			
	Controle	LVS 12mg/kg	LVS 24mg/kg	LVS 36mg/kg
Aumento da ambulação (min)	0 (0-360)	40 (0-15)	80* (0-15)	60 (0-15)
Rearing (min)	100 (0-30)	100 (0-240)	100 (0-15)	100 (0-15)
Grooming (min)	80 (0-240)	60 (120-360)	80 (0-360)	0* (0-360)
Vocalização (min)	0 (0-360)	0 (0-360)	0 (0-360)	20 (0-30)
Diminuição da ambulação (min)	80 (240-360)	100 (15-360)	100 (15-360)	20 (15-360)
Tremor (min)	0 (0-360)	40 (120-360)	60 (60-240)	0 (0-360)
Ptose palpebral (min)	0 (0-360)	60 (15-120)	80* (15-240)	20 (15-120)
Piloereção (min)	0 (0-360)	60 (60-360)	40 (120-360)	20 (15-360)
Convulsão (min)	0 (0-360)	0 (0-360)	0 (0-360)	100** (0-15)
Epistaxe (min)	0 (0-360)	80* (60-240)	40 (60-360)	20 (240-360)
Dispneia (min)	0 (0-360)	0 (0-360)	40 (30-120)	20 (30-60)
Morte (min)	0 (0-360)	0 (0-360)	0 (0-360)	80** (0-15)

*Diferença significativa quando comparado ao grupo controle (P<0,05) (Teste exato de Fisher).

** Diferença significativa entre o grupo LVS 36mg/kg e todos os outros grupos (P<0,05) (Teste exato de Fisher).

4.2 MASSAS ABSOLUTAS E RELATIVAS DOS ÓRGÃOS

Não houve alteração significativa entre as massas relativas dos órgãos entre os grupos (Tabela 2), indicando que a administração aguda de levamisol nas doses utilizadas não é capaz de causar alterações macroscópicas nos órgãos. Contudo, acredita-se que a combinação de cocaína e levamisol possam causar alterações, como

aumento da massa dos órgãos, conforme relatado na revisão feita por Sólomon, Hayes (2017), onde os autores descrevem vários casos fatais de usuários de cocaína e levamisol que apresentavam aumento de coração e congestão dos órgãos.

Tabela 2: Massas absolutas e relativas dos órgãos coletados após a administração aguda ao levamisol (LVS).

Grupos	Massa corporal (g)	Massa do coração		Massa do fígado		Massa dos rins		Massa do baço	
		Absoluto (g)	Relativo (g/100g)	Absoluto (g)	Relativo (g/100g)	Absoluto (g)	Relativo (g/100g)	Absoluto (g)	Relativo (g/100g)
		Controle	365,60 ± 21,70	1,30 ± 0,26	0,35 ± 0,05	13,04 ± 1,59	3,56 ± 0,36	2,74 ± 0,24	0,75 ± 0,05
LVS 12mg/kg	355,20 ± 14,24	1,16 ± 0,08	0,33 ± 0,03	13,11 ± 0,66	3,70 ± 0,23	2,64 ± 0,21	0,74 ± 0,04	0,94 ± 0,06	0,27 ± 0,02
LVS 24mg/kg	360,0 ± 27,30	1,16 ± 0,17	0,32 ± 0,03	12,94 ± 1,97	3,59 ± 0,24	2,62 ± 0,21	0,73 ± 0,04	0,91 ± 0,11	0,25 ± 0,04
LVS 36mg/kg	370,0*	1,17*	0,32*	14,09*	3,81*	2,67*	0,72*	1,07*	0,29*

Dados expressos em média ± erro padrão.

*Massa dos órgãos somente do animal sobrevivente do grupo LVS 36mg/kg.

4.3 ANÁLISE MACROSCÓPICA DOS ÓRGÃOS E NECROPSIA

As necropsias dos animais dos grupos Controle, LVS 12mg/kg e LVS 24mg/kg não apresentaram alterações a nível macroscópico. Conforme apresentado na Tabela 1, 100% dos animais do grupo LVS 36 mg/kg apresentaram convulsões até 15 minutos após a administração de levamisol. Na Tabela 3 estão relatadas algumas alterações macroscópicas observadas nos órgãos dos animais do grupo LVS 36 mg/kg. Estes dados sugerem que o levamisol na dose de 36 mg/kg foi capaz de causar alterações macroscópicas dos órgãos quando comparado aos outros grupos. Estes resultados estão em consonância com o descrito por Sólomon, Hayes (2017) que afirmam que em alguns casos de óbito de usuários de cocaína e levamisol há aumento de órgãos vitais, como coração e presença de congestão, sendo que, os autores sugerem que o levamisol pode atuar piorando os efeitos negativos da cocaína sobre os órgãos. Apenas um animal sobreviveu a dose de LVS 36 mg/kg e os resultados macroscópicos estão descritos na Tabela 3.

Dos animais que vieram a óbito após a administração com levamisol 36 mg/Kg, seus órgãos foram analisados por uma médica veterinária, onde observou macroscopicamente cada órgão, constatando alterações. Alguns animais apresentavam coração, fígado e rim congesto e/ou aumento do tamanho, hemorragia cerebral e pulmonar e alguns animais alterações na bolsa escrotal.

Tabela 3. Alterações macroscópicas dos órgãos do grupo administrado com levamisol 36 mg/Kg.

Órgão/ Animal	Coração	Fígado	Rim	Pulmões	Cérebro	Bolsa Escrotal
1	Congesto (aumento de volume e aumento do átrio);	Congesto;	Congesto e aumento de tamanho;	Hemorragia;	Hemorragia;	Sem alterações;
2	Congesto;	Congesto;	Congestos;			
3	Congesto (aumento de volume e aumento do átrio);	Congesto;	Congesto;	Hemorragia pulmonar;	Hemorragia;	Isquemia;
4	Congesto (aumento de volume e aumento do átrio);	Congesto;	Congesto e aumento do tamanho;	Hemorragia;	Hemorragia;	Isquemia aguda;
5	Congesto e aumento de volume;	Congesto;	Congesto e aumento de tamanho;	Hemorragia;	Hemorragia;	Sem alterações;

4.4 AVALIAÇÃO DO HEMOGRAMA

Não ocorreram alterações significativas entre os grupos quanto ao eritrograma, leucograma e plaquetograma (Tabela 4). Estes dados permitem inferir que a administração aguda de levamisol não é capaz de causar alterações hematológicas nas doses utilizadas. Todavia, segundo Brunt et al. (2017) há vários casos de alterações hematológicas, tais como: neutropenia e agranulocitose, em usuários crônicos de cocaína com levamisol, sugerindo que a associação dos compostos e a exposição mais prolongada à ambos possa causar as manifestações comumente descritas na literatura (KUDLACEK et al., 2017).

Tabela 4: Hemograma realizado após a administração aguda de levamisol (LVS).

Grupos	Controle	LVS 12mg/kg	LVS 24mg/kg	LVS 36mg/kg
<i>Eritrograma</i>				
Eritrócitos ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	7.99 \pm 0.10	7.48 \pm 0.20	7.97 \pm 0.23	8.03
Hemoglobina (g/dL)	15.32 \pm 0.22	14.74 \pm 0.36	15.62 \pm 0.42	16.00

Hematócrito (%)	43.92 ± 0.61	42.26 ± 0.83	44.58 ± 0.99	45.10
VCM (fL)	54.67 ± 0.33	56.40 ± 0.81	57.50 ± 1.50	**
HCM (pg)	19.10 ± 0.11	19.74 ± 0.23	19.90 ± 0.60	**
CHCM (g/dL)	34.77 ± 0.09	34.92 ± 0.23	34.65 ± 0.15	**
RDW (%)	11.33 ± 0.20	11.32 ± 0.19	11.75 ± 0.25	**
RDW (µm ³)	22.33 ± 0.33	23.00 ± 0.45	24.00 ± 1.00	**
<i>Plaquetograma</i>				
Plaquetas (x10 ³ /mm ³)	786.8 ± 24.3	717.2 ± 26.3	753.6 ± 37.8	912.0
VPM (µm ³)	6.30 ± 0.06	6.34 ± 0.09	6.36 ± 0.07	6.80
Plaquetócrito (%)	0.49 ± 0.01	0.45 ± 0.01	0.48 ± 0.02	0.41
PDW (%)	8.68 ± 0.31	8.95 ± 0.16	8.82 ± 0.22	10.50
<i>Leucograma</i>				
Leucócitos (x10 ³ /mm ³)	7.02 ± 0.65	8.58 ± 0.45	8.66 ± 0.47	9.40
Neutrófilos (%)	7.90 ± 0.90	6.06 ± 0.89	12.40 ± 2.19	16.90
Linfócitos (%)	88.78 ± 1.12	91.06 ± 0.95	83.76 ± 2.72	78.60
Monócitos (%)	3.30 ± 0.37	2.84 ± 0.23	3.70 ± 0.48	4.30
Eosinófilos (%)	0.0 ± 0.0	0.04 ± 0.02	0.14 ± 0.11	0.20
Basófilos (%)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0

Dados expressos em média ± erro padrão da média.

*Somente do animal sobrevivente do grupo LVS 36mg/kg.

**Não há dados expressos na tabela devido à amostragem insuficiente (n=1).

4.5 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DOS BIOMARCADORES DE FUNÇÃO HEPÁTICA E RENAL

Não foram encontradas alterações significativas nos testes de TGO, TGP, γ-GT, Creatinina, Ureia, FAL e LDH em relação ao grupo controle (Tabela 5). Estes resultados permitem inferir que a administração aguda de levamisol nas doses indicadas não foi capaz de alterar os biomarcadores séricos analisados.

Tabela 5: Níveis séricos dos biomarcadores de função hepática e renal dos animais administrado com levamisol (LVS).

Biomarcadores séricos	Controle	LVS 12mg/kg	LVS 24mg/kg	LVS 36mg/kg
TGO/AST (U/L)	111.8 ± 9.1	88.6 ± 7.9	112.4 ± 14.6	105.0
TGP/ALT (U/L)	44.7 ± 3.8	48.2 ± 1.2	46.2 ± 2.7	59.0
γ-GT (U/L)	11.0 ± 0.3	12.6 ± 0.6	10.6 ± 1.7	14.0
Creatinina (mg/dL)	0.48 ± 0.02	0.46 ± 0.04	0.48 ± 0.04	0.50
Ureia (mg/dL)	57.0 ± 3.9	53.6 ± 4.4	49.0 ± 2.5	37.0

FAL (U/L)	124.6 ± 12.2	156.6 ± 6.9	136.6 ± 9.6	120.0
LDH (U/L)	159.4 ± 15.3	94.7 ± 5.7	166.0 ± 31.5	148.0

Dados expressos em média ± erro padrão da média.

*Somente do animal sobrevivente do grupo LVS 36mg/kg.

4.6 AVALIAÇÃO DOS BIOMARCADORES URINÁRIOS

Foi constatado um aumento significativo ($p < 0.05$, ANOVA/Bonferroni) da excreção de K^+ e creatinina urinária após a administração com 24 mg/kg de LVS comparado ao grupo controle (Tabela 6). Segundo Palmer; Clegg (2016), o aumento na excreção de K^+ é um indicativo inicial de desequilíbrio eletrolítico. Por outro lado, o aumento da excreção de creatinina pode estar associado à lesão de células musculares (BACALLAO, 2015).

O grupo de maior dose, LVS 36 mg/kg, não pode ser comparado com os demais, visto que o dado corresponde ao único animal sobrevivente do grupo.

Tabela 6: Biomarcadores urinários analisados após a administração aguda de levamisol (LVS).

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

Dados expressos em média ± erro padrão da média.

Valores somente do animal sobrevivente do grupo LVS 36mg/kg.

*Diferença significativa entre o grupo LVS 24mg/kg e o controle ($P < 0,05$) (ANOVA + post hoc Bonferroni).

5. CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que a administração aguda de levamisol em diferentes doses foi capaz de causar alterações comportamentais severas condizentes com um quadro de toxicidade aguda e que a dose de 36mg/kg foi capaz de causar convulsões e letalidade nos animais.

Quanto às análises de biomarcadores séricos de dano hepático e renal, não foram encontradas alterações significativas entre os grupos, indicando que a administração aguda de levamisol não é capaz de alterar os biomarcadores séricos analisados. Já os resultados das análises de biomarcadores urinários, observou-se um aumento da excreção de K⁺ e creatinina, o que permite sugerir que o levamisol na dose de 24mg/kg foi capaz de causar um desequilíbrio eletrolítico e um possível dano às células musculares.

Sendo assim, os resultados mostram que os efeitos mais prejudiciais da administração aguda ao levamisol foram observados na dose de 36mg/kg. Todavia, sugere-se a realização de mais estudos para verificar os efeitos da administração subcrônica e crônica ao levamisol e para verificar se os efeitos encontrados neste trabalho podem ser acentuados ou não pela combinação com cocaína.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

1- BACALLAO, R. M.; La creatinina como indicador Del tejido muscular esquelético y el estado nutricional. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, v. 25, pag. 4-23, Havana, 2015.

- 2- BOWERS, C. W.; SCHMIDT, C. J. Mechanisms of synaptic fatigue in a developing autonomic ganglion. *Developmental Biology*, v. 154, nº 2, p.410-418, dez. 1992.
- 3- BRUNT, T. M.; VAN-DEN, J.B.; PENNING, E.; VENHUIS, B.. Adverse effects of levamisole in cocaine users: a review and risk assessment. *Archives of toxicology*, v. 91, nº. 6, p. 2303-2313, 2017.
- 4- BUCHANAN, J A.; BUCHANAN, J.A.; OYER, R.J.; PATEL, N.R.; JACQUET, G.A.; BORNKOVA, L., THIENELT, C.; SHRIVER, D.A.; SHOCKLEY, L.W.; WILSON, M.L.; HURLBULT, K.M.; LAYONAS, E.J.. A confirmed case of agranulocytosis after use of cocaine contaminated with levamisole. *Journal of Medical Toxicology*, v. 6, nº. 2, p. 160-164, 2010.
- 5- CASALE, J. F.; COLLEY, V. L.; LEGATT, D. 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, nº. 2, p. 130-135, 2012.
- 6- CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. Disponível em: <<https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/arquivos/legislacao/228432.pdf>>. Acesso em: 17 set. 2019.
- 7- CHUNG, C.; TUMEH, P.C.; BIRNBAUN, R.; TAN B.H.; SHARP L.; McCOY E.; MERCURIO, M.G., CRAFT, N..Characteristic purpura of the ears, vasculitis, and neutropeniae—a potential public health epidemic associated with levamisole-adulterated cocaine. *J Am Acad Dermatol*, v. 65, nº4, p. 722–725, 2011.
- 8- FIORENTIN, T.R.; FOGARTY, M.; LIMBERGER, R.P.; LOGAN, B.K.. 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, fev. 2019.
- 9- GUPTA, M.. A multi-faceted drug in dermatology: A multi-faceted drug in dermatology. *Indian Journal Of Dermatology, Venereology, And Leprology*, v. 82, nº. 2, p. 82-230, 2016.
- 10- HOFMAIER, T.; LUF, A.; SEDDIK, A.; STOCKER, T.; HOLY, M.; FREISSMUTH, M.; ECKER, G.F.; SCHMID, R., SITTE, H.H.; KUDLACEK, O.. Aminorex, a metabolite of the cocaine adulterant levamisole, exerts amphetamine like actions at monoamine transporters. *Neurochemistry International*, v. 73, p. 32-41, jul. 2014.
- 11- JUAJENA, C.; CAPPELETTI, F.; PASCALE, A.; NEGRIN, A.; DURANTE, S.; GRACIANO, R.; ROCHA, A.. Cocaína adulterada con levamisol: reporte de três casos clínicos. *Rev Méd Urug*, Montevideo, v.33, nº2, p.139-158, 2017.
- 12- KARCH, S. B., DEFRAIA, B.; MESSERINI, L.; MARI, F., VAIANA, F., BERTOL, E.. Aminorex associated with possible idiopathic pulmonary hypertension in a cocaine user. *Forensic science international*, v. 240, p. e7-e10, 2014.

- 13- KUDLACEK, O.; HOFMAIER, T.; LUF, A.; MAYER, F.P.; STOCKNER, T.; NAGY,C.; HOLY, M.; FREISSMUTH, M.; SCHMID, R.; SITTE, H.H.. Cocaine adulteration. *Journal Of Chemical Neuroanatomy*, v. 83-84, p.75-81, out. 2017.
- 14- LAPACHINSKE, S.F.; OKAI, G.G.; DOS SANTOS, A.; DE BAIROS, A.V.; YONAMINE, M.. Analysis of cocaine and its adulterants in drugs for international trafficking seized by the Brazilian Federal Police. *Forensic Sci Int*, v. 247, p. 48-53, 2015.
- 15- LATIF, Z.; POUR-GHAZ, I.; BERGERON, J.B., Levamisole-induced Vasculitis in a Hepatitis C Patient: *A General Medicine Ward Perspective on Diagnosis and Management. Cureus* ,v.11, p. 5196-5198, 2019.
- 16- MALDANER, A.O; BOTELHO, E.D. ; ZACCA, J.J.; CAMARGO, M.A.; BRAGA, J.W.; GROBÉRIO, T.S. .Brazilian Federal District Cocaine Chemical Profiling - Mass Balance Approach and New Adulterant Routinely Quantified (Aminopyrine). *J. Braz. Chem. Soc.* v.26, nº.6, p. 1227-1231, São Paulo, 2015.
- 17- MARQUEZ, J.; AGUIRRE, L.; MUÑOZ, C.; ECHEVERRI, A.; RESTREPO, M.; PINTO, L.F.. Cocaine-Levamisole-Induced Vasculitis/Vasculopathy syndrome. *Current rheumatology reports*, vol. 19, nº 6, p. 36, 2017.
- 18- MIN, H.J.; KANG, H.; CHOI, G.J.; KIM, K.S.. Association between Hypertension and Epistaxis: Systematic Review and Meta-analysis. *Otolaryngology-head And Neck Surgery*, v. 157, nº. 6, p. 921-927, 25 jul. 2017.
- 19- MONTOYA J.G.; MEJÍA, M.C.B, ESCOBAR, M.C.V.. 3 cases of cocaine - levamisole syndrome in Medellín. *CES Medicina*, v.29, nº2, 2015.
- 20- MORETTI, E.G.; YUJRA, V.Q.; CLAUDIO, S.R.; SILVA, M.J.; VILEGAS, W.; PEREIRA, C.D.; OLIVEIRA, F.; RIBEIRO, D.A.. Acute crack cocaine exposure induces genetic damage in multiple organs of rats. *Environmental Science And Pollution Research*, v. 23, nº 8, p.8104-8112, 29 jan. 2016.
- 21- NOLAN, A.; JEN, K.-Y. Pathologic manifestations of levamisole-adulterated cocaine exposure. *Diagn Pathol*, v.10, p.1-6, 2015.
- 22- OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. Disponível em: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd_gl420.pdf>. Acesso em: 28 out. 2019.
- 23- PALMER, B.F.; CLEGG, D.J..Physiology and pathophysiology of potassium homeostasis. *Advances In Physiology Education*, v. 40, nº 4, p. 480-490, dez. 2016.
- 24- PANDOLFO, P.; MACHADO, N.J.; KOFALVI, A.; TAKAHASHI, R.N.; CUNHA, R.A. Caffeine regulates frontocorticostratial dopamine transporter density and improves attention and cognitive deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder. *Eur Neuropsychopharmacol*,v. 23, p. 317-328, 2013.

- 25- PELLEGRINI, D.; YOUNG P.; GROSSO, V.; MASSA, M.; BRUETMAN, J.E. . Agranulocitosis por levamisol asociado a cocaína. *Medicina (B. Aires)*, v.73, nº5, 464-466, Buenos Aires, 2013.
- 26- POPE, J. D.; DRUMMER, O. H.; SCHNEIDER, H. G. The cocaine cutting agent levamisole is frequently detected in cocaine users. *Pathology*, v.50, nº5 p.536-539, 2018.
- 27- SARHAN, N.A.; ALGAMAL, M.A.. Relationship between epistaxis and hypertension: A cause and effect or coincidence. *J Saudi Heart Assoc*, v. 27, nº2, p. 79–84, 2015.
- 28- SOLOMON, N.; HAYEES, J. . Levamisole: A High Performance Cutting Agent. *Acad Forensic Pathol.*, v.7, nº3, p.469-476, 2015.
- 29- SCHNEIDER, S.; MEYS, F. Analysis of illicit cocaine and heroin samples seized in Luxembourg from 2005 to 2010. *Forensic Sci. Int.*, v.212, p. 242-246, 2011.
- 30- SPECTOR, S., MUNJAL, I., SCHMIDT, D. E. Effects of the immunostimulant, levamisole, on opiate withdrawal and levels of endogenous opiate alkaloids and monoamine neurotransmitters in rat brain. *Neuropsychopharmacology*, v.19, p. 417–427, 1998.
- 31- TALLARIDA, C. S.; TALLARIDA, R. J.; RAWLS, S. M. Levamisole enhances the rewarding and locomotor-activating effects of cocaine in rats. *Drug and alcohol dependence*, v. 149, p. 145-150, 2015.
- 32- UNODC 2019. unodc.org: Disponível em: < <https://www.unodc.org/>> Acesso em: 20 de outubro. de 2019.
- 33- VERONESE, F.V.; DODE, R.S.; FRIDERICHS, M.; THOMÉ, G.G.; DA SILVA, D.R.; SCHAEFER, P.G.; SEBEN, V.C.; NICOLELLA, A.R.; BARROS, E.J. Cocaine/levamisole-induced systemic vasculitis with retiform purpura and pauci-immune glomerulonephritis. *Braz J Med Biol Res*, v. 49, p. 1-6, 2016.
- 34- ZHU,N.Y.; LEGATT ,D.F.; TURNER, A.R. Agranulocytosis after consumption of cocaine adulterated with levamisole. *Ann Intern Med.*, v.150 nº4 p. 287-289, 2009.