

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA**

**TIRZAH BERNI DE SOUZA**

**Levamisol, um adulterante da cocaína, altera os níveis de neurotransmissores no córtex pré-frontal e estriado de ratos *Wistar* após a exposição aguda.**

**PORTO ALEGRE**

**2022**

**TIRZAH BERNI DE SOUZA**

**Levamisol, um adulterante da cocaína, altera os níveis de neurotransmissores no córtex pré-frontal e estriado de ratos *Wistar* após a exposição aguda.**

**Trabalho de Conclusão apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do título de grau de Farmacêutico.**

**Orientadora: Profa. Dra. Mirna Bainy Leal**

**Porto Alegre**

**2022**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, fonte de toda sabedoria e conhecimento, a Jesus Cristo, autor e consumidor da minha fé, e ao Espírito Santo, meu consolador.

Agradeço ao meu marido e ao Pracinho, por todo o suporte e amor nesta caminhada.

Agradeço ao meu pai (*in Memoriam*) a minha mãe, a minha irmã, a minha madrinha e ao Nino, por todo incentivo e pela fé em meu potencial.

Agraço aos meus sogros, cunhados e sobrinhos por torcerem tanto por mim e por todo carinho que me dedicam.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Mirna Bainy Leal e a Prof. Ma. Ana Olívia Martins Laurentino, pela confiança, acolhimento e tempo dedicado, sem vocês este trabalho não seria possível.

Agradeço a Profa. Dra Sarah Carobini Werner de Souza Eller Franco de Oliveira do Departamento de Farmacociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) pela análise dos neurotransmissores.

Agradeço a todos os alunos e professores da faculdade de Farmácia pelo empenho e dedicação em fazer da instituição um lugar melhor.

Agradeço a COMGRAD-FAR, cujos profissionais são tão atenciosos e solícitos que tornam a nossa trajetória mais leve.

E por fim agradeço a todas as pessoas não mencionadas aqui, mas que contribuíram para que este trabalho acontecesse.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Níveis de DA no córtex pré-frontal de ratos tratados 24h antes com LVS 12, 24 e 36 mg/kg comparados com o controle (salina).....	17
Figura 2: Níveis de GABA no córtex pré-frontal de ratos tratados 24h antes com LVS 12, 24 e 36 mg/kg comparados com o controle (salina).....	18
Figura 3: Níveis de ACh no córtex pré-frontal de ratos tratados 24h antes com LVS 12, 24 e 36 mg/kg comparados com o controle (salina).....	18
Figura 4: Níveis de GLU no córtex pré-frontal de ratos tratados 24h antes com LVS 12, 24 e 36 mg/kg comparados com o controle (salina).....	19
Figura 5: Níveis de 5-HT no córtex pré-frontal de ratos tratados 24h antes com LVS 12, 24 e 36 mg/kg comparados com o controle (salina).....	19
Figura 6: Níveis de DA no estriado de ratos tratados 24h antes com LVS 12, 24 e 36 mg/kg comparados com o controle (salina).....	20
Figura 7: Níveis de GABA no estriado de ratos tratados 24h antes com LVS 12, 24 e 36 mg/kg comparados com o controle (salina).....	20
Figura 8: Níveis de ACh no estriado de ratos tratados 24h antes com LVS 12, 24 e 36 mg/kg comparados com o controle (salina).....	21
Figura 9: Níveis de GLU no estriado de ratos tratados 24h antes com LVS 12, 24 e 36 mg/kg comparados com o controle (salina).....	21
Figura 10: Níveis de 5-HT no estriado de ratos tratados 24h antes com LVS 12, 24 e 36 mg/kg comparados com o controle (salina).....	22

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 5-HIAA- Ácido 5- hidroxindolacético (do inglês: *5-Hydroxyindoleacetic acid*)
- 5-HT- Serotonina
- ACh- Acetilcolina
- DA- Dopamina
- DAT- Transportador de dopamina (do inglês: *Dopamine transporter*)
- DOPAC- Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético (do inglês: *3,4-Dihydroxyphenylacetic acid*)
- GABA- ácido gama-aminobutírico (do inglês: *Gamma-AminoButyric Acid*)
- GLU- glutamato
- HVA- ácido homovalínico (do inglês: *homovanillic acid*)
- I.P- intraperitonal
- LVS- Levamisol
- MHPG- 3-Metoxi-4-hidroxifenilglicol (do inglês: *3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol*)
- NA- Noradrenalina
- NET- Transportador de norepinefrina (do inglês: *Norepinephrine transporter*)
- NT-Neurotransmissor/es
- OECD- Organização para a cooperação e desenvolvimento econômico (do inglês: *Organization for Economic Co-operation and Development*)
- OMS-Organização Mundial da Saúde
- SERT- Transportador de serotonina (do inglês: *Serotonin transporter*)
- SNC-Sistema Nervoso Central
- SNP- Sistema Nervoso Periférico
- UNODC- do inglês, *United Nations Office on Drugs and Crime*

## RESUMO

Cerca de 21 milhões de pessoas usaram cocaína no ano de 2020, representando 0,4% da população mundial de 15 a 64 anos. Além da dependência à cocaína, o uso de adulterantes tornou-se uma ameaça adicional à saúde dos usuários. Desde o início dos anos 2000, o levamisol (LVS) tem sido frequentemente usado como agente adulterante em drogas ilícitas, sendo detectado em até 79% da cocaína apreendida nas ruas. Algumas hipóteses tem sido levantadas para a utilização deste fármaco como adulterante, além de sua semelhança física com a cocaína, o seu efeito no sistema nervoso central (SNC) particularmente na liberação de monoaminas e pelo maior tempo de meia-vida dos seus metabólitos, potencializando assim os efeitos da cocaína e prolongando a experiência com a droga. Os perigos da associação entre cocaína e LVS começaram a vir à tona a partir do ano de 2009, quando se iniciaram os relatos de caso das complicações clínicas decorrentes desta combinação, caracterizando-a como um problema de saúde pública. Dentre os achados clínicos mais citados estão àqueles relacionados a reações hematológicas, neurológicas, circulatórias, dérmicas, pulmonares e renais. A fim de contribuir com a elucidação dos prejuízos decorrentes do uso associado da cocaína e LVS o presente trabalho irá apresentar e discutir as dosagens dos neurotransmissores (NT) dopamina (DA), serotonina (5-HT), ácido gama-aminobutírico (GABA), acetilcolina (ACh) e glutamato (GLU) em córtex pré-frontal e estriado de ratos após a exposição aguda ao LVS. Para isto foram utilizados 20 ratos Wistar adultos (machos) divididos em 4 grupos: grupo salina (controle), LVS 12 mg/kg, LVS 24 mg/kg e LVS 36 mg/kg. Vinte e quatro horas após a administração os animais foram eutanasiados e o córtex pré-frontal e estriado, foram dissecadas para análises por Cromatografia líquida/espectrometria de massa em tandem (projeto aprovado no CEUA/UFRGS nº 34357). Os resultados mostraram que houve aumento (ANOVA/Bonferroni) nos níveis de dopamina (DA) do córtex pré-frontal no grupo LVS 12 mg/Kg (\*= $p < 0,05$ ) e no estriado dos grupos LVS 24 mg/Kg (\*= $p < 0,05$ ) e LVS 36 mg/Kg (\*\*= $p < 0,001$ ), entretanto não foram observadas alterações significativas nos níveis de 5-HT, GABA, ACh e GLU nestas estruturas. Mais estudos necessitam ser realizados a fim de uma melhor compreensão sobre o aumento de dopamina no córtex pré-frontal e estriado e as relações comportamentais observadas. Apesar disto, considera-se uma importante contribuição para que futuros estudos possam ser realizados a fim de esclarecer os efeitos de LVS no SNC e se estes podem ser reforçados pela associação de LVS com a cocaína.

**Palavras-chave:** levamisol, neurotransmissores, cocaína.

## ABSTRACT

About 21 million people used cocaine in the year 2020, representing 0.4% of the world's population aged 15-64. In addition to cocaine addiction, the use of adulterants has become an additional threat to users' health. Since the early 2000s, levamisole (LVS) has been frequently used as an adulterating agent in illicit drugs, being detected in up to 79% of cocaine seized on the street. Some hypotheses have been raised for the use of this drug as an adulterant, in addition to its physical similarity to cocaine, its effect on the central nervous system (CNS) particularly in the release of monoamines and the longer half-life of its metabolites, potentiating thus the effects of cocaine and prolonging the experience with the drug. The dangers of the association between cocaine and LVS began to emerge in 2009, when case reports of clinical complications resulting from this combination began, characterizing it as a public health problem. Among the most cited clinical findings are those related to hematological, neurological, circulatory, dermal, pulmonary and renal reactions. In order to contribute to the elucidation of the damages resulting from the associated use of cocaine and LVS, the present work will present and discuss the dosages of the neurotransmitters (NT) dopamine (DA), serotonin (5-HT), gamma-aminobutyric acid (GABA), acetylcholine (ACh) and glutamate (GLU) in prefrontal cortex and striatum of rats after acute exposure to LVS. For this, 20 adult Wistar rats (male) were divided into 4 groups: saline group (control), LVS 12 mg/kg, LVS 24 mg/kg and LVS 36 mg/kg. Twenty-four hours after administration the animals were euthanized and the prefrontal cortex and striatum were dissected for analysis by liquid chromatography/tandem mass spectrometry (project approved in CEUA/UFRGS n° 34357). The results showed that there was an increase (ANOVA/Bonferroni) in the prefrontal cortex dopamine (DA) levels in the LVS 12 mg/Kg group (\*= $p < 0.05$ ) and in the striatum of the LVS 24 mg/Kg groups (\*= $p < 0.05$ ) and LVS 36 mg/Kg (\*\*= $p < 0.001$ ), however, no significant changes were observed in the levels of 5-HT, GABA, ACh and GLU in these structures. More studies need to be carried out in order to better understand the increase in dopamine in the prefrontal and striatal cortex and the observed behavioral relationships. Despite this, it is considered an important contribution so that future studies can be carried out in order to clarify the effects of LVS on the CNS and whether these can be reinforced by the association of LVS with cocaine.

**Keywords:** levamisole, neurotransmitters, cocaine.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	8
1.1	A COCAÍNA E SEUS EFEITOS .....	8
1.2	ADULTERAÇÃO DA COCAÍNA .....	8
1.3	LEVAMISOL: MECANISMOS DE AÇÃO E SEUS EFEITOS .....	9
1.4	DADOS SOBRE A ASSOCIAÇÃO DE COCAÍNA COM LEVAMISOL .....	11
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	13
2.1	OBJETIVO GERAL.....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	14
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	14
3.2	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM ANÁLISE DE ESPECTROMETRIA DE MASSA EM TANDEM PARA ANÁLISE DE NEUROTRANSMISSORES.....	14
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	15
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	17
4.1	ANÁLISE MACROSCÓPICA DO CÉREBRO .....	17
4.2	AVALIAÇÃO DE NEUROTRANSMISSORES NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL.....	17
4.2.1	Níveis de dopamina no córtex pré-frontal .....	17
4.2.2	Níveis de ácido gama-aminobutírico no córtex pré-frontal .....	17
4.2.3	Níveis de acetilcolina no córtex pré-frontal.....	18
4.2.4	Níveis de glutamato no córtex pré-frontal .....	18
4.2.5	Níveis de serotonina no córtex pré-frontal .....	19
4.3	AVALIAÇÃO DE NEUROTRANSMISSORES NO ESTRIADO .....	19
4.3.1	Níveis de dopamina no estriado .....	19
4.3.2	Níveis de ácido gama-aminobutírico no estriado .....	20
4.3.3	Níveis de acetilcolina no estriado.....	20
4.3.4	Níveis de glutamato no estriado .....	21
4.3.5	Níveis de serotonina no estriado .....	21
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	23
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	27
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	28



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 A COCAÍNA E SEUS EFEITOS

O Relatório Mundial sobre Drogas divulgado no ano de 2022 pela UNODC (do inglês, *United Nations Office on Drugs and Crime*) estimou que em 2020, cerca de 284 milhões de pessoas em todo o mundo na faixa etária de 15 a 64 anos, ou cerca de 1 em cada 18 pessoas, usaram drogas pelo menos uma vez no referido ano. Isso corresponderia a 5,6% da população global deste intervalo de idades. Deste número, cerca de 38,6 milhões de pessoas (13,6%) sofreram transtornos associados ao uso de drogas. E cerca de 21 milhões foram usuárias de cocaína no ano de 2020 representando 0,4% da população mundial de 15 a 64 anos. Vale citar que no Brasil, embora os dados estejam desatualizados, segundo o III Levantamento Nacional sobre o uso de drogas de 2015 mais de 1 milhão de pessoas utilizaram cocaína nos últimos 12 meses anteriores a pesquisa na faixa etária de 12 a 65 anos.

A cocaína é um alcaloide obtido a partir das folhas da planta *Erythroxylum coca Lam.* e pode ser comercializada ilegalmente na forma de base ou de sal, que diferem nas propriedades físicas e conseqüentemente nas vias de administração, mas que possuem a mesma estrutura molecular, portanto a mesma ação farmacológica uma vez que atingem o encéfalo e outros órgãos alvo da mesma maneira (KUDLACEK *et al.*, 2017a). O mecanismo de ação da cocaína consiste no aumento da atividade dos neurotransmissores (NT) monoaminérgicos no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) através do bloqueio dos transportadores de recaptação pré-sinápticos dos mesmos (BRUNT *et al.*, 2017b).

Os efeitos psicoestimulantes que a cocaína proporciona são derivados do aumento da atividade de dopamina (DA) no encéfalo, principalmente na via mesolímbica que se origina na área tegmental e segue para a amígdala, córtex pré-frontal, córtex cingulado anterior e núcleo accumbens, levando a um aumento do NT DA neste sistema de recompensa podendo causar dependência (FRAZER; RICHARDS; KEITH, 2018; MARQUEZ *et al.*, 2017b). Além da dependência à cocaína, o uso de adulterantes tornou-se uma ameaça adicional à saúde dos usuários.

### 1.2 ADULTERAÇÃO DA COCAÍNA

A adulteração de drogas de abuso é uma prática bastante conhecida e que possui implicações alarmantes para a saúde pública. Diversas substâncias frequentemente são

adicionadas durante o processo de fabricação com o objetivo de aumentar o volume da droga ou potencializar o efeito desejado do princípio ativo. A presença de substâncias não declaradas pelos traficantes pode expor os usuários a efeitos adversos inesperados, perigosos e potencialmente fatais dependendo do tipo de adulterante utilizado (DI TRANA; MONTANARI, 2022). Dentre as substâncias mais utilizadas como adulterantes da cocaína encontram-se: lidocaína, procaína, tetracaína, benzocaína, cafeína, ácido acetilsalicílico, fenacetina, ibuprofeno, LVS, hidroxizina e diltiazem (FIORENTIN *et al.*, 2019a; LAPOSCHAN; KRANENBURG; VAN ASTEN, 2022).

Desde o início dos anos 2000, o LVS tem sido frequentemente usado como agente adulterante em drogas ilícitas, especialmente na cocaína, fentanil e heroína. Embora sua prevalência tenha variado ao longo do tempo e da localização, o LVS foi detectado em até 79% da cocaína apreendida nas ruas e em níveis de até 74% do peso total de cocaína apreendida no mundo (MIDTHUN; NELSON; LOGAN, 2021).

### 1.3 LEVAMISOL: MECANISMOS DE AÇÃO E SEUS EFEITOS

O LVS é um derivado sintético de imidazotiazol e é o enantiômero S do fenil tetrahydroimidazotiazol. Ele pode ser encontrado na forma de sal, sendo o cloridrato de LVS um pó branco, inodoro e hidrofílico (BRUNT *et al.*, 2017b; POPE; DRUMMER; SCHNEIDER, 2018). Em sua descoberta na década de 1960, foi usado como um anti-helmíntico para uso humano e veterinário. Já na década de 1970, a descoberta de propriedades imunomoduladoras fez com que o fármaco fosse utilizado em condições inflamatórias como artrite reumatoide, síndrome nefrótica, colite ulcerativa dentre outros (NOLAN; JEN, 2015). Também foi utilizado como adjuvante ao 5-fluorouracil (5-FU) no tratamento do câncer de cólon (MARQUEZ *et al.*, 2017a). O uso a curto prazo do LVS como anti-helmíntico não foi tipicamente associado a efeitos colaterais significativos, entretanto relatos de caso de complicações significativas surgiram rapidamente quando o LVS foi usado em condições inflamatórias por longos períodos (BRUNT *et al.*, 2017b; LAROCQUE; HOFFMAN, 2012b; MIDTHUN; NELSON; LOGAN, 2021).

O LVS foi banido dos Estados Unidos e Canadá em 2000 e 2003, respectivamente, por relatos de efeitos adversos graves, incluindo vasculite, leucopenia e agranulocitose. Independentemente disso, o LVS permanece na Lista de Medicamentos Essenciais da Organização Mundial de Saúde (OMS) como medicamento seguro e anti-helmíntico intestinal eficaz (BRUNT *et al.*, 2017b; CASALE; COLLEY; LEGATT, 2012; MIDTHUN; NELSON;

LOGAN, 2021). No Brasil ele era comercializado para uso humano como anti-helmíntico, mas não possui nenhum registro ativo no momento.

A atividade anti-helmíntica característica do LVS deve-se ao seu papel como agonista do receptor nicotínico de acetilcolina (ACh) em células nervosas e musculares de helmintos. O fármaco se liga ao sítio ativo e abre um subgrupo específico de canais iônicos que leva ao influxo de cálcio nas células e, finalmente, provoca contração muscular causando paralisia no verme e permitindo assim a eliminação através do trato gastrointestinal do hospedeiro (BRUNT *et al.*, 2017b; MIDTHUN; NELSON; LOGAN, 2021).

A atividade imunomoduladora do LVS, parece estar relacionada a sua atividade colinérgica em linfócitos T, embora o mecanismo de ação completo de LVS ainda não esteja bem esclarecido. O fármaco pode atuar tanto em linfócitos T quanto em linfócitos B, entretanto, os efeitos são mais pronunciados nos linfócitos T. Os efeitos incluem ativação e aumento da motilidade dos linfócitos T, aumento de anticorpos, aprimoramento de quimiotaxia de neutrófilos e aumento da fagocitose de macrófagos. A combinação dessas ações estimulam a resposta imunológica para combater diversos agentes, incluindo tumores e microorganismos (BRUNT *et al.*, 2017b; MIDTHUN; NELSON; LOGAN, 2021; WOLFORD *et al.*, 2012).

O LVS é uma substância altamente lipofílica e possui a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (LIN; TSAI, 2006). Quando LVS foi utilizado em doses terapêuticas foi percebida uma melhora no humor dos pacientes indicando potencial para atividade antidepressiva e também, observou-se nos usuários um estado de hiper alerta e até mesmo de insônia (GOLDIN *et al.*, 1982; MUTCH; HUTSON, 1991). Essas observações levaram a investigação sobre os efeitos do LVS na neurotransmissão e no sistema adrenérgico (HERNANDO *et al.*, 2012a; HOFMAIER *et al.*, 2014a; SPECTOR; MUNJAL; SCHMIDT, 1998). Spector *et al.* (1998) mostraram que após a ingestão de LVS, os níveis de morfina e codeína aumentaram no cérebro e em órgãos periféricos. Neste mesmo trabalho, o LVS alterou significativamente o metabolismo dos NT noradrenalina (NA), DA e serotonina (5-HT), e induziu a liberação de DA em algumas áreas do encéfalo.

O LVS é um agonista do receptor nicotínico de ACh que pode causar a liberação de monoaminas e inibir enzimas participantes de seu processo de metabolização como a monoamina oxidase e catecol-o-metil-transferase, entretanto não é um inibidor muito potente da recaptção de monoaminas (MAIER *et al.*, 2018). Em contrapartida, seu metabólito o aminorex é um potente inibidor dos transportadores de DA, NA e 5-HT, que pode exercer efeitos psicoestimulantes semelhantes às anfetaminas (HOFMAIER *et al.*, 2014b; KUDLACEK *et al.*, 2017b; MAIER *et al.*, 2018).

Em relação aos parâmetros farmacocinéticos, o LVS é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal e as concentrações plasmáticas máximas ocorrem entre 1,5 a 2 horas. O fármaco é extensivamente metabolizado no fígado, sendo sua meia-vida plasmática de 3 a 4 horas e dos seus metabólitos de até 16 horas (KOUASSI *et al.*, 1986; LUYCKX *et al.*, 1982). Dados sobre a absorção por via nasal ou intravenosa, vias mais utilizadas pelos usuários de cocaína, ainda não estão disponíveis (LAURENTINO *et al.*, 2021a).

A razão do uso do LVS na adulteração da cocaína ainda permanece não totalmente elucidada, entretanto, há algumas hipóteses na literatura visando explicar o uso generalizado deste fármaco como adulterante. A primeira refere-se ao fácil acesso devido a industrialização do medicamento como anti-helmíntico, principalmente para uso veterinário, e, neste mesmo contexto, a semelhança física da substância com a cocaína, não diferindo em ponto de fusão, aparência e sabor, por exemplo (MAIER *et al.*, 2018). A segunda diz respeito ao seu efeito no SNC particularmente na liberação de monoaminas, conforme mencionado anteriormente, potencializando assim os efeitos da cocaína (BRUNT *et al.*, 2017a; HOFMAIER *et al.*, 2014b; MAIER *et al.*, 2018). E por fim, o tempo de meia-vida do LVS e de seus metabólitos é maior do que o da cocaína, portanto a adição desta substância poderia prolongar a experiência com a droga (MAIER *et al.*, 2018; MARQUEZ *et al.*, 2017b).

#### 1.4 DADOS SOBRE A ASSOCIAÇÃO DE COCAÍNA COM LEVAMISOL

Os perigos da associação entre cocaína e LVS começaram a vir à tona a partir do ano de 2009, quando se iniciaram os relatos de caso das complicações clínicas decorrentes desta combinação, caracterizando-a como um problema de saúde pública (BRUNT *et al.*, 2017a; VERONESE *et al.*, 2016). Dentre os achados clínicos mais citados estão àqueles relacionados a reações hematológicas, neurológicas, circulatórias, dérmicas, pulmonares e renais (BRUNT *et al.*, 2017c; KHAN *et al.*, 2018; LAROCQUE; HOFFMAN, 2012b; NOLAN; JEN, 2015; PATNAIK *et al.*, 2015; VERONESE *et al.*, 2016). Diversos efeitos adversos neurológicos foram descritos decorrentes da adulteração da cocaína com LVS. O principal deles a leucoencefalopatia, é uma deficiência potencialmente fatal devido à desmielinização cerebral e lesões na substância branca, podendo causar ataxia, confusão, fraqueza motora, disfasia ou afasia (ALLARD; ANCELET; DENIER, 2021; BRUNT *et al.*, 2017c; CONRAD *et al.*, 2021; PESSINI *et al.*, 2020; VONMOOS *et al.*, 2018).

Apesar de todos os relatos de caso encontrados na literatura apontando as possíveis manifestações clínicas decorrentes da associação entre cocaína e LVS, ainda faltam pesquisas

que envolvam a metabolização de drogas brutas, pesquisas que elucidem a toxicologia e sinais apresentados pelos usuários de drogas adulteradas, a fim de que haja melhor compreensão e portanto, reflitam em um melhor diagnóstico e tratamento para estes pacientes (LAURENTINO *et al.*, 2021b).

Neste contexto, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um trabalho de avaliação da toxicidade aguda e subcrônica do LVS dando origem ao artigo intitulado “Levamisole, a cocaine cutting agent, induces acute and subchronic systemic alterations in Wistar rats” fruto da dissertação da Ma. Ana Olívia Martins Laurentino. Nesta pesquisa foram reportadas as alterações comportamentais e histopatológicas derivadas da administração aguda do LVS e alterações comportamentais, cognitivas, hematológicas, renais, hepáticas e de defesa antioxidante advindas da administração subcrônica, desta maneira revelando a toxicidade da substância e as alterações clínicas importantes decorrentes do uso da mesma.

Deste trabalho ainda permaneceram amostras de estruturas cerebrais remanescentes que seriam analisadas posteriormente visando a avaliação de possíveis alterações em importantes NT. Desta forma, o presente trabalho irá apresentar e discutir as alterações encontradas nas estruturas cerebrais após a exposição aguda ao LVS, a fim de colaborar com a elucidação das contribuições prejudiciais que o LVS poderia ocasionar quando utilizado como adulterante.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Dosar NT em estruturas cerebrais isoladas após a avaliação da toxicidade aguda de diferentes doses do LVS em ratos e discutir os resultados obtidos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Dosar os NT DA, ácido gama-aminobutírico (GABA), ACh, glutamato (GLU) e 5-HT no córtex pré-frontal de ratos tratados agudamente com LVS nas doses de 12, 24 e 36 mg/kg;
- Dosar os NT DA, GABA, ACh, GLU e 5-HT no estriado de ratos tratados agudamente com LVS nas doses de 12, 24 e 36 mg/kg.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 20 ratos *Wistar* machos adultos (60 dias), pesando entre 250–300 g, obtidos do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL-UFRGS). Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno (41 × 34 × 16 cm), sendo a quantidade máxima de quatro animais por gaiola, com água e comida *ad libitum*, ciclos controlados de claro/escuro de 12h, monitoramento de temperatura ( $22 \pm 2$  °C) e umidade. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (projeto nº 34357). O número de animais por grupo foi de 5, conforme especificações do protocolo nº 420 da *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD).

#### 3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O LVS foi obtido da Noxon® (São Paulo, BR) e dissolvido em solução salina 0,9%. As administrações foram realizadas por via intraperitoneal (i.p.) e ocorreram no período matutino. As doses do tratamento foram calculadas com base nas doses geralmente ingeridas pelos usuários e com base em alguns estudos publicados (FIORENTIN *et al.*, 2019b; LAURENTINO *et al.*, 2021b; MORETTI *et al.*, 2016; TALLARIDA; TALLARIDA; RAWLS, 2015). Sendo assim, foram estabelecidos quatro grupos (n = 5/grupo) conforme especificado abaixo:

- I. Grupo salina (controle);
- II. Grupo LVS 12 mg/kg;
- III. Grupo LVS 24 mg/kg;
- IV. Grupo LVS 36 mg/kg.

Vinte e quatro horas após a administração os animais foram anestesiados (100 mg/kg tiopental e 10 mL/kg de lidocaína) via i.p., eutanasiados e as estruturas anatômicas de interesse, córtex pré-frontal e estriado, foram dissecadas e acondicionadas em freezer -80 °C para análises posteriores.

Cabe ressaltar que quatro dos cinco animais pertencentes ao grupo LVS 36 mg/kg morreram 15 minutos após a administração de LVS. Neste contexto, todos os resultados referentes a este grupo experimental são considerando o animal sobrevivente (n = 1).

#### 3.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM ANÁLISE DE ESPECTROMETRIA DE MASSA EM TANDEM PARA ANÁLISE DE NEUROTRANSMISSORES

Para a preparação das amostras, uma alíquota do cérebro foi homogeneizada em água tipo 1 com 2% de ácido fórmico para uma concentração final de 100 mg/mL. A estrutura cerebral homogeneizada (50 µL) e 20 µL de dopamina-*d*<sub>4</sub> (padrão interno, 250 ng/mL) foram adicionados em tubos plásticos e 930 µL de acetona foram adicionados antes do vórtice por 30 segundos. As amostras foram, então, centrifugadas por 6 minutos a 12000g a 4 °C e o sobrenadante foi coletado e seco usando fluxo de nitrogênio. Após o resfriamento, o resíduo foi reconstituído em 50 µL de água, transferido para um frasco de autoamostrador e uma alíquota de 20 µL foi injetada no sistema analítico.

A curva de calibração foi preparada utilizando solução de estoque mista contendo ACh, DA, 5-HT, GABA e GLU. Foi utilizado para as análises o sistema *Nexera-i* LC-2040C Plus acoplado ao espectrômetro de massa triplo quadrupolo LCMS-8045 (*Shimadzu, Kyoto, Japan*). Os parâmetros ESI-MS/MS foram ajustados em modos de íon positivo e negativo (interruptor de polaridade, 25 msec) da seguinte forma: positivo 1500 V e negativo 4500 V; temperatura da linha de dessolvatação, 250 °C; temperatura do bloco de aquecimento, 400 °C; gás de secagem, 10 L/min; e gás nebulizador, 3 L/min. A dissociação induzida por colisão foi obtida com pressão de argônio de 230 kPa.

As análises foram realizadas com monitoramento de múltiplas reações (MRM) usando as seguintes fragmentações:  $m/z$  147.1  $\rightarrow$   $m/z$  84.0 e  $m/z$  147.1  $\rightarrow$   $m/z$  130.1 para detecção de ACh; ([M+H]<sup>+</sup>);  $m/z$  154.0  $\rightarrow$   $m/z$  137.1 e  $m/z$  154.0  $\rightarrow$   $m/z$  91.1 para detecção de DA ([M+H]<sup>+</sup>);  $m/z$  104.2  $\rightarrow$   $m/z$  87.05 e  $m/z$  104.2  $\rightarrow$   $m/z$  69.0 para detecção de GABA ([M+H]<sup>+</sup>);  $m/z$  148.1  $\rightarrow$   $m/z$  84.1 e  $m/z$  148.1  $\rightarrow$   $m/z$  130.1 para detecção de GLU ([M+H]<sup>+</sup>);  $m/z$  177.0  $\rightarrow$   $m/z$  160.1 e  $m/z$  177.0  $\rightarrow$   $m/z$  132.1 para detecção de 5-TH ([M+H]<sup>+</sup>);  $m/z$  158.0  $\rightarrow$   $m/z$  141.1 e  $m/z$  158.0  $\rightarrow$   $m/z$  95.15 para detecção de DA-*d*<sub>4</sub> ([M+H]<sup>+</sup>). A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna *Shim-pack* GISS (2,1 x 100 mm, tamanho de partícula de 1,9 µm) (*Shimadzu, Kyoto, Japão*) eluída com vazão de 0,3 mL/min.

O sistema de fase móvel gradiente consistia em água (solvente A) e acetonitrila (solvente B) ambos fortificados com ácido fórmico a 0,1% da seguinte forma: 0 – 1 min, 0% de B; 1 – 6 min, 0 – 100% de B; 6 – 7 min, 100% de B; 7 – 7,1 min, 100 – 0% de B; 7,1 – 15 min, 0% B. O forno da coluna foi mantido a 25°C. Os dados foram processados no software *LabSolutions* (*Shimadzu, Kyoto, Japão*).

### 3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA



Os resultados foram analisados através do *software GraphPad Prism v.8.0*. Os dados paramétricos com distribuição normal foram apresentados como média  $\pm$  EPM e a análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni. O valor de p foi considerado significativo quando menor que 0,05.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA DO CÉREBRO

As necropsias dos cérebros dos animais dos grupos controle, LVS 12 mg/kg e LVS 24 mg/kg não apresentaram alterações a nível macroscópico. 100% dos animais do grupo LVS 36 mg/kg apresentaram convulsões até 15 minutos após a administração de LVS e todos os cérebros deste grupo apresentavam sinais de hemorragia cerebral. Estes dados sugerem que o LVS na dose de 36 mg/kg foi capaz de causar alterações macroscópicas dos órgãos quando comparado com os outros grupos.

### 4.2 AVALIAÇÃO DE NEUROTRANSMISSORES NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL

#### 4.2.1 Níveis de dopamina no córtex pré-frontal

As análises mostraram que houve um aumento estatisticamente significativo nos níveis de DA no córtex pré-frontal (Figura 1) dos animais do grupo LVS 12 mg/kg quando comparado aos animais do grupo controle ( $F = 4,801$ ;  $p = 0,0217$ ). Nas demais dosagens utilizadas não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

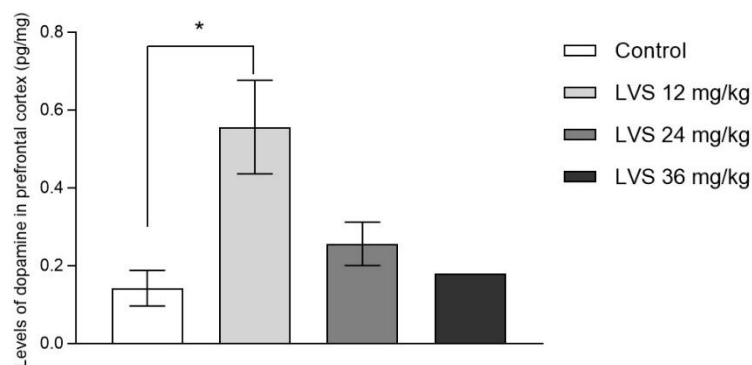


Figura 1: Níveis de DA no córtex pré-frontal de ratos tratados 24h antes com LVS 12, 24 e 36 mg/kg comparados com o controle (salina).  $*=p<0,05$  (ANOVA/Bonferroni).

#### 4.2.2 Níveis de ácido gama-aminobutírico no córtex pré-frontal

Não foram observadas alterações estatisticamente significativas nos níveis de GABA no córtex pré-frontal (figura 2) entre os animais dos grupos LVS e controle ( $F = 0,4980$ ;  $p = 0,6906$ ).

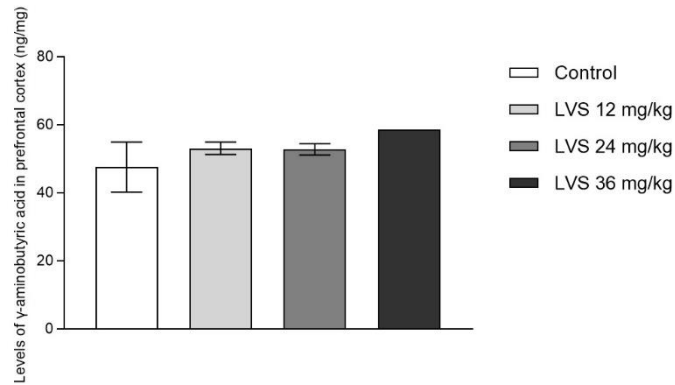


Figura 2: Níveis de GABA no córtex pré-frontal de ratos tratados 24h antes com LVS 12, 24 e 36 mg/kg comparados com o controle (salina).

#### 4.2.3 Níveis de acetilcolina no córtex pré-frontal

Não foram observadas alterações estatisticamente significativas nos níveis de ACh no córtex pré-frontal (figura 3) dos animais ( $F = 1,185$ ;  $p = 0,3599$ ).

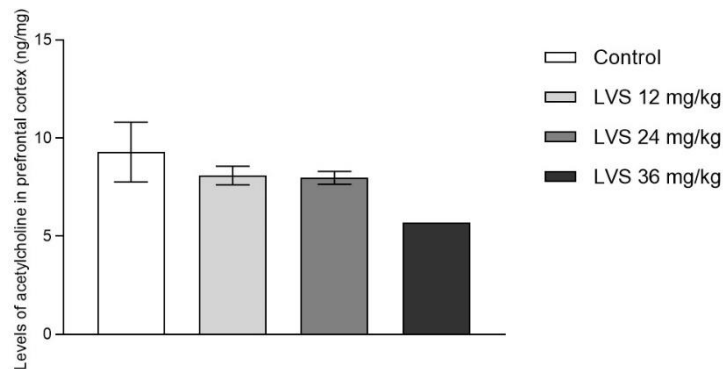


Figura 3: Níveis de ACh no córtex pré-frontal de ratos tratados 24h antes com LVS 12, 24 e 36 mg/kg comparados com o controle (salina).

#### 4.2.4 Níveis de glutamato no córtex pré-frontal

As análises não mostraram alterações estatisticamente significativas nos níveis de GLU no córtex pré-frontal (figura 4) entre os animais dos grupos LVS ou controle ( $F = 1,185$ ;  $p = 0,3599$ ).

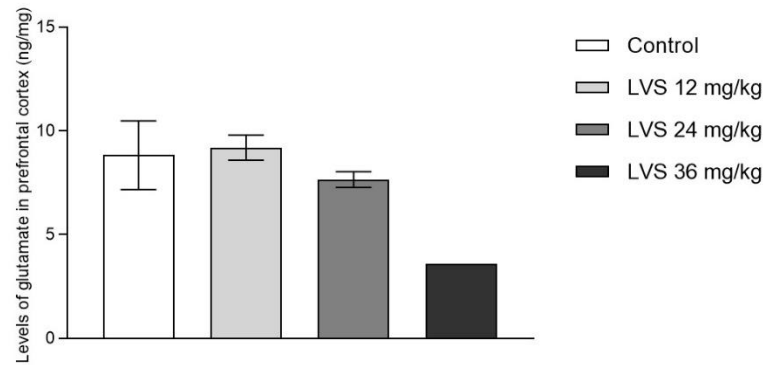


Figura 4: Níveis de GLU no córtex pré-frontal de ratos tratados 24h antes com LVS 12, 24 e 36 mg/kg comparados com o controle (salina).

#### 4.2.5 Níveis de serotonina no córtex pré-frontal

Não foram observadas alterações estatisticamente significativas nos níveis de 5-HT no córtex pré-frontal (figura 5) entre os animais tratados com LVS ( $F = 0,4228$ ;  $p = 0,7404$ ).

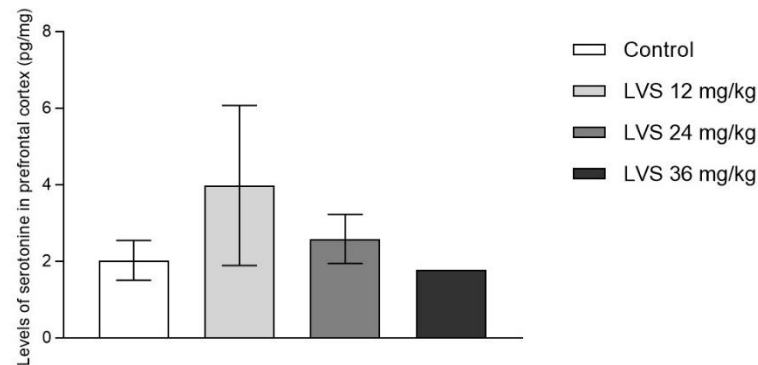


Figura 5: Níveis de 5-HT no córtex pré-frontal de ratos tratados 24h antes LVS 12, 24 e 36 mg/kg comparados com o controle (salina).

### 4.3 AVALIAÇÃO DE NEUROTRANSMISSORES NO ESTRIADO

#### 4.3.1 Níveis de dopamina no estriado

Foi observado um aumento estatisticamente significativo nos níveis de DA no estriado (figura 6) dos animais tratados com LVS 24 mg/kg ( $p < 0,05$ ) e do animal pertencente ao grupo LVS 36 mg/kg ( $n = 1$ ) ( $F = 6,570$ ;  $p = 0,0055$ ) quando comparado com todos os outros grupos. Cabe ressaltar que os demais animais vieram a óbito 15 minutos após a exposição ao LVS. Os mesmos apresentaram convulsões e dificuldade respiratória.

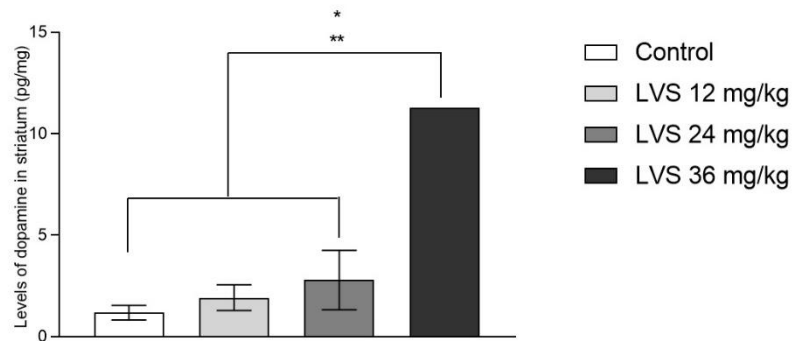


Figura 6: Níveis de DA no estriado de ratos tratados 24h antes com LVS 12, 24 e 36 mg/kg comparados com o controle (salina). \*= $p < 0,05$  e \*\*= $p < 0,001$  (ANOVA/Bonferroni).

#### 4.3.2 Níveis de ácido gama-aminobutírico no estriado

Não foram observadas alterações estatisticamente significativas nos níveis de GABA no estriado (figura 7) dos animais tratados com LVS ( $F = 0,3755$ ;  $p = 0,7723$ ).

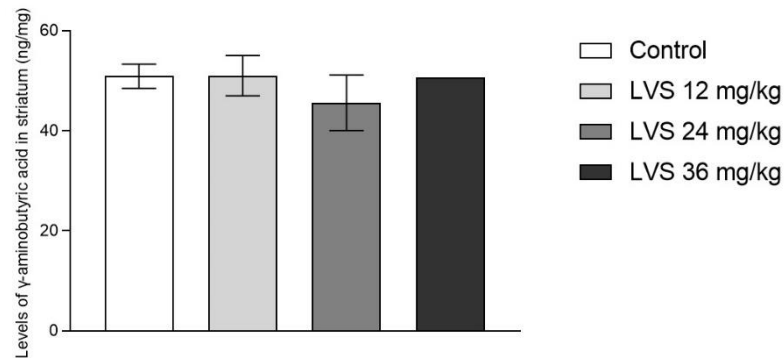


Figura 7: Níveis de GABA no estriado de ratos tratados 24h antes com LVS 12, 24 e 36 mg/kg comparados com o controle (salina).

#### 4.3.3 Níveis de acetilcolina no estriado

Os resultados das análises não mostraram alterações estatisticamente significativas nos níveis de ACh no estriado (figura 8) dos animais dos grupos LVS e controle ( $F = 0,1179$ ;  $p = 0,9477$ ).

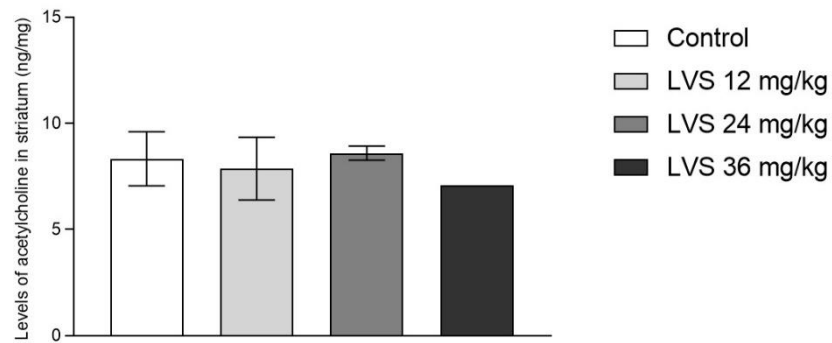


Figura 8: Níveis de ACh no estriado de ratos tratados 24h antes com LVS 12, 24 e 36 mg/kg comparados com o controle (salina).

#### 4.3.4 Níveis de glutamato no estriado

Não foram observadas alterações estatisticamente significativas nos níveis de GLU no estriado (figura 9) dos animais tratados com LVS ( $F = 0,1006$ ;  $p = 0,9581$ ).

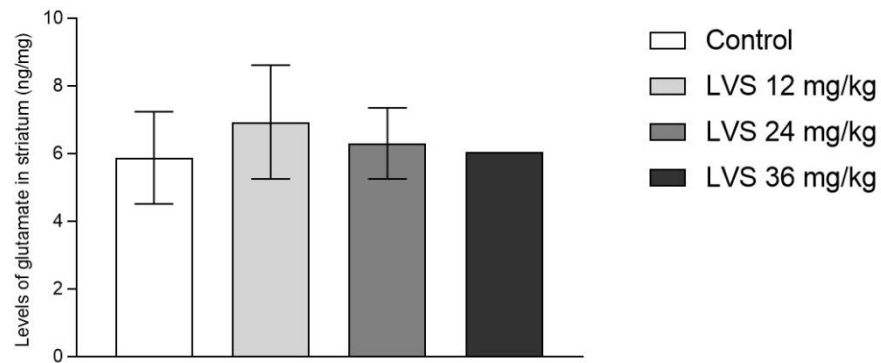


Figura 9: Níveis de GLU no estriado de ratos tratados 24h antes com LVS 12, 24 e 36 mg/kg comparados com o controle (salina).

#### 4.3.5 Níveis de serotonina no estriado

As análises dos níveis de 5-HT no estriado (figura 10) dos animais tratados com LVS não mostraram alterações estatisticamente significativas nos resultados ( $F = 0,3631$ ;  $p = 0,7809$ ).

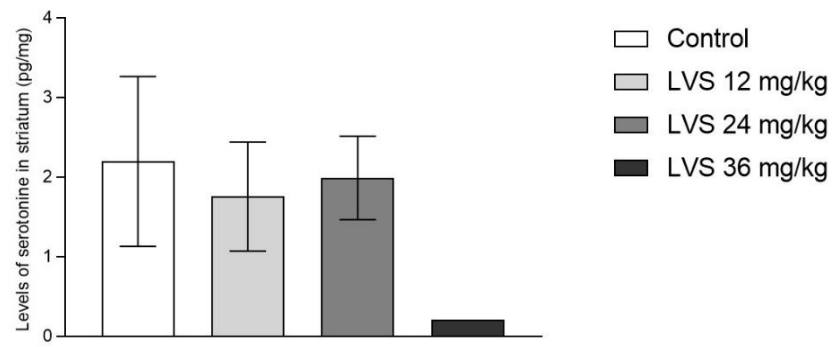


Figura 10: Níveis de 5-HT no estriado de ratos tratados 24h antes com LVS 12, 24 e 36 mg/kg comparados com o controle (salina).

## 5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, houve diferença estatisticamente significativa apenas nos níveis de DA no córtex pré-frontal do grupo LVS 12 mg/Kg e no estriado dos grupos tratados com LVS 24 mg/Kg e LVS 36 mg/Kg, quando comparados ao grupo controle. Diferentemente do que foi encontrado no trabalho de Spector e col (1998), em que o conteúdo de DA não foi alterado em até 2h depois da administração de LVS. Vale ressaltar que em nosso trabalho a eutanásia ocorreu 24h depois da administração de LVS.

Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa, poderia ser inferida uma tendência ao aumento de 5-HT no córtex pré-frontal dos animais do grupo LVS 12 mg/kg quando comparada com os demais grupos, entretanto ao observar-se o desvio padrão essa expectativa não foi confirmada. O trabalho de Spector e col (1998) mostra um aumento tardio de 5-HT em outras estruturas como no tronco encefálico, hipocampo, hipotálamo e mesencéfalo, mas os mesmos resultados também não foram encontrados no córtex e estriado.

O estudo de Spector e col (1998) foi o único, encontrado na literatura, a realizar a dosagem de NT após administração de LVS. Eles conduziram um estudo com ratos Sprague-Dawley dependentes de morfina em síndrome de abstinência precipitada pela naltrexona. Os animais receberam a dose de 35 mg/Kg de LVS i.p e foram eutanasiados em grupos (6 animais por grupo) de acordo com o tempo 0 min, 15 min, 30 min, 60 min e 120 min. Além da morfina e codeína, foram avaliados os NT DA, 5-HT e NA nas seguintes regiões encefálicas: hipotálamo, hipocampo, estriado, tronco encefálico, mesencéfalo, cerebelo e córtex. O estudo mostrou que a administração sistêmica de LVS reduziu os sintomas de abstinência, produziu um aumento significativo nos níveis de morfina e codeína centralmente e em órgãos periféricos, e ainda alterou significativamente o metabolismo dos NT monoaminérgicos em regiões específicas do encéfalo. Segundo eles os níveis de DA aumentaram no tronco encefálico, cerebelo, hipocampo, hipotálamo e mesencéfalo regiões que também apresentaram níveis aumentados de seus metabólitos HVA (do inglês: *homovanillic acid*) e/ou DOPAC (do inglês: *3,4-Dihydroxyphenylacetic acid*). No entanto, no córtex e estriado, regiões onde os níveis de HVA e DOPAC diminuíram significativamente, o conteúdo de DA não foi alterado. Os aumentos no HVA que ocorreram foram rápidos e persistentes por pelo menos 120 minutos na maioria das regiões. Também ocorreu um aumento tardio dos níveis de 5-HT no tronco encefálico, hipocampo, hipotálamo e mesencéfalo, que se tornou evidente apenas no tempo de 60 e/ou 120 minutos. Este aumento dos níveis de 5-HT foram acompanhados por um aumento



similarmente tardio nos níveis de 5-HIAA (do inglês: *5-Hydroxyindoleacetic acid*) apenas no tronco encefálico e no mesencéfalo.

O LVS pode atuar tanto como um agonista quanto um modulador alostérico de receptores nicotínicos (LEVANDOSKI; PIKET; CHANG, 2003) e a atividade do LVS nestes receptores pode explicar a redução do limiar de convulsões observadas em camundongos tratados com altas doses do fármaco (REHNI; SINGH, 2010). Como esperado isto também foi observado em nosso estudo visto que 100% dos animais do grupo LVS 36 mg/kg apresentaram convulsões até 15 minutos após a administração de LVS, sendo que 4 deles não resistiram ao tratamento. O mecanismo pelo qual LVS poderia precipitar as crises convulsivas ainda não está bem elucidado, mas parece estar relacionado com a ativação de canais de cálcio dependentes de voltagem e aumento de GLU e a consequente ativação de receptores NMDA e também com a biossíntese de óxido nítrico (REHNI; SINGH, 2010). Entretanto mais pesquisas devem ser realizadas para que essa hipótese ganhe mais evidência. Em nossas análises não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de GLU em nenhuma das estruturas e das doses avaliadas, isso pode ter ocorrido devido ao tempo de eutanásia de 24h, visto que as convulsões foram observadas dentro de 15 min como dito anteriormente.

Sabe-se que o LVS é capaz de ativar o receptor nicotínico neuronal humano (HERNANDO *et al.*, 2012b). Devido a esta atividade também, alguns autores sugeriram que o LVS poderia aumentar a liberação de NA das sinapses simpáticas no tecido periférico, potencializando assim os efeitos da cocaína (RAYMON; ISENSCHMID, 2009). Os mesmos autores propõem que o LVS poderia aumentar os efeitos prazerosos e de reforço do comportamento por ter uma atividade agonista nos receptores nicotínicos centrais, estimulando a atividade glutamatérgica em neurônios dopaminérgicos do sistema mesolímbico envolvidos no processo de recompensa (RAYMON; ISENSCHMID, 2009). O LVS também mostra ação inibitória na monoamina oxidase (MAO) (AGARWAL *et al.*, 1990), que pode em conjunto com a ativação do receptor nicotínico induzir o aumento da transmissão dopaminérgica no SNC (TALLARIDA *et al.*, 2014).

Hofmaier e col. (2014) conduziram um estudo com células HEK293 que expressavam os transportadores DAT (do inglês: *Dopamine transporter*), NET (do inglês: *Norepinephrine transporter*) e SERT (do inglês: *Serotonin transporter*) em isoformas humanas estáveis, a fim de avaliar a atividade dos mesmos frente a diferentes concentrações de LVS, de seu metabólito aminorex e da cocaína isolados e/ou em combinação. Os resultados deste estudo mostram que o LVS inibe os três transportadores em altas concentrações, sendo essa inibição mais proeminente em NET e em menor grau em DAT e SERT. Esta inibição é mediada por uma

interação de baixa afinidade no mesmo local onde a cocaína se liga. Já o aminorex possui propriedades de inibição de DAT e NET semelhantes a cocaína e em SERT apresenta propriedades semelhante as anfetaminas, causando significativo efluxo de substrato.

Portanto, pode-se supor que o aminorex tem a capacidade de potencializar e/ou prolongar os efeitos da cocaína em suas propriedades inibitórias, ao mesmo tempo que também pode prolongar as sensações da cocaína devido a suas propriedades semelhantes às anfetaminas, em momentos em que a cocaína pode não estar mais presente no cérebro (JATLOW, 1988; MOOLCHAN *et al.*, 2000). É válido ressaltar que o LVS é rapidamente metabolizado para aminorex e metabólitos relacionados (HESS *et al.*, 2013; REID *et al.*, 1998) e que o mesmo foi detectado em amostras de urina humana em vários usuários de cocaína (BERTOL *et al.*, 2011; KARCH *et al.*, 2012).

Aminorex foi comercializado como um inibidor de apetite na década de 1960, principalmente na Suíça, Áustria e Alemanha (HOFMAIER *et al.*, 2014b; MAIER *et al.*, 2018). Foi demonstrado seu efeito liberador de 5-HT em SERT, e seu efeito inibidor na recaptação de 5-HT, assim como nas enzimas monoamina-oxidases (SEILER; WASSERMANN; WENSKY, 1976). Essa ação no sistema serotoninérgico levantou a hipótese de efeito vasoconstritor nos vasos pulmonares (BYRNE-QUINN; GROVER, 1972; ROTHMAN *et al.*, 1999) e a droga acabou sendo retirada em 1972 devido a vários casos de hipertensão pulmonar (FISHMAN, 2004). Poos e col. (1963) já haviam demonstrado que o aminorex era um agente liberador de catecolaminas e Rothman e col. (2001) confirmaram que o aminorex não era somente um inibidor dos transportadores de recaptação de monoaminas (como a cocaína), mas sim um agente liberador semelhante às anfetaminas e que seus principais efeitos advinham de sua interação com os transportadores de monoaminas NET, DAT e SERT, conforme dito anteriormente, e reforçado por outros estudos que surgiram posteriormente (BRANDT *et al.*, 2014; HOFMAIER *et al.*, 2014b; J *et al.*, 2018; MCLAUGHLIN *et al.*, 2015). (POOS *et al.*, 1963; ROTHMAN *et al.*, 2001)

Zheng e col. (1997) avaliaram os efeitos agudos e crônicos de aminorex e análogos comparados a outros estimulantes, em NT de camundongos CBA. Para avaliação dos efeitos agudos, os animais foram tratados com aminorex em uma única dose máxima tolerada e foram eutanasiados 1h, 3h e 6h após a administração. Os NT foram avaliados no estriado, córtex e hipocampo. Os autores encontraram que o aminorex e seus análogos produziram um aumento na concentração de 5-HT inicialmente que retornou para o nível do controle em 6h e paralelamente ocorreu uma diminuição dos níveis de 5-HIAA em 1h seguido por um aumento para os níveis iguais ou maiores do que aqueles do grupo controle em todas as regiões

avaliadas. No estriado, aminorex causou o aumento dos níveis de DA em 1h, que permaneceu alto durante todo o experimento e os níveis de DOPAC diminuíram em 1h e aumentaram nas horas subsequentes. Dado que a meia-vida de aminorex foi estabelecida em 6h após a administração de LVS e do fato de poder ser detectado até 54h após ingestão do mesmo em humanos (HESS *et al.*, 2013) pode-se inferir que nossos resultados tenham contribuição deste metabólito, visto que nossa avaliação ocorreu 24h após a administração. Entretanto, não está bem elucidada como a conversão de LVS a aminorex ocorre e nem mesmo quanto, pois nem todos os estudos conseguiram detectar o aminorex em suas amostras (HANDLEY *et al.*, 2019), por isso, supõe-se que a taxa de conversão de LVS para aminorex possa ser bastante baixa (EIDEN *et al.*, 2015; KARCH; BERTOL; VAIANO, 2015). (ZHENG *et al.*, 1997)

Tallarida e col (2014) através de seu trabalho de observação do comportamento de planárias, incluindo movimentos estereotipados e preferência condicionada de lugar, mostraram pela primeira vez *in vivo* o sinergismo entre cocaína e LVS, demonstrada pelo aumento da ação da cocaína quando acrescida do contaminante. Neste sentido Zimmerman e col. (2018) reforçaram esta ideia ao conduzir sua pesquisa com ratos Sprague-Dawley comparando os efeitos subjetivos do comportamento dos animais ao uso de LVS isolado ou em combinação com a cocaína. Os autores concluíram que o LVS sozinho não foi capaz de produzir efeitos semelhantes a cocaína, mas que a interação entre as substâncias ocorre de forma aditiva e mais comumente supra aditiva (ZIMMERMANN; GAUVIN; POLING, 2018).

Não foram observadas alterações significativas nos níveis de GABA e ACh no córtex pré-frontal e estriado na comparação entre os animais dos grupos LVS e controle.

Como limitações deste estudo, podemos apontar a não realização da avaliação dos NT após a administração da cocaína em associação com o LVS. Também não foi realizada a dosagem de importantes metabólitos dos NT como HVA, DOPAC, e 5-HIAA. Não houve a detecção e quantificação de metabólitos do LVS como o aminorex e por fim, aponta-se a necessidade da realização de novos estudos utilizando outros períodos de tempo *pós-mortem* para melhor avaliação dos níveis de NT.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que houve alteração nos níveis de DA do córtex pré-frontal no grupo LVS 12 mg/Kg e no estriado dos grupos LVS 24 mg/Kg e LVS 36 mg/Kg, quando comparado ao grupo controle e após 24h da administração de LVS.

Mais estudos necessitam ser realizados a fim de uma melhor compreensão sobre o aumento de dopamina nestas estruturas encefálicas e as relações comportamentais observadas.

Não foram encontradas alterações estatisticamente significativas nos níveis de 5-HT, GABA, ACh e GLU no córtex pré-frontal e estriado na comparação entre os animais dos grupos LVS e controle, o que pode indicar a existência de um tempo crítico em que as flutuações dos níveis destes compostos podem ser observadas.

Apesar disto, considera-se este estudo como uma importante contribuição para que outras pesquisas possam ser realizados a fim de esclarecer os efeitos de LVS no SNC e se estes podem ser reforçados pela associação de LVS com a cocaína.

## REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A. *et al.* Biogenic amines, metabolites and monoamine oxidase in the filarial worm *Setaria cervi*. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 20, n. 7, p. 873–881, 1990.
- ALLARD, J.; ANCELET, C.; DENIER, C. Cocaine and Levamisole Cerebral Toxicity. **Annals of Neurology**, [s. l.], v. 89, n. 6, p. 1253–1254, 2021.
- ANVISA. Agência nacional de vigilância sanitária. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/2599200191566/?substancia=2827>  
Acesso em: 30 de maio de 2022.
- BASTOS, Francisco Inácio Pinkusfeld Monteiro et al. (Org.). III Levantamento Nacional sobre o uso de drogas pela população brasileira. Rio de Janeiro: FIOCRUZ/ICICT, 2017. 528 p
- BERTOL, E. *et al.* Determination of aminorex in human urine samples by GC–MS after use of levamisole. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 55, n. 5, p. 1186–1189, 2011.
- BRANDT, S. D. *et al.* Characterization of a novel and potentially lethal designer drug ( $\pm$ )-cis-para-methyl-4-methylaminorex (4,4'-DMAR, or 'Serotoni'). **Drug Testing and Analysis**, [s. l.], v. 6, n. 7–8, p. 684–695, 2014.
- BRUNT, T. M. *et al.* Adverse effects of levamisole in cocaine users: a review and risk assessment. **Archives of Toxicology**, [s. l.], v. 91, n. 6, p. 2303–2313, 2017a.
- BRUNT, T. M. *et al.* Adverse effects of levamisole in cocaine users: a review and risk assessment. **Archives of Toxicology**, [s. l.], v. 91, n. 6, p. 2303–2313, 2017b.
- BRUNT, T. M. *et al.* Adverse effects of levamisole in cocaine users: a review and risk assessment. **Archives of Toxicology**, [s. l.], v. 91, n. 6, p. 2303–2313, 2017c.
- BYRNE-QUINN, E.; GROVER, R. F. Aminorex (Menocil) and amphetamine: acute and chronic effects on pulmonary and systemic haemodynamics in the calf. **Thorax**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 127–131, 1972.
- 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**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 130–135, 2012.

- CONRAD, F. *et al.* Use of levamisole-adulterated cocaine is associated with increased load of white matter lesions. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. E281–E291, 2021.
- DI TRANA, A.; MONTANARI, E. Adulterants in drugs of abuse: a recent focus of a changing phenomenon. **LA CLINICA TERAPEUTICA**, [s. l.], n. 1, p. 54–55, 2022.
- EIDEN, C. *et al.* Prevalence of levamisole and aminorex in patients tested positive for cocaine in a French University Hospital. **Clinical Toxicology (Philadelphia, Pa.)**, [s. l.], v. 53, n. 7, p. 604–608, 2015.
- FIorentin, T. R. *et al.* Determination of cutting agents in seized cocaine samples using GC-MS, GC-TMS and LC-MS/MS. **Forensic Science International**, [s. l.], v. 295, p. 199–206, 2019a.
- FIorentin, T. R. *et al.* Determination of cutting agents in seized cocaine samples using GC-MS, GC-TMS and LC-MS/MS. **Forensic Science International**, [s. l.], v. 295, p. 199–206, 2019b.
- FISHMAN, A. P. Primary pulmonary arterial hypertension: a look back. **Journal of the American College of Cardiology**, [s. l.], v. 43, n. 12 Suppl S, p. 2S-4S, 2004.
- FRAZER, K. M.; RICHARDS, Q.; KEITH, D. R. The long-term effects of cocaine use on cognitive functioning: A systematic critical review. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 348, p. 241–262, 2018.
- GOLDIN, A. *et al.* Biologic-response modifiers and adjuvant chemotherapy: consideration of selected preclinical investigations in relation to clinical potential. **Recent Results in Cancer Research. Fortschritte Der Krebsforschung. Progres Dans Les Recherches Sur Le Cancer**, [s. l.], v. 80, p. 351–356, 1982.
- HANDLEY, S. A. *et al.* Plasma and Urine Levamisole in Clinical Samples Containing Benzoyllecgonine: Absence of Aminorex. **Journal of Analytical Toxicology**, [s. l.], v. 43, n. 4, p. 299–306, 2019.
- HERNANDO, G. *et al.* Contribution of subunits to *Caenorhabditis elegans* levamisole-sensitive nicotinic receptor function. **Molecular Pharmacology**, [s. l.], v. 82, n. 3, p. 550–560, 2012a.
- HERNANDO, G. *et al.* Contribution of subunits to *Caenorhabditis elegans* levamisole-sensitive nicotinic receptor function. **Molecular Pharmacology**, [s. l.], v. 82, n. 3, p. 550–560, 2012b.

- HESS, C. *et al.* Metabolism of levamisole and kinetics of levamisole and aminorex in urine by means of LC-QTOF-HRMS and LC-QqQ-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 405, n. 12, p. 4077–4088, 2013.
- HOFMAIER, T. *et al.* Aminorex, a metabolite of the cocaine adulterant levamisole, exerts amphetamine like actions at monoamine transporters. **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 73, p. 32–41, 2014a.
- HOFMAIER, T. *et al.* Aminorex, a metabolite of the cocaine adulterant levamisole, exerts amphetamine like actions at monoamine transporters. **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 73, p. 32–41, 2014b.
- J, M. *et al.* The psychostimulant ( $\pm$ )-cis-4,4'-dimethylaminorex (4,4'-DMAR) interacts with human plasmalemmal and vesicular monoamine transporters. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 138, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29908239/>. Acesso em: 30 jun. 2022.
- JATLOW, P. Cocaine: analysis, pharmacokinetics, and metabolic disposition. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, [s. l.], v. 61, n. 2, p. 105–113, 1988.
- KARCH, S. B. *et al.* Aminorex poisoning in cocaine abusers. **International Journal of Cardiology**, [s. l.], v. 158, n. 3, p. 344–346, 2012.
- KARCH, S. B.; BERTOL, E.; VAIANO, F. Levamisole, Aminorex, and Pulmonary Arterial Hypertension: A Review. **Razavi International Journal of Medicine**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 1–5, 2015.
- KHAN, M. S. *et al.* Recurrent Levamisole-Induced Agranulocytosis Complicated by Bowel Ischemia in a Cocaine User. **The American Journal of Case Reports**, [s. l.], v. 19, p. 630–633, 2018.
- KOUASSI, E. *et al.* Novel assay and pharmacokinetics of levamisole and p-hydroxylevamisole in human plasma and urine. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 71–89, 1986.
- KUDLACEK, O. *et al.* Cocaine adulteration. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, [s. l.], v. 83–84, p. 75–81, 2017a.
- KUDLACEK, O. *et al.* Cocaine adulteration. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, [s. l.], v. 83–84, p. 75–81, 2017b.
- LAPOSCHAN, S.; KRANENBURG, R. F.; VAN ASTEN, A. C. Impurities, adulterants and cutting agents in cocaine as potential candidates for retrospective mining of GC-MS data. **Science & Justice: Journal of the Forensic Science Society**, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 60–75, 2022.

- LAROCQUE, A.; HOFFMAN, R. S. Levamisole in cocaine: unexpected news from an old acquaintance. **Clinical Toxicology (Philadelphia, Pa.)**, [s. l.], v. 50, n. 4, p. 231–241, 2012a.
- LAROCQUE, A.; HOFFMAN, R. S. Levamisole in cocaine: unexpected news from an old acquaintance. **Clinical Toxicology (Philadelphia, Pa.)**, [s. l.], v. 50, n. 4, p. 231–241, 2012b.
- LAURENTINO, A. O. M. *et al.* Levamisole, a cocaine cutting agent, induces acute and subchronic systemic alterations in Wistar rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [s. l.], v. 426, p. 115649, 2021a.
- LAURENTINO, A. O. M. *et al.* Levamisole, a cocaine cutting agent, induces acute and subchronic systemic alterations in Wistar rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [s. l.], v. 426, p. 115649, 2021b.
- LEVANDOSKI, M. M.; PIKET, B.; CHANG, J. The anthelmintic levamisole is an allosteric modulator of human neuronal nicotinic acetylcholine receptors. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 471, n. 1, p. 9–20, 2003.
- LIN, L.-C.; TSAI, T.-H. Pharmacokinetics and brain distribution of unbound levamisole in the anesthetized rats using microdialysis and microbore column liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 569, n. 1, p. 145–150, 2006.
- LUYCKX, M. *et al.* Pharmacokinetics of levamisole in healthy subjects and cancer patients. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 247–254, 1982.
- MAIER, J. *et al.* DARK Classics in Chemical Neuroscience: Aminorex Analogues. **ACS chemical neuroscience**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. 2484–2502, 2018.
- MARQUEZ, J. *et al.* Cocaine-Levamisole-Induced Vasculitis/Vasculopathy Syndrome. **Current Rheumatology Reports**, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 36, 2017a.
- MARQUEZ, J. *et al.* Cocaine-Levamisole-Induced Vasculitis/Vasculopathy Syndrome. **Current Rheumatology Reports**, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 36, 2017b.
- MCLAUGHLIN, G. *et al.* Synthesis, characterization, and monoamine transporter activity of the new psychoactive substance 3',4'-methylenedioxy-4-methylaminorex (MDMAR). **Drug Testing and Analysis**, [s. l.], v. 7, n. 7, p. 555–564, 2015.
- MIDTHUN, K. M.; NELSON, L. S.; LOGAN, B. K. Levamisole-a Toxic Adulterant in Illicit Drug Preparations: a Review. **Therapeutic Drug Monitoring**, [s. l.], v. 43, n. 2, p. 221–228, 2021.
- MOOLCHAN, E. T. *et al.* Cocaine and Metabolite Elimination Patterns in Chronic Cocaine Users During Cessation: Plasma and Saliva Analysis. **Journal of Analytical Toxicology**, [s. l.], v. 24, n. 7, p. 458–466, 2000.



- MORETTI, E. G. *et al.* Acute crack cocaine exposure induces genetic damage in multiple organs of rats. **Environmental Science and Pollution Research International**, [s. l.], v. 23, n. 8, p. 8104–8112, 2016.
- MUTCH, R. S.; HUTSON, P. R. Levamisole in the adjuvant treatment of colon cancer. **Clinical Pharmacy**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 95–109, 1991.
- NOLAN, A. L.; JEN, K.-Y. Pathologic manifestations of levamisole-adulterated cocaine exposure. **Diagnostic Pathology**, [s. l.], v. 10, p. 48, 2015.
- PATNAIK, S. *et al.* Is Levamisole-Induced Vasculitis a Relegated Diagnostic Possibility? A Case Report and Review of Literature. **The American Journal of Case Reports**, [s. l.], v. 16, p. 658–662, 2015.
- PESSINI, L. M. *et al.* Tumefactive inflammatory leukoencephalopathy in cocaine users: Report of three cases. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, [s. l.], v. 38, 2020.  
Disponível em: [https://www.msard-journal.com/article/S2211-0348\(19\)30485-7/fulltext](https://www.msard-journal.com/article/S2211-0348(19)30485-7/fulltext).  
Acesso em: 2 maio 2022.
- POOS, G. I. *et al.* 2-AMINO-5-ARYL-2-OXAZOLINES. POTENT NEW ANORECTIC AGENTS. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 6, p. 266–272, 1963.
- POPE, J. D.; DRUMMER, O. H.; SCHNEIDER, H. G. The cocaine cutting agent levamisole is frequently detected in cocaine users. **Pathology**, [s. l.], v. 50, n. 5, p. 536–539, 2018.
- RAYMON, L. P.; ISENSCHMID, D. S. Letter to the editor: The possible role of levamisole in illicit cocaine preparations. **Journal of Analytical Toxicology**, [s. l.], v. 33, n. 9, p. 620–622, 2009.
- REHNI, A. K.; SINGH, T. G. Levamisole-induced reduction in seizure threshold: a possible role of nicotinic acetylcholine receptor-mediated pathway. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, [s. l.], v. 382, n. 3, p. 279–285, 2010.
- REID, J. 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**, [s. l.], v. 41, n. 6, p. 477–484, 1998.
- ROTHMAN, R. B. *et al.* Aminorex, fenfluramine, and chlorphentermine are serotonin transporter substrates. Implications for primary pulmonary hypertension. **Circulation**, [s. l.], v. 100, n. 8, p. 869–875, 1999.
- ROTHMAN, R. B. *et al.* Amphetamine-type central nervous system stimulants release norepinephrine more potently than they release dopamine and serotonin. **Synapse (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 32–41, 2001.

- SEILER, K. U.; WASSERMANN, O.; WENSKY, H. On the role of serotonin in the pathogenesis of pulmonary hypertension induced by anorectic drugs; an experimental study in the isolated perfused rat lung, II. Fenfluramine, mazindol, mefenorex, phentermine and R 800. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 323–330, 1976.
- 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: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 417–427, 1998.
- TALLARIDA, C. S. *et al.* Levamisole and cocaine synergism: a prevalent adulterant enhances cocaine's action in vivo. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 79, p. 590–595, 2014.
- 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**, [s. l.], v. 149, p. 145–150, 2015.
- UNODC 2022. unodc.org: Disponível em: < <https://www.unodc.org/>> Acesso em: 20 de julho de 2022
- VERONESE, F. V. *et al.* Cocaine/levamisole-induced systemic vasculitis with retiform purpura and pauci-immune glomerulonephritis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas**, [s. l.], v. 49, n. 5, p. e5244, 2016.
- VONMOOS, M. *et al.* Cognitive and neuroanatomical impairments associated with chronic exposure to levamisole-contaminated cocaine. **Translational Psychiatry**, [s. l.], v. 8, p. 235, 2018.
- WOLFORD, A. *et al.* Immune-mediated agranulocytosis caused by the cocaine adulterant levamisole: a case for reactive metabolite(s) involvement. **Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals**, [s. l.], v. 40, n. 6, p. 1067–1075, 2012.
- ZHENG, Y. *et al.* The effects of aminorex and related compounds on brain monoamines and metabolites in CBA mice. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 89–96, 1997.
- ZIMMERMANN, Z. J.; GAUVIN, D. V.; POLING, A. Discriminative stimulus effects of cocaine-levamisole combinations in Sprague-Dawley rats. **Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)**, [s. l.], v. 32, n. 8, p. 900–910, 2018.