

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

BÁRBARA BAPTISTA

**EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Justicia secunda* NA ESQUISTOSSOMOSE
MANSÔNICA EXPERIMENTAL**

SÃO CARLOS - SP

2026

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

BÁRBARA BAPTISTA

**EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Justicia secunda* NA ESQUISTOSSOMOSE
MANSÔNICA EXPERIMENTAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao curso de Bacharelado em Biotecnologia da
Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)
como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Biotecnologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Fernanda de Freitas Anibal
Coorientadora: Dr.^a Bruna Dias de Lima Fragelli

SÃO CARLOS - SP

2026

RESUMO

A esquistossomose mansônica é uma doença socialmente determinada causada por *Schistosoma mansoni*, cuja morbidade está associada principalmente à resposta inflamatória granulomatosa induzida pelos ovos retidos nos tecidos, especialmente no fígado. Embora o praziquantel seja o único fármaco para o tratamento, suas limitações reforçam a necessidade de investigação de novas estratégias terapêuticas. Nesse contexto, produtos naturais representam fontes promissoras de compostos bioativos, incluindo o extrato etanólico foliar de *Justicia secunda*, espécie amplamente utilizada na medicina popular e descrita por suas atividades biológicas. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade do extrato etanólico foliar de *J. secunda* em fibroblastos murinos NIH/3T3 e seu efeito na infecção experimental por *S. mansoni* em camundongos BALB/c. A citotoxicidade foi avaliada por ensaio de MTT e a produção de óxido nítrico pela reação de Griess. No ensaio *in vivo*, 40 camundongos foram distribuídos em quatro grupos: controle negativo, controle positivo infectado, grupo tratado com praziquantel e grupo tratado com *J. secunda*. A infecção dos animais foi realizada com 80 cercárias de *S. mansoni*, e os tratamentos ocorreram a partir do 45º dia após a infecção. Foram avaliadas a eliminação de ovos nas fezes pelo método de Kato-Katz, a recuperação de vermes adultos por perfusão do sistema porta-hepático e mesentério intestinal, e as alterações histológicas hepáticas por colorações de hematoxilina-eosina e tricrômico de Masson. O extrato apresentou baixa citotoxicidade em concentrações inferiores, com redução do metabolismo celular e aumento da produção de nitrito apenas em concentrações elevadas. *In vivo*, o tratamento com *J. secunda* não reduziu significativamente a eliminação de ovos nem a carga de vermes adultos, indicando ausência de efeito anti-helmíntico expressivo na dose testada. Entretanto, a análise histológica sugeriu menor comprometimento hepático aparente, com granulomas mais delimitados e deposição de colágeno visualmente mais organizada. Conclui-se que o extrato etanólico foliar de *J. secunda* não apresentou atividade antiesquistossomótica significativa nas condições avaliadas, mas pode apresentar potencial modulador das alterações hepáticas induzidas pela infecção, sendo necessários estudos complementares para quantificação da fibrose, avaliação imunológica e caracterização dos mecanismos envolvidos.

Palavras-chave: Esquistossomose; *Justicia secunda*; Produtos Naturais; Fibrose

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Distribuição global da esquistossomose.....	8
Figura 2	Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i>	9
Figura 3	Desenvolvimento da resposta imune na infecção por <i>Schistosoma mansoni</i>	10
Figura 4	Composição do granuloma em infecção por <i>S. mansoni</i>	12
Figura 5	Classificação dos granulomas em infecção por <i>S. mansoni</i>	12
Figura 6	Valores de EC50 da <i>Justicia secunda</i>	25
Figura 7	Metabolismo celular por MTT.....	26
Figura 8	Determinação de óxido nítrico.....	27
Figura 9	Contagem de ovos de <i>S. mansoni</i>	28
Figura 10	Recuperação de vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	28
Figura 11	Panorama da histologia hepática corada com Hematoxilina e Eosina (HE).....	29
Figura 12	Panorama da histologia hepática corada com Tricrômico de Masson (TM).....	30
Figura 13	Histologia HE e TM do fígado do controle negativo.....	30
Figura 14	Histologia HE do fígado do controle positivo.....	31
Figura 15	Histologia TM do fígado do controle positivo.....	32
Figura 16	Histologia HE do fígado do grupo praziquantel.....	33
Figura 17	Histologia TM do fígado do grupo praziquantel.....	34
Figura 18	Histologia HE do fígado do grupo <i>J. secunda</i>	35
Figura 19	Histologia TM do fígado do grupo <i>J. secunda</i>	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Delineamento experimental.....	19
----------	--------------------------------	----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	7
1. Esquistossomose.....	7
2. Epidemiologia.....	7
3. Ciclo Biológico.....	8
4. Manifestações Clínicas.....	10
5. Histopatologia.....	10
6. Tratamentos convencionais.....	13
7. Produtos naturais como novas terapias.....	14
7.1. INCT-PROBIAM Pharmaceuticals Amazônia.....	14
7.2. Extrato foliar de <i>Justicia secunda</i>	14
OBJETIVOS.....	15
1. Objetivo Geral.....	15
2. Objetivos Específicos.....	15
METODOLOGIA.....	16
1. Ensaio <i>in vitro</i>.....	16
1.1. Avaliação do metabolismo celular e determinação do EC ₅₀	16
1.2. Avaliação do estresse oxidativo por Reação de Griess.....	17
2. Ensaios <i>in vivo</i>.....	17
2.1. Extrato de <i>Justicia secunda</i>	18
2.2. Praziquantel (PZQ).....	18
2.3. Animais.....	18
2.4. Infecção.....	18
2.5. Delineamento Experimental.....	18
2.5.1. Tratamentos.....	18
2.6. Eutanásia.....	19
2.7. Análise Parasitológica.....	20
2.7.1. Contagem de ovos nas fezes.....	20
2.7.2. Recuperação de vermes adultos.....	20
2.8. Análise Histológica.....	21
2.8.1. Processamento das amostras.....	21
2.8.2. Microtomia.....	22
2.8.3. Coloração.....	22
3. Análise Estatística.....	23
4. Uso de Inteligência Artificial.....	24
RESULTADOS.....	24
1. Ensaios <i>in vitro</i>.....	24
1.1. Avaliação do metabolismo celular e determinação do EC ₅₀	24
1.2. Avaliação do estresse oxidativo por Reação de Griess.....	26

2. Ensaios <i>in vivo</i>.....	27
2.1. Contagem de ovos.....	27
2.2. Recuperação de vermes adultos.....	28
2.3. Histologia.....	29
DISCUSSÃO.....	36
CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS.....	41

INTRODUÇÃO

1. Esquistossomose

A esquistossomose, também conhecida como “xistose”, “doença dos caramujos” e “barriga d’água”, é causada por platelmintos trematódeos dioicos, ou seja, com sexos separados, do gênero *Schistosoma*. Atualmente, são conhecidas seis espécies que parasitam o homem, sendo elas, *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. mekongi* e *S. malayensis* (Siqueira, 2017). Destas espécies, o *S. mansoni* é a única existente no Brasil, sendo que as outras não são encontradas devido à inexistência de caramujos do gênero *Biomphalaria* suscetíveis à infecção, que são hospedeiros intermediários e vetores do ciclo de vida do parasita (Ross, 2002). No Brasil, apenas três espécies do vetor são encontradas: *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea* (Pinto; Grisard; Ishida, 2011).

Os vermes adultos contêm duas ventosas, utilizadas para fixação no hospedeiro e possuem dimorfismo sexual, com o macho medindo cerca de um centímetro de comprimento, corpo achatado e um canal ginecóforo para abrigar a fêmea durante o acasalamento. A fêmea possui um corpo cilíndrico medindo cerca de um centímetro e meio e têm coloração escura no tubo digestivo devido a ingestão de sangue (Rey, 2008; Pinto; Grisard; Ishida, 2011). Os ovos possuem formato oval com uma espícula utilizada para fixação nos tecidos do hospedeiro e contêm em seu interior o miracídio, larva infectante dos caramujos do gênero *Biomphalaria*. A cercária é uma larva com duas ventosas infectantes para o homem.

2. Epidemiologia

Entre as parasitoses que acometem os seres humanos, a esquistossomose é uma doença socialmente determinada das mais disseminadas no mundo e em expansão geográfica, e ocupa o segundo lugar depois da malária em importância e repercussão socioeconômica (Técnicas, 2014). Sua predominância está associada à falta de saneamento básico e acesso à água potável de comunidades de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a esquistossomose afeta 250 milhões de pessoas em 78 países e representa grande ameaça para mais de 600 milhões de indivíduos que vivem em áreas de risco. No Brasil, é responsável por mais de 90% dos casos registrados nas Américas.

Dentre todas as Américas, o Brasil é o país que apresenta maior área endêmica, com cerca de 1,5 milhão de pessoas vivendo em áreas de risco (Carneiro et al., 2025). Atualmente, estas áreas estão distribuídas mais intensamente ao longo da costa litorânea da região Nordeste e Sudeste (Figura 1), devido a condições climáticas que favorecem o ciclo de vida do parasita, condições socioeconômicas que contribuem para o surgimento de áreas de risco, e habitats de caramujos do gênero *Biomphalaria*, suscetíveis à infecção (Ministério da Saúde, 2024; Técnicas, 2014).

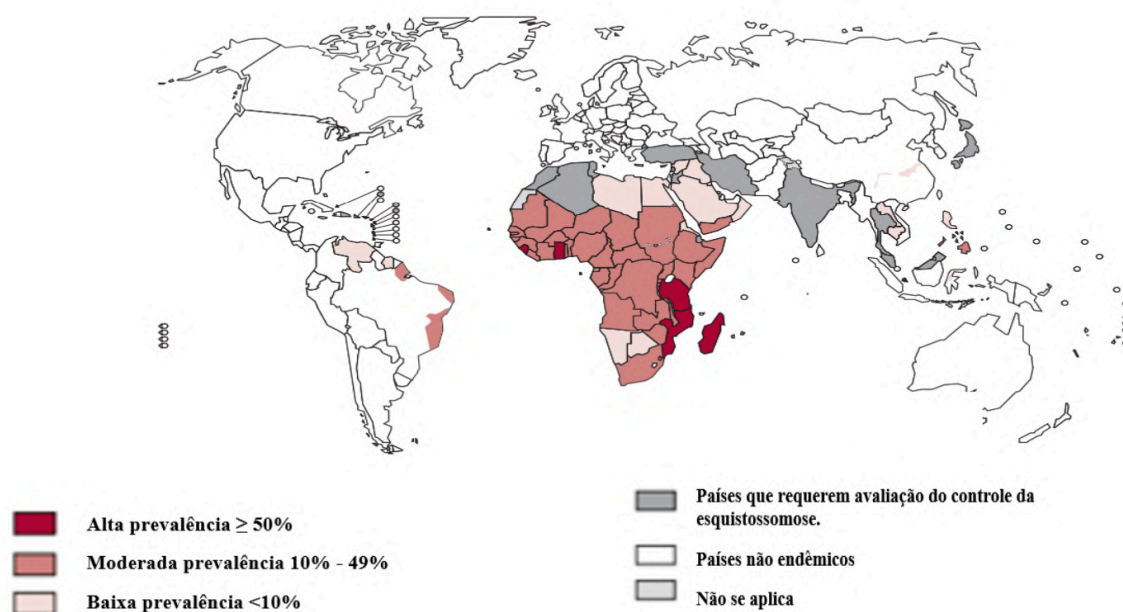


Figura 1 - Distribuição global da esquistossomose

Fonte: Adaptado do World Health Organization (WHO), 2013

Legenda: Distribuição geográfica da esquistossomose no mundo, destacando países com diferentes níveis de prevalência da doença e áreas com transmissão documentada. Observa-se a maior concentração de casos em regiões tropicais e subtropicais, especialmente no continente africano.

3. Ciclo Biológico

O ciclo biológico do *S. mansoni* (Figura 2) se inicia quando um indivíduo entra em contato com água doce onde existem cercárias de *S. mansoni* livres, que penetram ativamente na pele do homem, hospedeiro definitivo, durante um período que leva de minutos a 72 horas. Durante esse processo, as cercárias perdem a cauda gerando a forma larval denominada esquistossômulos, que caem na corrente sanguínea e/ou linfática, atingem a circulação venosa e migram ao coração e pulmões em 4 dias, onde amadurecem tornando-se mais longos e delgados, facilitando a migração pela rede vascular-pulmonar. Do pulmão, os esquistossômulos voltam ao coração e são migrados pela circulação geral até o sistema

porta-hepático onde em até quatro semanas após a infecção, se desenvolvem em vermes adultos, se diferenciam em macho e fêmea e iniciam o acasalamento (Wu, 2000; Pinto; Grisard; Ishida, 2011). Os vermes acasalados se deslocam para as veias mesentéricas e na luz intestinal a fêmea começa a oviposição a partir de 30 a 40 dias após a infecção, produzindo cerca de 300 a 400 ovos. Metade dos ovos são liberados nas fezes dos indivíduos infectados e o restante fica retido nos tecidos, principalmente, fígado e intestino, sendo responsáveis pela formação de granulomas e fibrose proveniente da resposta do sistema imune do hospedeiro (Gryseels, 2006). Os ovos liberados contêm embriões maduros que, em contato com a água, eclodem e liberam a larva ciliada miracídio que possui geotropismo negativo e fototropismo positivo, que auxilia na localização do hospedeiro intermediário. Se movimentam ativamente até encontrar os caramujos do gênero *Biomphalaria*, onde se reproduzem assexuadamente dando origem às cercárias após duas semanas, nas horas mais claras do dia, uma vez que a liberação das cercárias é induzida pela luz e temperaturas mais altas (Gordon; Griffiths, 1951). Cada miracídio originará cerca de 100.000 cercárias.

Figura 2 - Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*

Legenda: Representação esquemática do ciclo biológico de *Schistosoma mansoni*, envolvendo o homem como hospedeiro definitivo e moluscos do gênero *Biomphalaria* como hospedeiros intermediários. O ciclo inicia-se pela penetração ativa das cercárias através da pele, seguida da migração dos esquistossômulos até o sistema porta-hepático, maturação dos vermes adultos, oviposição e eliminação dos ovos nas fezes, culminando com a infecção dos moluscos e liberação de novas cercárias.

4. Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas da esquistossomose mansônica variam conforme a fase da infecção, a intensidade da carga parasitária e a resposta do organismo do hospedeiro frente à doença. A fase aguda é caracterizada por causar dermatite cercariana, febre, mal-estar, cefaleia, mialgia, dor abdominal e eosinofilia. Já na fase crônica, predominam manifestações intestinais e hepatoesplênicas (Barsoum et al., 2013). Além disso, os pacientes podem apresentar dor abdominal recorrente, diarreia, enterorragia e tenesmo. Em casos mais graves, observa-se hepatomegalia, esplenomegalia e hipertensão portal, com formação de varizes esofágicas e risco de hemorragia digestiva (Elbaz e Esmat, 2013).

5. Histopatologia

A patogênese da esquistossomose está associada a dois perfis de inflamação, a fase aguda, associada a fase inicial da infecção com predominância de uma resposta imune do tipo Th1, e a fase crônica, desenvolvida a partir da deposição de ovos pelas fêmeas nas veias mesentéricas alternando para uma resposta predominantemente Th2 (Figura 3). Após a oviposição, parte dos ovos produzidos pelas fêmeas de *S. mansoni* que não foram liberados nas fezes permanecem retidos, principalmente no tecido hepático, onde induz intensa reação granulomatosa.

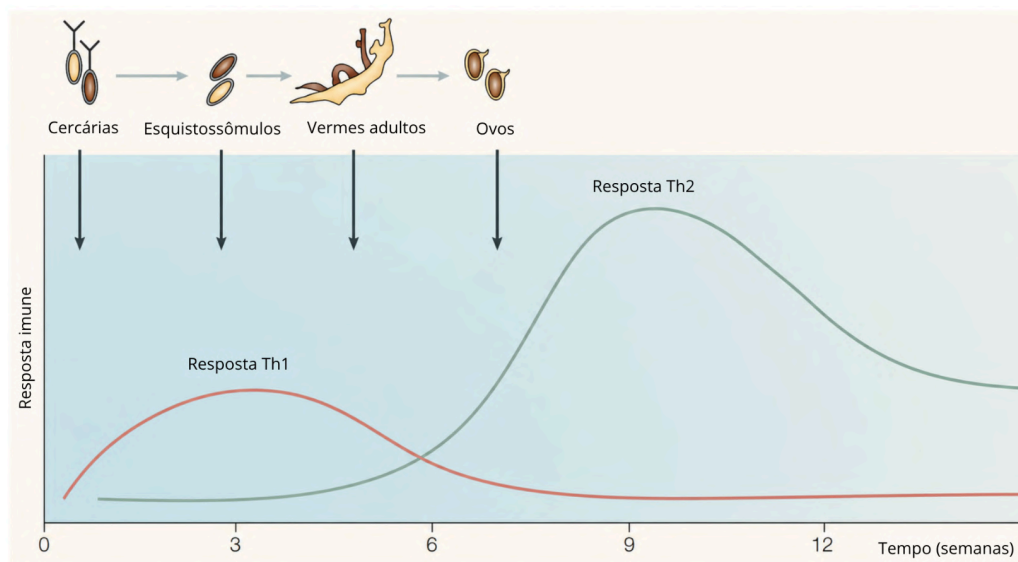


Figura 3 - Desenvolvimento da resposta imune na infecção por *Schistosoma mansoni*

Fonte: Adaptado de Dunne, D., Cooke, 2005

Legenda: Dinâmica da resposta imune durante a infecção por *Schistosoma mansoni*. A fase inicial da infecção, associada à penetração das cercárias e ao desenvolvimento de esquistossômulos e vermes adultos, é caracterizada pelo predomínio da resposta Th1. Após o início da oviposição, ocorre a transição para uma resposta

predominantemente Th2, relacionada à formação de granulomas ao redor dos ovos retidos nos tecidos e à progressão das alterações inflamatórias e fibróticas da esquistossomose mansônica.

Os granulomas hepáticos são constituídos por diferentes células imunológicas, incluindo linfócitos, eosinófilos, macrófagos e outras células inflamatórias recrutadas em resposta aos antígenos solúveis dos ovos de *S. mansoni* (Figura 4) (Zheng et al., 2020; Chen et al., 2019) e representam uma importante estratégia de defesa do hospedeiro, uma vez que restringem a dispersão dos antígenos liberados pelos ovos e minimizam danos teciduais mais intensos.

Os granulomas de *S. mansoni* são estruturas dinâmicas cuja formação segue eventos específicos associados à migração celular, interação célula-célula, célula-ovo e célula-MEC (matriz extracelular). Devido a essa complexidade, os granulomas apresentam variação morfológica, mostrando variedade de tamanhos e composição celular dependendo de seu estágio de desenvolvimento (Malta et al., 2022). Com isso, suas classificações incluem o pré-granulomatoso exsudativo (PE), estágio inicial onde ocorre o acúmulo de células no tecido do hospedeiro ao redor dos ovos do parasita; necrótico-exsudativo (NE), com maior densidade e variedade de células inflamatórias que se distribuem irregularmente em diferentes camadas com uma área necrótica central ao redor do ovo; exsudativo-produto (EP), apresentando um granuloma mais organizado e delimitado, com presença de fibras de colágeno e células inflamatórias concentradas na periferia; e produtivo (P), indicado pela pouca ou ausência de células inflamatórias e predomínio de colágeno (Figura 5).

Entretanto, a progressão desse processo inflamatório caracterizado pela deposição contínua e exacerbada de colágeno constitui um dos principais determinantes da gravidade clínica da doença, podendo culminar em hipertensão portal e outras complicações associadas à forma hepatoesplênica da esquistossomose (Sombetzki et al., 2019; Zheng et al., 2020).

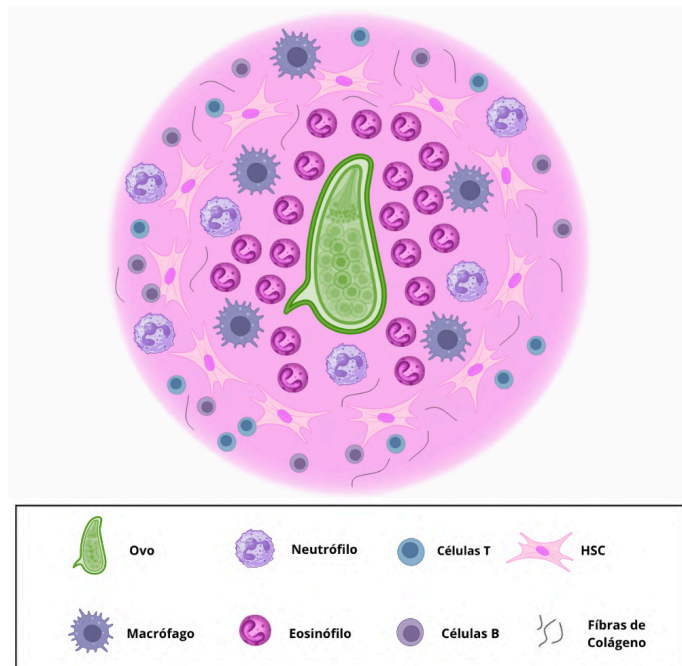


Figura 4 - Composição do granuloma em infecção por *S. mansoni*

Fonte: Adaptado de Llanwarne; Helmby, 2020

Legenda: Representação esquemática da composição celular do granuloma hepático induzido pelos ovos de *S. mansoni*. São evidenciadas diferentes populações celulares envolvidas na resposta inflamatória, incluindo eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, linfócitos e células estreladas hepáticas, além da deposição de fibras colágenas.

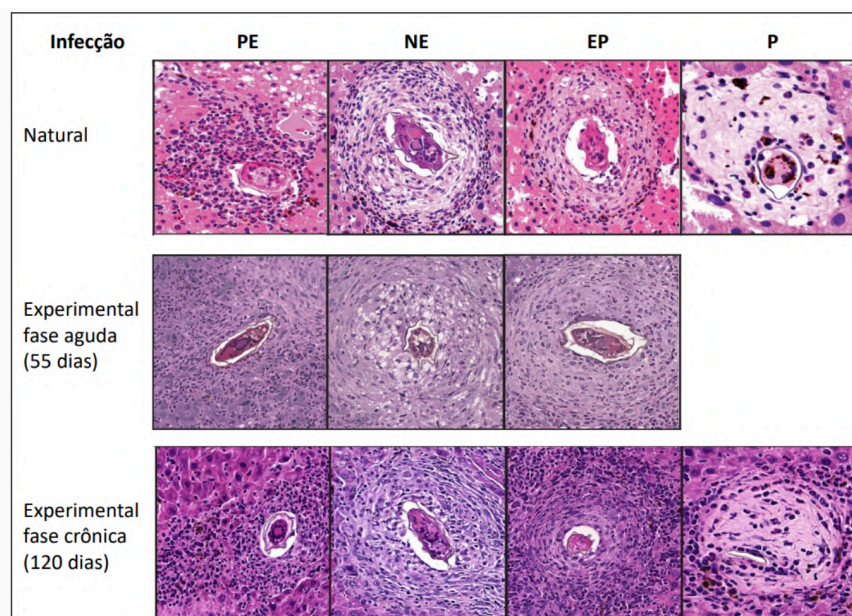


Figura 5 - Classificação dos granulomas em infecção por *S. mansoni*

Fonte: Amaral et al., 2017

Legenda: Representação dos estágios evolutivos dos granulomas: pré-granulomatoso exsudativo (PE), necrótico-exsudativo (NE), exsudativo-produto (EP) e produtivo (P), observados em infecção natural e em modelos experimentais nas fases aguda (55 dias) e crônica (120 dias).

6. Tratamentos convencionais

O Praziquantel (PZQ) é um medicamento derivado de pirazino-isoquinolina, desenvolvido na década de 1970 como um anti-helmíntico e altamente eficaz contra vermes parasitas como o *S. mansoni*, sendo o único fármaco recomendado pela Organização Mundial da Saúde (Vale, 2017).

O PZQ apresenta dois mecanismos de ação. O primeiro atua como interferente nos canais de cálcio do parasito, em que as subunidades α dos canais de cálcio, sensíveis à voltagem, foram identificados como possíveis alvos moleculares da droga, induzindo a paralisia espástica do verme, o influxo de Ca^{2+} e rompimento do tegumento dos vermes (Angelucci, 2007). O segundo mecanismo, mostra seu efeito na inibição da captação de adenosina pelos esquistossomos interferindo na necessidade obrigatória do parasita de adquirir adenosina de seu hospedeiro (E.Wolde Mussie, 1982). No entanto, foi demonstrada uma relação entre canais de Ca^{2+} e receptores de adenosina em células de outros animais, e a adenosina pode antagonizar a liberação de Ca^{2+} (Salvador-Recatalà; Greenberg, 2011).

Durante os anos e com a progressão de casos de esquistossomose no mundo, surgiram programas de administração em massa de medicamentos, como o Praziquantel, como quimioterapias de controle em áreas endêmicas para redução da intensidade da carga parasitária, e desde 2006, vem amplamente sendo utilizado como uma medida profilática e não um tratamento, principalmente nas áreas de maior prevalência (Mendonça, 2016). A dependência de um único fármaco para o tratamento de uma doença com grande significância global corre o risco de facilitar o desenvolvimento de perda de sensibilidade ao PZQ e preocupações com o surgimento de cepas parasitas que possam ser resistentes a ele (Vale, 2017). Além disso, o medicamento também apresenta algumas limitações, como a inatividade contra esquistossomos juvenis, não protege contra a reinfecção e não possui atividade anti-inflamatória e hepatoprotetora (Cioli; Pica-Mattoccia, 2003).

Nesse contexto, torna-se necessária a investigação de novas estratégias terapêuticas seguras e eficazes para o tratamento da esquistossomose mansônica, incluindo compostos bioativos de origem natural.

7. Produtos naturais como novas terapias

Os produtos naturais englobam compostos obtidos a partir de plantas, fungos, animais e microrganismos que apresentam uma diversidade nas atividades biológicas e desempenham papel fundamental na medicina tradicional desde as populações mais antigas, no tratamento de diversas enfermidades (Adegboye et al., 2021). Devido a sua composição de moléculas bioativas, o interesse da indústria farmacêutica sobre esses compostos é alto, com grande parte dos medicamentos aprovados atualmente para uso clínico, provenientes direta ou indiretamente dos produtos naturais.

No contexto epidemiológico de doenças tropicais negligenciadas, a busca por alternativas terapêuticas têm estimulado a prospecção de compostos naturais, principalmente diante das limitações apresentadas por muitos tratamentos convencionais (Adegboye et al., 2021; Medicinal Chemistry, 2024). Embora essa busca por novos medicamentos de origem natural apresente um desafio para a ciência, principalmente no que se refere a padronização da composição de moléculas bioativas nesses compostos, os avanços tecnológicos têm ampliado as possibilidades de novas metodologias para a descoberta de novos fármacos com potencial terapêutico.

7.1. INCT-PROBIAM *Pharmaceuticals Amazônia*

Nesse contexto, o INCT-PROBIAM *Pharmaceuticals Amazônia* constitui uma importante iniciativa voltada à prospecção de moléculas bioativas provenientes da biodiversidade amazônica, com potencial aplicação no desenvolvimento de estratégias terapêuticas para doenças negligenciadas. O instituto reúne pesquisadores de diferentes estados do país, promovendo a investigação de extratos brutos, óleos essenciais, bioóleos e outros produtos naturais obtidos a partir de espécies amazônicas. Entre os materiais avaliados, o extrato de *Justicia secunda* destacou-se como uma alternativa promissora, considerando suas atividades biológicas previamente descritas e seu potencial de aplicação em modelos experimentais de doenças parasitárias.

7.2. Extrato foliar de *Justicia secunda*

A planta *Justicia secunda*, espécie pertencente à família Acanthaceae, é originária da região amazônica, mas também distribuída em regiões tropicais da África, Caribe e América do Sul. Popularmente conhecida como “Bloodroot” ou “Sanguinária”, a planta recebe essas denominações devido à coloração avermelhada liberada em suas infusões. Na medicina

popular é muito utilizada no tratamento de diversas doenças como anemia, cólicas abdominais, cicatrização de feridas, epilepsia e outros transtornos mentais, devido às suas propriedades sedativas e analgésicas. (Onochie et al, 2020).

Estudos sobre a fitoquímica mostraram a presença de diversos compostos bioativos muito promissores para o desenvolvimento de fármacos com atividade antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, antioxidante e antiparasitária contra leishmaniose (Świątek et al., 2023) além de exercerem efeito hepatoprotetor. Análises cromatográficas revelaram a presença de flavonoides, compostos fenólicos, alcaloides e outros constituintes com potencial farmacológico.

Apesar do uso na medicina popular de *Justicia secunda* e das diferentes atividades biológicas já descritas, incluindo propriedades antioxidantes, antivirais, citotóxicas e inibitórias de enzimas, ainda são escassos os estudos acerca de sua aplicação em helmintos, especialmente a esquistossomose mansônica (Świątek et al., 2023; Gbolo et al., 2024). Estudos sobre o potencial biológico da *J. secunda* podem contribuir para ampliar o conhecimento sobre suas atividades farmacológicas e fornecer subsídios para o desenvolvimento de novas estratégias voltadas para o controle de doenças socialmente determinadas.

OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Analisar a toxicidade do extrato etanólico foliar de *Justicia secunda* em células de fibroblastos murinos da linhagem NIH/3T3 e seu efeito na infecção parasitária por *Schistosoma mansoni* em camundongos Balb/c.

2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do extrato etanólico foliar de *Justicia secunda* no metabolismo celular de fibroblastos murinos da linhagem NIH/3T3 e produção de óxido nítrico;
- Avaliar o efeito antiparasitário do extrato etanólico foliar de *Justicia secunda* pela presença de ovos nas fezes dos camundongos e recuperação de vermes adultos no sistema porta hepático e mesentério intestinal;

- Avaliar o perfil histológico pela presença de inflamação, fibrose e granulomas no fígado de camundongos.

METODOLOGIA

1. Ensaio *in vitro*

1.1. Avaliação do metabolismo celular e determinação do EC₅₀

Para verificar o efeito do extrato etanólico de *Justicia secunda* no metabolismo celular foi realizada uma avaliação da atividade metabólica celular e da funcionalidade das mitocôndrias por um ensaio colorimétrico. Esse teste é baseado no princípio de que células viáveis contêm desidrogenases mitocondriais que são capazes de reduzir e converter o anel tetrazólico do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), de coloração amarela, em cristais de formazan, uma substância púrpura e fortemente lipofílica que pode ser avaliada através da leitura da absorbância.

Em placas de 96 poços foram semeadas na concentração de 10⁴ células/poço, fibroblastos murinos da linhagem NIH/3T3 (ATCC, 2023) totalizando um volume final de 200 µL de células por poço. A placa foi incubada por 24h em câmara úmida com 5% de CO₂ à 37 °C. Em seguida, o composto recebido do INCT-PROBIAM *Pharmaceuticals Amazônica* foi solubilizado em DMSO puro e adicionado na placa nas concentrações de 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 e 7,8 µg/mL, exceto no controle negativo (C-), totalizando um volume de 200 µL por poço. Para o controle de diluente (C_{DMSO}) foi adicionado dimetilsulfóxido (DMSO) diluído em meio de cultura DMEM completo. Foi adicionado extran 5% para o controle de morte (C+). A placa foi incubada por mais 24h.

Em seguida os poços foram lavados 2 vezes com PBS 1X (Tampão fosfato salino: 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,15 g de Na₂HPO₄, 0,2 g de KH₂PO₄ e 1 L de água destilada) e 200 µL da solução de MTT a 0,5 mg/mL em PBS 1X mais meio DMEM incompleto e sem fenol (1:5) foram adicionados. A reação ocorreu por 3 horas a 37 °C e 5% de CO₂. Foram feitos controles Brancos contendo somente solução de MTT. Em seguida, a solução reagente foi removida e 100 µL do diluente DMSO foram adicionados por poço, seguido pela leitura da absorbância a 570 nm no espectrofotômetro (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer). O percentual de citotoxicidade foi calculado pela comparação dos dados obtidos com o grupo C- de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Metabolismo Celular (\%)} = \frac{\text{Grupo Experimental}}{\text{Média do Grupo C-}} \times 100$$

Os valores de absorvância também foram usados para calcular a EC₅₀ (concentração que induz metade do efeito) para a definição das concentrações testadas.

1.2. Avaliação do estresse oxidativo por Reação de Griess

A produção de óxido nítrico (NO) foi medida utilizando a reação de Griess, que detecta os níveis de íon nitrito (NO₂⁻) por meio da reação do nitrito com sulfanilamida em meio ácido. O composto diazo resultante reage então com N-(1-naftil) etilenodiamina di-hidroclorada (NED), formando um composto de coloração vermelha (Green et al., 1982; Saltzman, 1954). Em uma microplaca de 96 poços de fundo chato, com tratamento para cultivo e com tampa, foram inoculadas 10⁴ células/poço, fibroblastos murinos da linhagem NIH/3T3. Posteriormente a 24 horas de adesão, o composto nas concentrações 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 e 7,8 µg/mL, diluídos em DMSO, foram adicionados. Após os tempos de exposição de 24 horas, 100 µL do sobrenadante foram coletados e adicionados a uma nova placa, seguido da adição de 100 µL da solução de Griess (mistura 1:1 da solução A [sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5%] e solução B [0,1% de dicloridrato de N-1-naftiletilenodiamina]) durante 15 minutos à temperatura ambiente. A leitura da absorvância foi realizada a 540 nm em espectrofotômetro (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer). A concentração de nitrito no sobrenadante foi quantificada a partir de uma curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito em mM descritas no kit.

2. Ensaios *in vivo*

Para o desenvolvimento da pesquisa em modelo murino, o projeto foi encaminhado para a avaliação da Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e aprovado sob número de processo 1640200525.

Além disso, todo o experimento foi baseado nas recomendações dos Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e que foram realizados treinamentos de Iniciação em Ciência em Animais de Laboratório oferecido pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos, Fiocruz.

2.1. Extrato de *Justicia secunda*

As amostras do extrato etanólico foliar de *Justicia secunda* foram disponibilizadas pelo INCT-PROBIAM *Pharmaceuticals Amazônia*. O extrato foi solubilizado em DMSO 2% e filtrado. Foram administrados 550 µg/mL do composto, dose determinada utilizando os dados obtidos pelo EC₅₀ junto com dados prévios da literatura.

2.2. Praziquantel (PZQ)

Para estabelecer parâmetros comparativos sobre o tratamento proposto com o extrato de *Justicia secunda*, o Praziquantel comprimido foi administrado no grupo de referência com uma dose única de 400 mg/kg, via oral por gavagem, sendo a dosagem definida a partir de estudos na literatura (Zaia, 2016).

2.3. Animais

Foram utilizados 40 camundongos fêmeas adultas da espécie Balb/c, provenientes do ANILAB (Animais de Laboratório Criação e Comercio Ltda). Todos os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Morfologia e Patologia da Universidade Federal de São Carlos (DMP- UFSCar), com livre acesso à água e ração para roedores.

2.4. Infecção

Os camundongos foram infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* por meio de imersão caudal, mimetizando o contágio natural do parasito. Foram utilizadas larvas infecciosas (cercárias) da cepa Belo Horizonte (Minas Gerais - Brasil) mantidas no Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia (IB) da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas - SP.

2.5. Delineamento Experimental

2.5.1. Tratamentos

Os 40 camundongos foram divididos em 4 grupos com 10 animais, conforme ilustrado na Tabela 1. O primeiro grupo (CN) se refere ao controle negativo, não infectado com o *S. mansoni* e nem tratado. O segundo grupo (CP) é o controle positivo, com os animais infectados com o verme e não tratados. O terceiro grupo (PZQ) é a referência para o tratamento convencional, com os animais infectados e tratados com o Praziquantel

comprimido (Tenil®Vet - Atral Cipan) diluído em Cremofor 2% e administrado em uma dosagem única, via oral por gavagem, de 400 mg/kg, no 45º dia após a infecção (Zaia, 2016). O quarto grupo (JS) foi infectado e tratado com o extrato foliar de *Justicia secunda* diluído em DMSO 2% e água filtrada, administrado via oral, por gavagem, em 08 doses, do 45º ao 52º dia após a infecção. O composto deveria ter sido administrado durante 10 dias, mas devido a morte precoce dos animais no 53º dia, foi necessário antecipar a eutanásia. A dose do grupo experimental foi delineada a partir de estudos na literatura e ensaios prévios de toxicidade letal em modelo murino.

Grupos	Animais (n)	Dose (mg/Kg)	Tempo de administração
CN	10	-	-
CP	10	-	-
PZQ	10	400	Dose única no 45º dia após a infecção
JS	10	550	8 doses entre 45º e 52º dia após a infecção
Total	40		

Tabela 1 - Delineamento experimental

Fonte: Autoria própria

Legenda: Delineamento experimental dos grupos avaliados no ensaio *in vivo* de esquistossomose mansônica. Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais: controle negativo (CN), controle positivo infectado e não tratado (CP), grupo infectado e tratado com praziquantel (PZQ; 400 mg/kg, dose única no 45º dia após a infecção) e grupo infectado e tratado com extrato etanólico foliar de *Justicia secunda* (JS; 550 mg/kg, oito doses entre o 45º e o 52º dia após a infecção).

2.6. Eutanásia

No 53º dia após a infecção, os animais foram submetidos à eutanásia por exposição a concentrações elevadas de dióxido de carbono (CO₂) em câmara apropriada, conforme as recomendações éticas para uso de animais em pesquisa (Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação Anexo Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA 1. Definição de eutanásia”, [s.d.]). Os efeitos produzidos pelo CO₂ são concentração-dependente, em que concentrações superiores à 30% resultam na morte, por depressão excessiva do sistema nervoso central e hipóxia, devido ao deslocamento

do oxigênio durante a troca gasosa alveolar. Para a confirmação da morte, foi empregado o deslocamento cervical.

2.7. Análise Parasitológica

2.7.1. Contagem de ovos nas fezes

As fezes dos animais infectados foram coletadas e pressionadas em uma tela de nylon (filtro Helm-Test) para a separação de materiais e resíduos que possam dificultar a contagem. Em seguida, a amostra foi colocada em uma lâmina contendo uma placa perfurada com um orifício de diâmetro conhecido, com o objetivo de manter as fezes num formato cilíndrico no centro da lâmina. A lâmina foi coberta com uma lamínula de papel celofane embebido em uma solução de verde malaquita 3%, que atua na conservação das fezes e clareamento dos ovos, contribuindo para melhor visualização e contagem mais precisa. A contagem foi realizada através do microscópio óptico com a visualização dos ovos de *S. mansoni* com formato elíptico e presença de uma espícula.

Após a leitura das lâminas e contagem dos ovos, foi calculada a quantidade de ovos por grama de fezes seguindo a seguinte fórmula:

$$N^{\circ} \text{ ovos da amostra por grama de fezes} = N^{\circ} \text{ ovos encontrados na lâmina} \times 24$$

Fonte: Katz; Chaves; Pellegrino, 1972.

2.7.2. Recuperação de vermes adultos

Posteriormente à eutanásia, foi realizada a avaliação da eficácia terapêutica do tratamento proposto através da análise da carga parasitária pela recuperação dos vermes adultos por meio da perfusão do sistema porta e do mesentério intestinal. O princípio do método consiste em isolar os órgãos ou regiões a serem examinados, mediante ligaduras em determinados pontos do sistema circulatório. Em seguida, perfundir os vasos nos quais se encontram os vermes, provocando uma corrente líquida por toda extensão do capilar (Pellegrino; Silqueira, 1956). Durante o procedimento foi utilizada salina citratada (0,75% de citrato de sódio e 0,85% de cloreto de sódio) para a perfusão, de modo a impedir a coagulação de sangue e alterações nos vermes.

2.8. Análise Histológica

Durante a eutanásia, posteriormente à recuperação de vermes adultos de *S. mansoni*, foi realizada a coleta do fígado dos animais para a confecção de lâminas histológicas que foram visualizadas por meio de microscopia óptica.

Para o procedimento, os órgãos removidos foram lavados com PBS 1X, secos cuidadosamente em papel e armazenados em uma solução fixadora de formol tamponado (4 g de NaH_2PO_4 , 6,5 g de Na_2HPO_4 , 100 mL de formol e 900 mL de água destilada), permanecendo imersas por um período de 24 horas. Essa solução, rica em formaldeído, atua promovendo a preservação morfológica do tecido, interrompendo o processo de autólise celular. Após esse período, a formalina foi substituída por etanol 70%, o qual permitiu tanto o armazenamento das peças quanto a preparação para o posterior processamento histológico.

Todo o procedimento foi realizado em parceria com o Laboratório de Patologia e Biocompatibilidade (LaPBicom), no Departamento de Morfologia e Patologia na Universidade Federal de São Carlos, sob supervisão e orientação da Profa. Dra. Cynthia Aparecida de Castro.

2.8.1. Processamento das amostras

As amostras de fígado foram seccionadas com lâmina de gilete em fragmentos de tamanho padronizados para permitir um processamento uniforme. Em seguida, foi iniciado o processamento histológico, que consiste em quatro etapas sequenciais: desidratação, diafanização, impregnação e inclusão.

A etapa de desidratação consistiu na remoção gradual de água dos tecidos por meio de 8 banhos de álcool etílico de concentrações crescentes, iniciando em concentrações baixas (70%, 80%, 90%) e, posteriormente, concentrações altas (95% e 4 banhos de 100%). O tempo em cada banho foi 60 minutos e o controle de qualidade incluiu o uso de alcoômetro para verificar a pureza das soluções. Na etapa de diafanização, o álcool foi substituído por xilol, agente com alta afinidade com a parafina. Nele, foram realizados dois banhos de xilol, cada um com 60 minutos de duração, com o objetivo de tornar o tecido translúcido e preparado para a impregnação (Day, 2014). Durante a etapa de impregnação, os fragmentos foram submetidos a dois banhos de parafina líquida à 60°C, com duração de 60 minutos cada, devido ao alto número de amostras. O calor mantém a parafina em estado líquido e favorece a infiltração nas cavidades do tecido. Na última etapa, de inclusão, os cassetes foram transferidos para um becker com parafina derretida e mantidos em estufa à 60°C. As amostras

foram posicionadas, uma a uma, em moldes metálicos previamente aquecidos em placas térmicas embebidas em parafina, em estado líquido, com a superfície seccionada orientada para baixo (Day, 2014). O cassete com a identificação da amostra foi posicionado sobre o molde, completando o espaço com mais parafina garantindo que todas as cavidades fossem preenchidas, permitindo cortes mais precisos na microtomia, além de fornecer um campo histológico adequado para as análises, sem danificar a amostra. Em seguida, as amostras foram mantidas em placa refrigerada até a solidificação, para então, serem colocadas no freezer -20°C para a remoção do molde metálico.

2.8.2. Microtomia

Com os blocos de parafina prontos, fez-se o processo de microtomia, que consiste na realização de cortes finos utilizando um micrótomo. Os blocos foram mantidos em freezer -20°C e retirados apenas no momento da microtomia, com a finalidade de facilitar o corte. O primeiro passo, foi realizar o nivelamento do bloco para que os cortes fossem mais precisos, para então, realizar os cortes histológicos dos tecidos com espessura de 5 µm. As fitas geradas foram espalhadas em banho-maria, entre 38 e 42°C, para que estendessem sobre a água evitando a formação de dobras no tecido (Day, 2014; Brasil, 2012). Em seguida, fez-se a pesca com lâminas devidamente limpas e identificadas. Para cada tecido, também foram preparadas duas lâminas extras para padronização da coloração.

2.8.3. Coloração

Antes da coloração, foi realizada uma padronização utilizando as lâminas extras, com o objetivo de ajustar os tempos de exposição e efetividade dos corantes para garantir um procedimento efetivo e de qualidade. No estudo, duas colorações foram empregadas: hematoxilina e eosina (HE) e tricrômico de Masson.

Na coloração com HE, as lâminas secas foram colocadas na estufa entre 30 e 60 minutos, para melhor adesão do tecido na lâmina. Em seguida, iniciou-se o processo de desparafinização, com dois banhos de xilol, por 5 minutos cada. Para a incorporação dos corantes, as lâminas passaram por um processo de hidratação, já que os corantes são insolúveis em água. Assim, as lâminas foram imersas em uma série de solução alcoólica decrescente (100%, 95% e 70%) e água destilada, por 2 minutos cada (Brasil, 2012). O próximo passo, foi a incorporação do corante azul-violeta hematoxilina, catiônico, por 5 minutos, que se liga nas cargas negativas do tecido permitindo sua impregnação e, consequentemente, a coloração do núcleo das células e outras estruturas ácidas em azul,

violeta ou roxo. Após o banho de hematoxilina, as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada e álcool 95% por 2 minutos. O passo seguinte, foi a imersão das lâminas no corante rosa eosina, aniônico, por 3 minutos, permitindo a coloração do citoplasma e colágeno em rosa ou vermelho (Brasil, 2012). O último passo, foi a lavagem das lâminas em três banhos sequenciais de álcool 100% e dois banhos de xilol para a remoção do álcool, que não é miscível com o meio de montagem.

A coloração com Tricrômico de Masson foi feita com o Kit de Coloração Especial HistoKit - Tricrômico de Masson (EasyPath Diagnósticos Ltda., Indaiatuba, SP, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. Nele, as lâminas secas foram colocadas na estufa entre 30 e 60 minutos para favorecer a adesão do tecido. Em seguida, realizou-se a desparafinização em dois banhos de xilol, com 5 minutos cada, e a hidratação por meio de uma série alcoólica decrescente (álcool 100%, 95% e 70%) e água corrente, por 2 minutos cada. Após a lavagem em água destilada, preparou-se a solução de hematoxilina férrica, misturando os reagentes A (Harris) e B (Weigert) em partes iguais, que foi aplicada sobre o tecido por 10 minutos para coloração dos núcleos em roxo escuro. As lâminas foram lavadas em água corrente e secas, seguidas da aplicação da fucsina (reagente C) por 4 minutos, que corou citoplasma e fibras musculares em vermelho. Após nova lavagem, aplicou-se o ácido fosfomolibdico (reagente D) por 5 minutos, sem lavagem posterior, e em seguida o azul de anilina (reagente E) por 5 minutos, permitindo a marcação do colágeno em azul. Após a lavagem em água destilada, as lâminas foram desidratadas em álcool (70%, 95% e 100%) e passadas em dois banhos de xilol, finalizando com a montagem em lamínula com meio permanente.

3. Análise Estatística

Os dados obtidos neste estudo foram analisados por meio do GraphPad Prism 9.0 (San Diego, Califórnia, EUA). Os dados discrepantes foram identificados por meio da análise de Grubbs, seguida do teste de Shapiro-Wilk para verificar a natureza paramétrica ou não paramétrica dos dados. Para tanto, foi aplicado o teste ANOVA (análise de variância) aos dados paramétricos e o pós-teste de comparações múltiplas de Tukey (os resultados foram apresentados em média e desvio padrão). Para dados não paramétricos, foram usados o teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de comparação múltipla de Dunn (os resultados foram apresentados como a mediana com os quartis superior e inferior: Me [Q1; Q3]). A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$.

4. Uso de Inteligência Artificial

A ferramenta de Inteligência Artificial generativa ChatGPT (OpenAI, modelo GPT-4.0) foi utilizada como instrumento de apoio durante a elaboração do projeto, em conformidade com as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

O instrumento foi empregado para auxiliar na estruturação do projeto, refinamento, revisão textual, adequação da linguagem acadêmica, apoio à redação do plano de gestão de dados e traduções. A seleção das referências bibliográficas, a interpretação da literatura científica, a definição dos objetivos e procedimentos metodológicos, a análise crítica das informações geradas, bem como a redação, revisão e aprovação da versão final do projeto, permaneceram sob autoria do aluno.

RESULTADOS

1. Ensaios *in vitro*

1.1. Avaliação do metabolismo celular e determinação do EC₅₀

A Figura 6 mostra uma curva de dose-resposta que representa a relação entre o logaritmo das concentrações do extrato etanólico das folhas de *Justicia secunda* com a viabilidade celular. O extrato etanólico apresentou baixa citotoxicidade, não sendo suficiente para promover redução de 50% da viabilidade celular nas concentrações testadas. Dessa forma, foi necessário ampliar a faixa de concentrações testadas, utilizando concentrações superiores a 250 µg/mL, a fim de possibilitar o ajuste da curva sigmoideal e a estimativa do valor de EC₅₀.

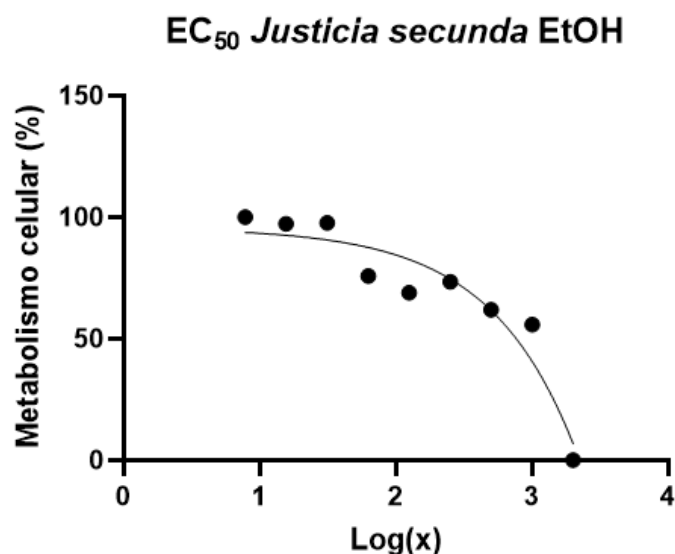


Figura 6 - Valores de EC₅₀ da *Justicia secunda*

Fonte: Autoria própria

Legenda: Curva dose-resposta utilizada para estimar a concentração efetiva capaz de reduzir em 50% o metabolismo celular (EC₅₀) de fibroblastos murinos NIH/3T3 expostos ao extrato etanólico das folhas de *Justicia secunda*. A ampliação da faixa de concentrações permitiu o ajuste da curva sigmoideal para determinação do valor estimado de EC50.

Os dados obtidos da avaliação do metabolismo celular por MTT (Figura 7) foram transformados em porcentagem em relação ao grupo controle (C-). A avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico de *Justicia secunda* mostrou que nas menores concentrações testadas (7,8 - 62,5 µg/mL) os valores se mantiveram próximos ao observado no grupo controle negativo. A partir de 125 µg/mL, observou-se uma tendência de redução do metabolismo celular, tornando mais evidente nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL, em que se mostra significativo. A maior concentração avaliada promoveu alta redução do metabolismo celular, atingindo valores próximos ao zero. O controle de diluente também foi analisado e não promoveu redução significativa da viabilidade celular.

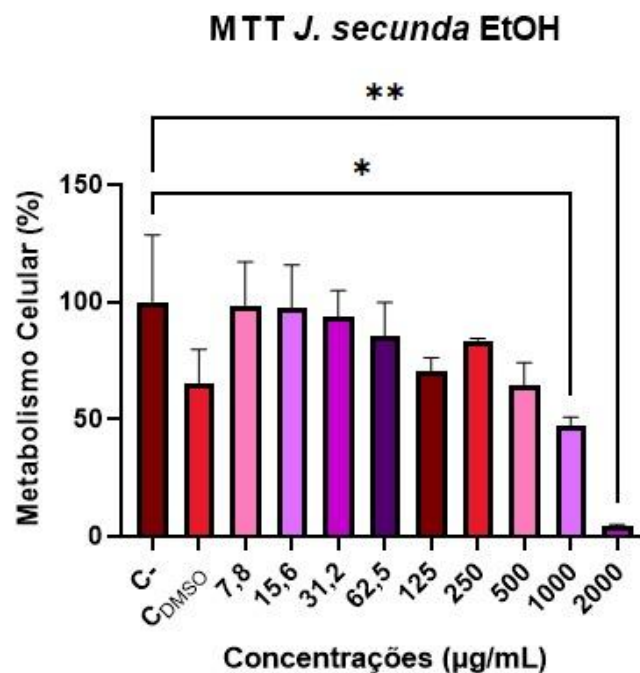


Figura 7 - Metabolismo celular por MTT

Fonte: Autoria própria

Legenda: Avaliação do metabolismo celular de fibroblastos murinos NIH/3T3 após exposição ao extrato etanólico de *Justicia secunda* por meio do ensaio de MTT. Os resultados foram expressos como porcentagem em relação ao controle negativo (C-). (*) vs C-; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

1.2. Avaliação do estresse oxidativo por Reação de Griess

A avaliação da produção indireta de óxido nítrico pela Reação de Griess (Figura 8) demonstrou que o extrato de *J. secunda* não promoveu a produção de nitrito nas concentrações de 7,8 - 500 µg/mL. Entretanto, nas concentrações superiores a 500 µg/mL, há uma produção excessiva de nitrito, sendo significativa em 2000 µg/mL. No controle de diluente não houve produção de nitrito, mostrando que apenas o composto testado apresenta toxicidade.

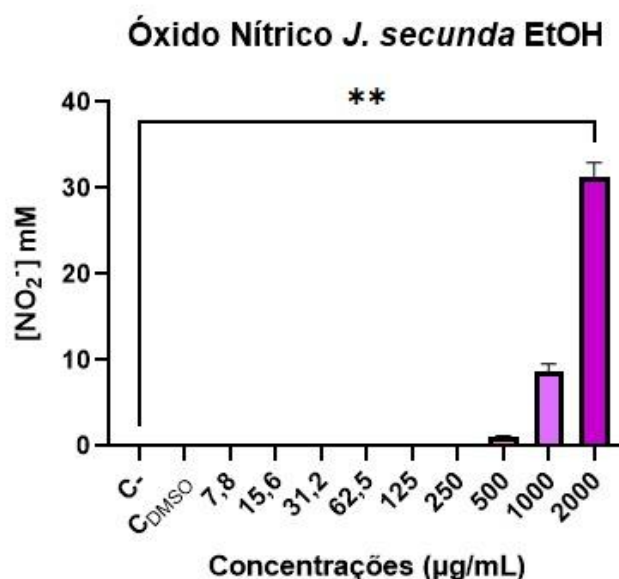


Figura 8 - Determinação de óxido nítrico

Fonte: Autoria própria

Legenda: Determinação indireta da produção de óxido nítrico por fibroblastos murinos NIH/3T3 expostos ao extrato etanólico de *Justicia secunda*, por meio da quantificação de nitrito utilizando a reação de Griess. (*) vs C-; * p ≤ 0,05.

2. Ensaios *in vivo*

2.1. Contagem de ovos

Na contagem de ovos por grama de fezes, observou-se que os grupos tratados com Praziquantel (PZQ) e extrato de *J. secunda* (JS) apresentaram médias inferiores às observadas no grupo controle positivo (CP). Em relação ao CP, foram observadas reduções de 37,43% e 23,81%, respectivamente, na eliminação de ovos para os grupos PZQ e JS. Embora não haja indicação de significância, a diminuição de ovos no grupo JS indica que possui efeito na quantidade de ovos liberados, sendo necessário dosagens maiores para que essa redução seja significativa. Observou-se, ainda, elevada dispersão dos dados entre os animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais, evidenciada pelos desvios apresentados na (Figura 9).

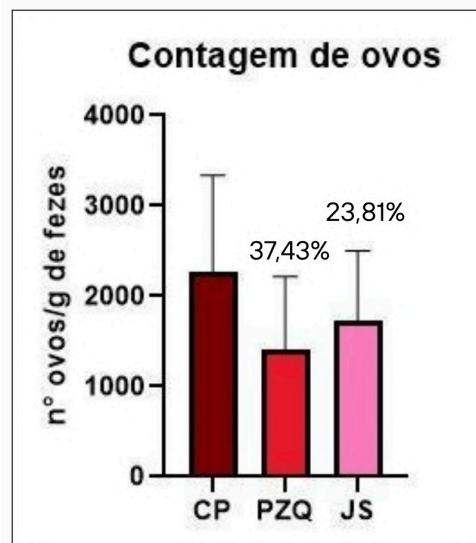


Figura 9 - Contagem de ovos de *S. mansoni*

Fonte: Autoria própria

Legenda: Número de ovos de *Schistosoma mansoni* por grama de fezes obtido pelo método de Kato-Katz nos grupos controle positivo (CP), tratado com praziquantel (PZQ) e tratado com extrato etanólico de *Justicia secunda* (JS).

2.2. Recuperação de vermes adultos

Na recuperação de vermes adultos (Figura 10), observou-se uma diferença significativa entre os grupos CP e PZQ, indicando que o praziquantel foi eficaz na redução da carga parasitária, como esperado, com redução de 55,76%. Por outro lado, o grupo tratado com o extrato etanólico de *J. secunda* não apresentou redução significativa na quantidade de vermes adultos recuperados, mas reduziu em 23,96% da carga parasitária.

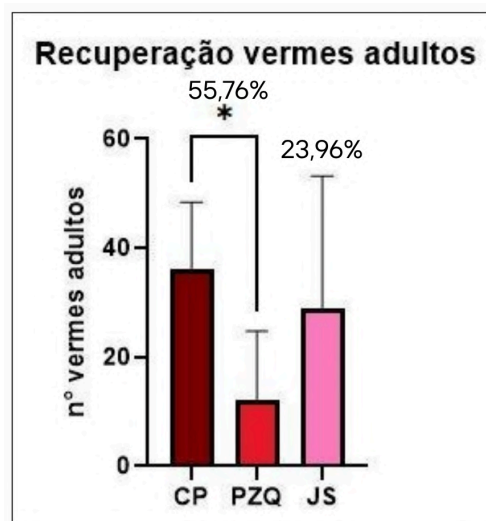


Figura 10 - Recuperação de vermes adultos de *S. mansoni*

Fonte: Autoria própria

Legenda: Número de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* recuperados por perfusão do sistema porta-hepático e do mesentério intestinal dos camundongos infectados. Observou-se redução significativa da carga parasitária apenas no grupo tratado com praziquantel (PZQ) em comparação ao controle positivo (CP), enquanto o grupo tratado com *Justicia secunda* (JS) não apresentou diferença significativa. (*) vs CP; * $p \leq 0,05$.

2.3. Histologia

A análise histológica dos cortes hepáticos corados com hematoxilina e eosina (HE) e tricrômico de masson (TM) revelaram diferenças morfológicas entre os grupos experimentais observadas nas Figuras 11 e 12.

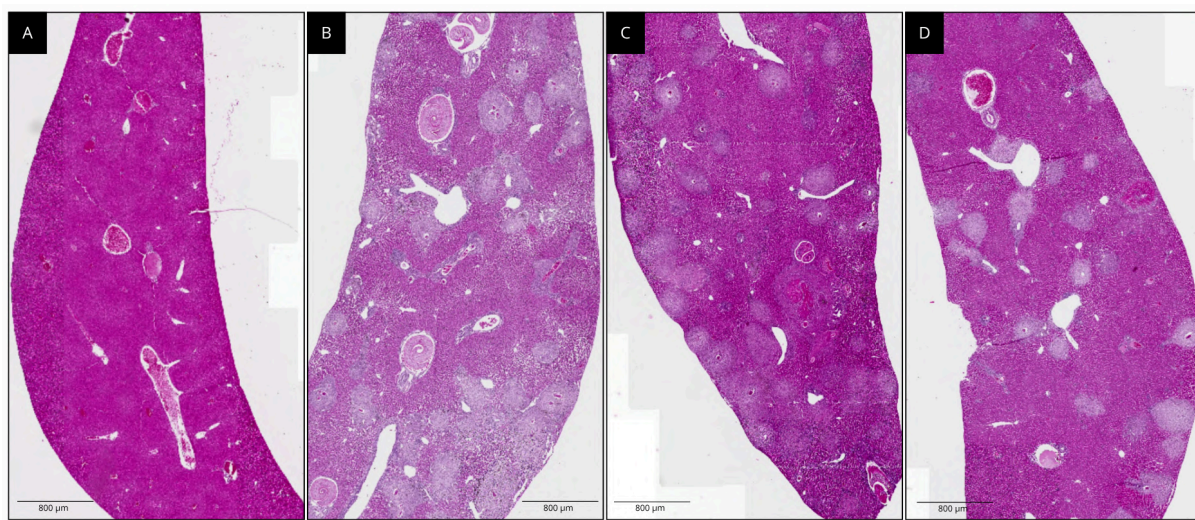


Figura 11 - Panorama da histologia hepática corada com Hematoxilina e Eosina (HE)

Fonte: Autoria própria

Legenda: (A) Controle negativo; (B) Controle positivo; (C) grupo tratado com Praziquantel; e (D) grupo tratado com o extrato foliar de *Justicia secunda*. A coloração por HE permitiu a avaliação da arquitetura hepática, da distribuição dos granulomas periovulares e do infiltrado inflamatório associado à infecção por *Schistosoma mansoni*.

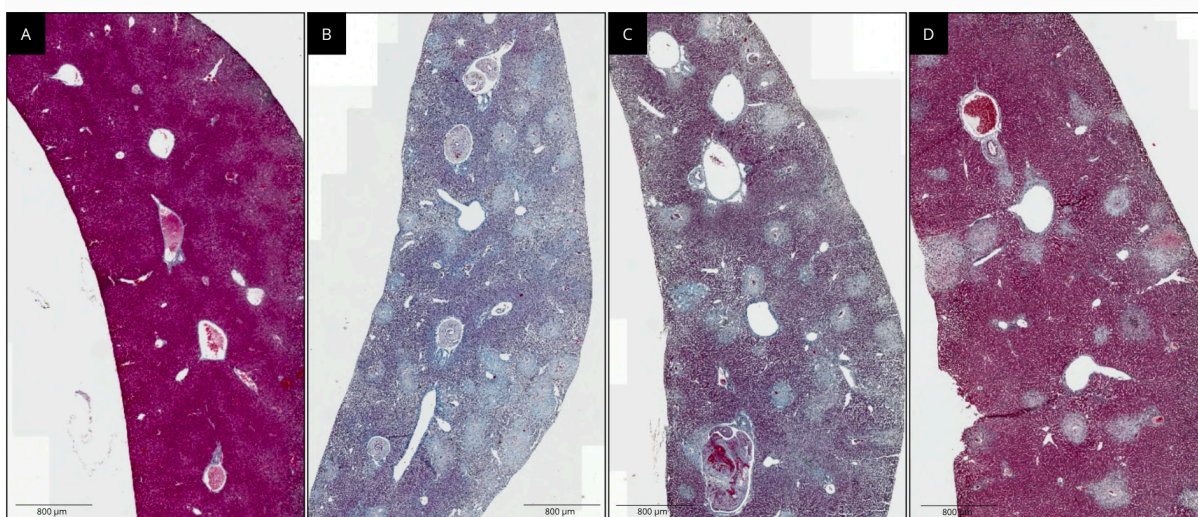


Figura 12 - Panorama da histologia hepática corada com Tricrômico de Masson (TM)

Fonte: Autoria própria

Legenda: (A) Controle negativo; (B) Controle positivo; (C) grupo tratado com Praziquantel; e (D) grupo tratado com o extrato foliar de *Justicia secunda*. A coloração pelo Tricrômico de Masson permitiu a avaliação qualitativa da deposição de fibras colágenas e da fibrose associada aos granulomas induzidos pelos ovos de *Schistosoma mansoni*.

Na Figura 13, é observado o tecido do grupo CN com a preservação da estrutura hepática, presença de vasos sanguíneos e ausência de deposição de colágeno.

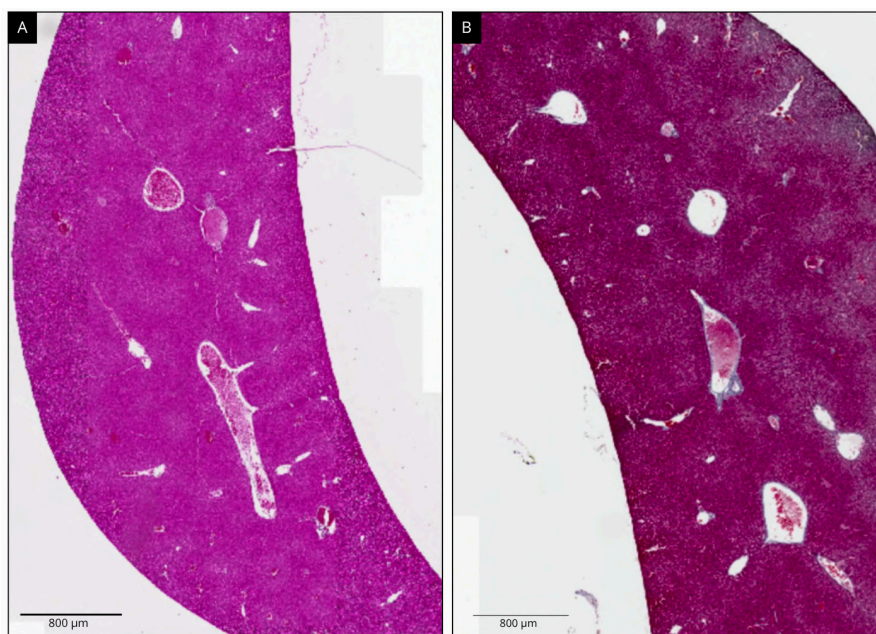


Figura 13 - Histologia HE e TM do fígado do controle negativo

Fonte: Autoria própria

Legenda: Fotomicrografias de cortes histológicos hepáticos corados por hematoxilina e eosina (HE) do grupo controle negativo (CN). (A) Visão panorâmica do tecido hepático corado com HE evidenciando arquitetura

preservada no aumento de 800 μm ; (B) Visão panorâmica do tecido hepático corado com TM evidenciando ausência de deposição de colágeno no aumento de 800 μm .

A Figura 14 mostra o corte histológico corado com HE do grupo CP, não tratado. Nele, é possível identificar na Figura 14A, um comprometimento acentuado do tecido, caracterizado pelas regiões esbranquiçadas provenientes de granulomas celulares destacados em círculos amarelos. Além disso, também foi observado a presença de diversos vermes adultos circulados em verde. Na figura 14B, mostra a classificação dos granulomas do CP, com predomínio de granulomas exsudativo-produtivo, caracterizado por granulomas delimitados e organizados, concentração de células inflamatórias na periferia e presença de fibras de colágeno. A figura 14C evidencia a presença de vermes adultos no tecido hepático.

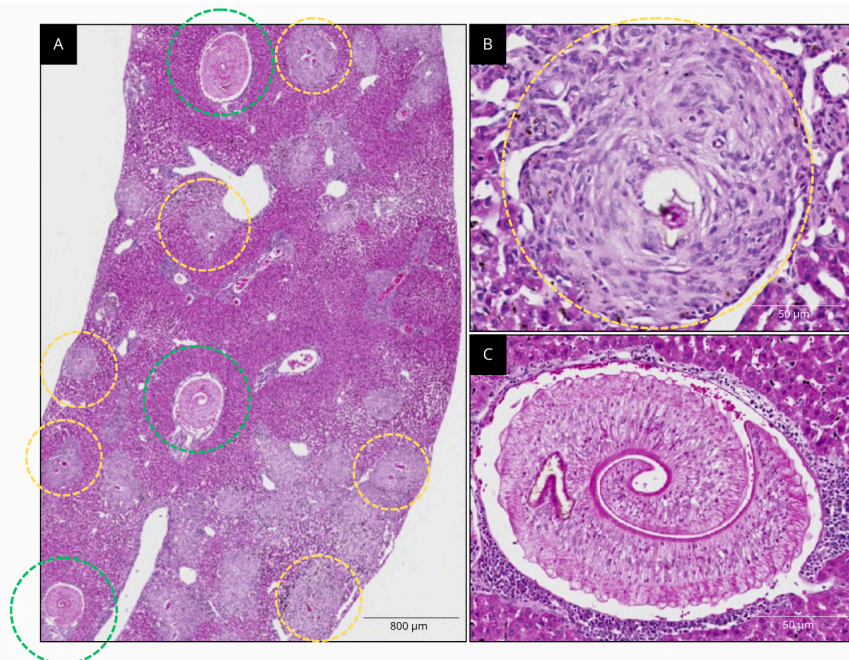


Figura 14 - Histologia HE do fígado do controle positivo

Fonte: Autoria própria

Legenda: Fotomicrografias de cortes histológicos hepáticos corados por hematoxilina e eosina (HE) do grupo controle positivo (CP). (A) Visão geral do fígado evidenciando extenso comprometimento tecidual pela presença de granulomas, destacados em amarelo e vermes destacados em verde; (B) Predomínio de granulomas exsudativo-produtivo no grupo CP com granulomas organizados, poucas células inflamatórias na periferia e concentração de fibras de colágeno; (C) Presença de grande quantidade de vermes adultos.

A Figura 15 mostra o corte histológico corado com TM do controle positivo (CP), não tratado. Nele, é possível identificar na Figura 15A, altas concentrações de áreas fibróticas pela presença de granulomas fibrocelulares e alta deposição de colágeno e presença de vermes

destacados em círculos vermelhos. A Figura 15B evidencia granulomas desorganizados e alta fibrose e a Figura 15C mostra a presença de vermes em vários animais no grupo infectado.

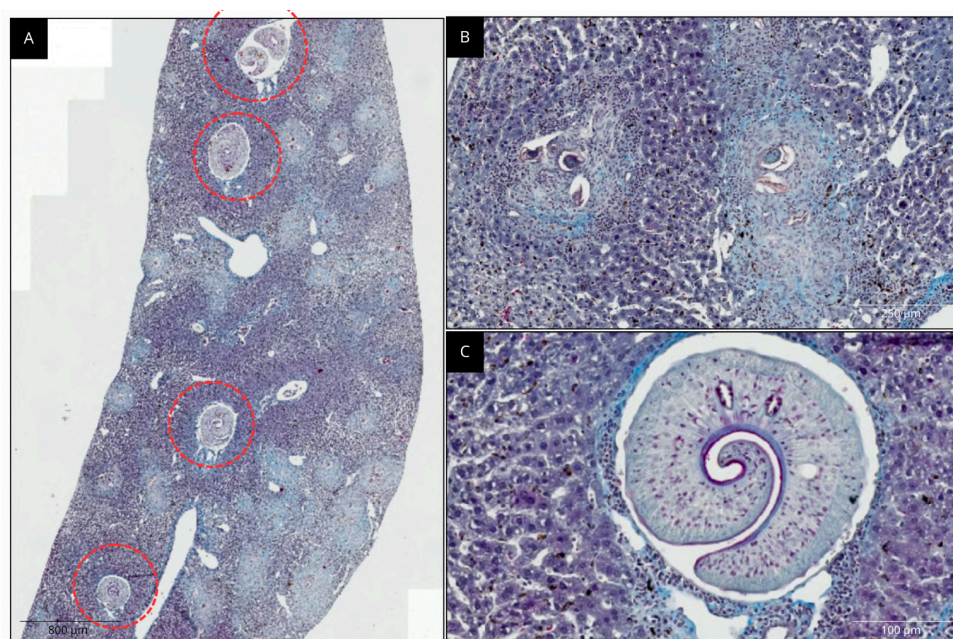


Figura 15 - Histologia TM do fígado do controle positivo

Fonte: Autoria própria

Legenda: Fotomicrografias de cortes histológicos hepáticos corados por tricrômico de masson (TM) do grupo controle positivo (CP). (A) Visão geral do fígado evidenciando extenso comprometimento tecidual e áreas de fibrose pela presença de granulomas e vermes, destacados em vermelho; (B) Predomínio de granulomas desorganizados e alta deposição de colágeno (C) Presença de grande quantidade de vermes adultos.

A Figura 16 mostra o corte histológico corado com HE do grupo tratado com PZQ. Nele, é possível identificar na Figura 16A, um comprometimento acentuado do tecido, como no grupo CP, caracterizado pelas regiões esbranquiçadas provenientes de granulomas. Além disso, também foi observado a presença de diversos vermes adultos circulados em verde. Na figura 16B, mostra a classificação dos granulomas do PZQ com predomínio de granulomas exsudativo-produtivo, caracterizado por granulomas delimitados e organizados, concentração de células inflamatórias na periferia e presença de fibras de colágeno. A figura 16C evidencia a presença de vermes adultos no tecido hepático.

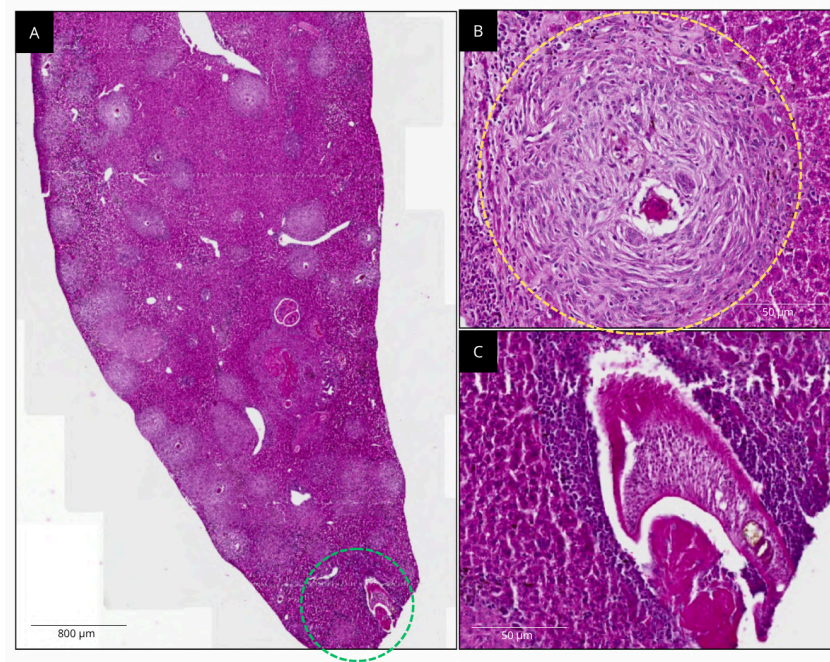


Figura 16 - Histologia HE do fígado do grupo praziquantel

Fonte: Autoria própria

Legenda: Fotomicrografias de cortes histológicos hepáticos corados por hematoxilina e eosina (HE) do grupo praziquantel (PZQ). (A) Visão geral do fígado evidenciando extenso comprometimento tecidual pela presença de granulomas e vermes destacados em verde; (B) Predomínio de granulomas exsudativo-produtivo no grupo PZQ com granulomas organizados, poucas células inflamatórias na periferia e concentração de fibras de colágeno; (C) Presença de grande quantidade de vermes adultos.

A Figura 17 mostra o corte histológico corado com TM do grupo PZQ. Nele, é possível identificar na Figura 17A, altas concentrações de áreas fibróticas pela presença de granulomas fibrocelulares e alta deposição de colágeno e presença de vermes destacados em círculos verdes. As Figuras 17B e 17C evidenciam granulomas desorganizados e fibrose hepática.

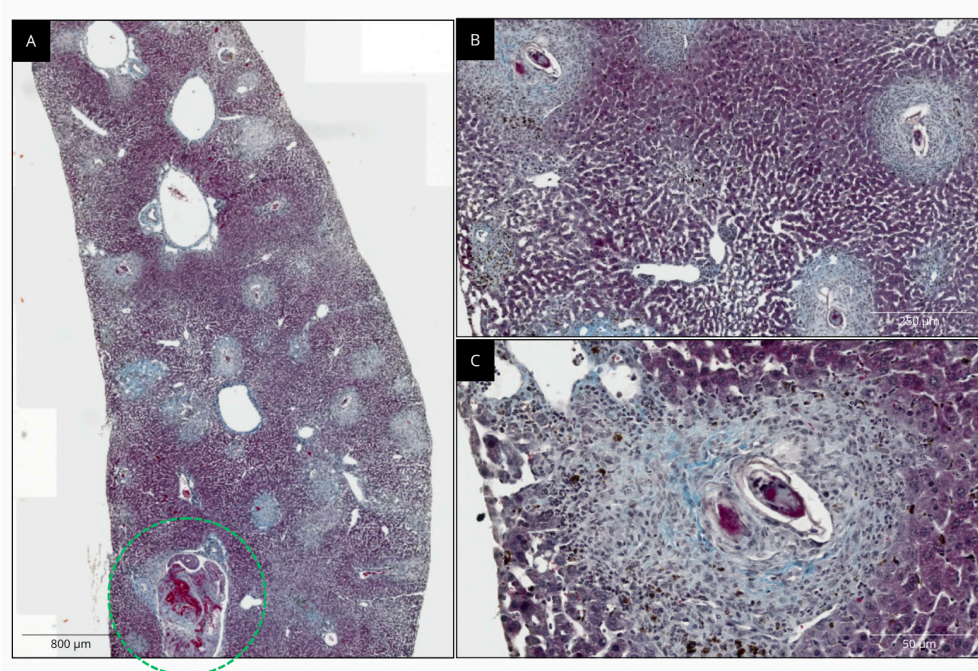


Figura 17 - Histologia TM do fígado do grupo praziquantel

Fonte: Autoria própria

Legenda: Fotomicrografias de cortes histológicos hepáticos corados por tricrômico de masson (TM) do grupo praziquantel (PZQ). (A) Visão geral do fígado evidenciando extenso comprometimento tecidual e áreas de fibrose pela presença de granulomas e vermes, destacados em verde; (B) e (C) Predomínio de granulomas desorganizados e alta deposição de colágeno.

A Figura 18 mostra o corte histológico corado com HE do grupo JS. A Figura 18A demonstra visualmente menor comprometimento hepático em relação ao grupo CP e PZQ. Na figura 18B e 18C, mostra a classificação dos granulomas do grupo JS com predomínio de granulomas exsudativo-produtivo, caracterizado por granulomas delimitados e organizados, concentração de células inflamatórias na periferia e presença de fibras de colágeno.

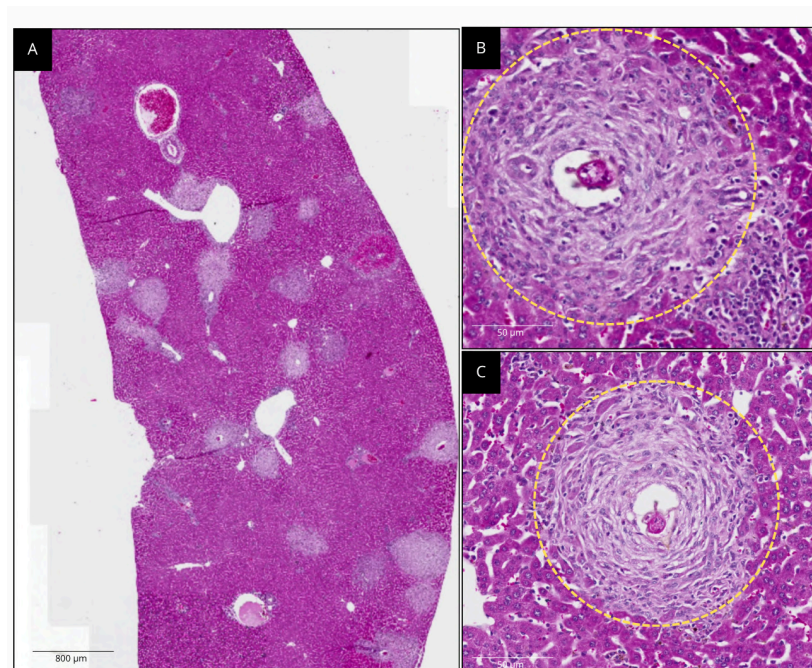


Figura 18 - Histologia HE do fígado do grupo *J. secunda*

Fonte: Autoria própria

Legenda: Fotomicrografias de cortes histológicos hepáticos corados por hematoxilina e eosina (HE) do grupo tratado com o extrato etanólico de *Justicia secunda* (JS). (A) Visão geral do tecido hepático evidenciando pouco comprometimento hepático; (B) e (C) Predomínio de granulomas exsudativo-produto com granulomas organizados, poucas células inflamatórias na periferia e concentração de fibras de colágeno.

A Figura 19 mostra o corte histológico corado com TM do grupo JS. Nele, é possível identificar na Figura 19A, poucas concentrações de áreas fibróticas pela presença de granulomas fibrocelulares destacado pelas regiões clara, e predomínio de grande área avermelhada mostrando áreas de integridade do tecido. As Figuras 19B e 19C evidenciam granulomas muito bem organizados e delimitados.

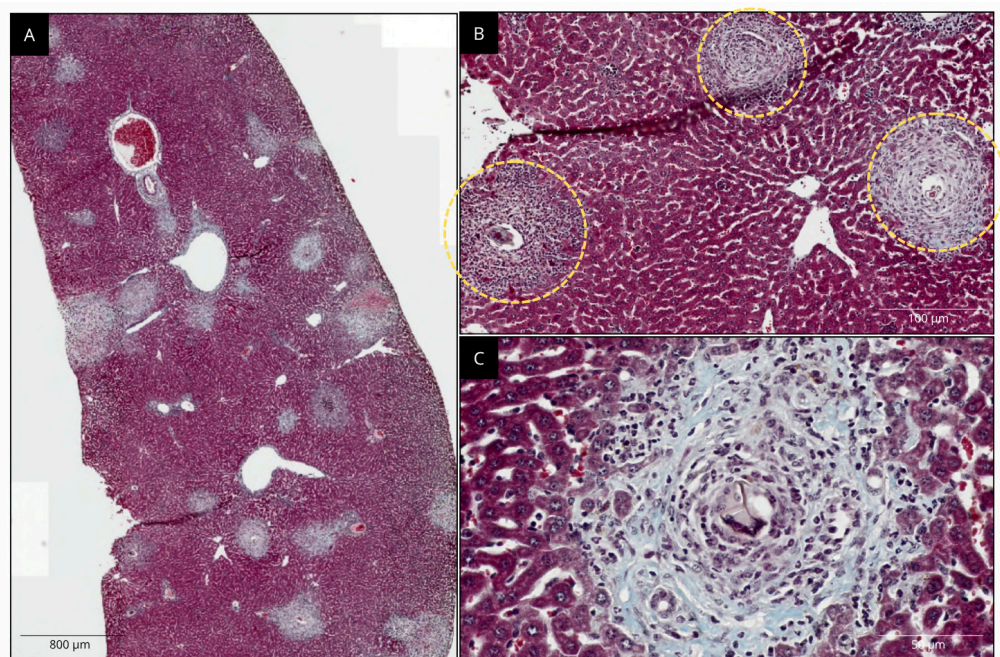


Figura 19 - Histologia TM do fígado do grupo *J. secunda*

Fonte: Autoria própria

Legenda: Fotomicrografias de cortes histológicos hepáticos corados por tricrômico de masson (TM) do grupo *Justicia secunda* (JS). (A) Visão geral do fígado evidenciando poucas áreas fibróticas; (B) e (C) Predomínio de granulomas organizados e bem delimitados.

DISCUSSÃO

No ensaio *in vitro*, o extrato etanólico foliar de *Justicia secunda* apresentou redução do metabolismo celular de fibroblastos murinos NIH/3T3 apenas em concentrações elevadas, especialmente acima de 1000 µg/mL. Esse resultado sugere que, nas condições avaliadas, o extrato apresenta baixa citotoxicidade nas concentrações inferiores, mas passa a comprometer o metabolismo celular em doses mais altas. Esse comportamento é compatível com estudos prévios que avaliaram diferentes extratos de *J. secunda* em linhagem VERO, derivada de rim de macaco-verde-africano, nos quais a citotoxicidade também foi observada apenas em concentrações superiores a 1000 µg/mL (Świątek et al., 2023). Dessa forma, os dados reforçam a ideia de que a toxicidade do extrato é concentração-dependente, o que é esperado para produtos naturais complexos, compostos por diferentes classes de metabólitos secundários. Além da redução do metabolismo celular, foi observado aumento da produção de óxido nítrico nas maiores concentrações do extrato, indicando estresse oxidativo. Esse achado, juntamente com estudos prévios que mostram a atividade antioxidante do extrato, sugerem que essa atividade pode ter contribuído para a hepatoproteção (Onochie et al, 2020).

Nos parâmetros parasitológicos *in vivo*, a concentração utilizada do extrato de *J. secunda* não foi eficiente na redução significativa da carga parasitária de *S. mansoni*, considerando tanto a contagem de ovos nas fezes quanto a recuperação de vermes adultos no sistema porta-hepático e mesentério intestinal. Esse resultado sugere que, nas condições experimentais avaliadas, o extrato não apresentou efeito anti-helmíntico direto expressivo contra vermes adultos de *S. mansoni*. Esse achado difere de estudos anteriores que demonstraram atividade antiparasitária de compostos ou extratos de *J. secunda* contra protozoários, como *Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani* e *Trypanosoma brucei* (Flore et al., 2023), além de estudos com *Plasmodium berghei* em modelo murino (Adeyemi et al., 2024). Entretanto, essa diferença pode ser explicada pelas particularidades biológicas dos parasitos avaliados. Protozoários e helmintos apresentam organização celular, metabolismo, estruturas de superfície e mecanismos de sobrevivência muito distintos. Assim, a atividade contra protozoários não necessariamente se traduz em ação esquistossomocida contra vermes adultos de *S. mansoni*, especialmente considerando a complexidade do tegumento do parasito e sua capacidade de adaptação ao ambiente vascular do hospedeiro (Wilson; Jones, 2021).

Embora o PZQ seja o fármaco de escolha para o tratamento da esquistossomose, a redução da contagem de ovos nas fezes não foi significativa e a recuperação de vermes adultos indicou apenas redução parcial da carga parasitária. Esse resultado, associado à morte prematura dos animais por volta do 53º dia após a infecção, sugere que a infecção apresentou alta virulência da cepa. Estudos prévios demonstram que a eficácia do praziquantel pode ser influenciada pela intensidade da infecção, pela carga parasitária inicial, pela linhagem do parasito, pelo tempo de tratamento e pelo perfil de resposta do hospedeiro (Utzing et al., 2000; Lamberton; Faust; Webster, 2017; Miranda et al., 2022). Além disso, mesmo após o tratamento, vermes sobreviventes podem manter alguma atividade reprodutiva, ainda que reduzida, contribuindo para a continuidade da eliminação de ovos e manutenção da resposta inflamatória tecidual (Lamberton; Faust; Webster, 2017).

Nesse contexto, a baixa redução na oviposição não deve ser interpretada isoladamente como resistência ao praziquantel, mas sim como uma resposta terapêutica limitada dentro de um modelo de alta gravidade. O PZQ atua principalmente sobre vermes adultos, mas não apresenta ação direta sobre ovos já depositados nos tecidos e não possui efeito anti-inflamatório ou hepatoprotetor relevante. Assim, mesmo quando ocorre redução da carga de vermes, os ovos previamente retidos no fígado continuam liberando antígenos solúveis, mantendo a formação de granulomas e a ativação de vias inflamatórias e fibróticas. Isso ajuda

a explicar a persistência de alterações histopatológicas importantes no grupo tratado com PZQ, incluindo granulomas fibrocelulares e deposição de colágeno (Lamberton; Faust; Webster, 2017; Justin Komguep Nono et al., 2020).

A análise histológica confirmou o estabelecimento da esquistossomose mansônica experimental, evidenciado pela presença de granulomas hepáticos, infiltrado inflamatório e deposição de colágeno nos grupos infectados. Os granulomas são lesões clássicas da esquistossomose e se formam em resposta aos antígenos solúveis liberados pelos ovos retidos no tecido hepático. Inicialmente, essa resposta possui caráter protetor, pois contribui para isolar os antígenos do ovo e limitar danos difusos ao tecido. No entanto, a progressão e manutenção da resposta granulomatosa favorecem a ativação de fibroblastos e células estreladas hepáticas, resultando em deposição excessiva de matriz extracelular, fibrose periovular e comprometimento progressivo da arquitetura hepática. Dessa forma, a gravidade da esquistossomose está fortemente associada não apenas à presença do parasito adulto, mas principalmente à intensidade e à regulação da resposta inflamatória contra os ovos (Sombetzki et al., 2019; Zheng et al., 2020).

No grupo controle positivo, os achados histológicos demonstraram alto comprometimento hepático, com granulomas desorganizados, presença de células inflamatórias, deposição desorganizada de fibras colágenas e presença de vermes adultos em cortes hepáticos. A identificação de vermes adultos no fígado é um achado incomum, uma vez que esses parasitos normalmente se localizam no sistema porta e nas veias mesentéricas. No entanto, esse achado pode estar relacionado à virulência da cepa e a presença desses vermes em vasos associados ao tecido hepático amostrado. De todo modo, esse resultado reforça a intensidade do quadro infeccioso no modelo experimental e ajuda a explicar a mortalidade precoce dos animais (Utzing et al., 2000; Lamberton; Faust; Webster, 2017; Miranda et al., 2022).

No grupo tratado com *J. secunda*, apesar da ausência de redução parasitológica significativa, observou-se menor comprometimento hepático, visualmente menor área fibrótica e presença de granulomas mais bem delimitados e organizados. Esse resultado sugere que o extrato pode ter atuado mais intensamente sobre a resposta do hospedeiro do que sobre o parasito propriamente dito. O extrato não demonstrou efeito anti-helmíntico evidente na dose testada, mas pode ter exercido efeito hepatoprotetor, antioxidante e anti-inflamatório, reduzindo parcialmente a intensidade da lesão hepática associada à infecção. Essa interpretação é coerente com estudos que descrevem propriedades hepatoprotetoras de *J. secunda* em modelos de toxicidade hepática induzida por tetracloreto de carbono (Anyasor;

Moses; Kale, 2020), bem como com estudos em infecção por *Plasmodium berghei*, nos quais o extrato etanólico de *J. secunda* foi associado à redução de estresse oxidativo e melhora de parâmetros hepáticos (Adeyemi et al., 2024). A presença de granulomas mais organizados no grupo *J. secunda* também pode indicar uma modulação do processo inflamatório, e não necessariamente ausência de lesão. Na esquistossomose, a organização granulomatosa pode representar uma tentativa de contenção dos antígenos dos ovos e remodelamento tecidual. Entretanto, quando acompanhada de deposição intensa e persistente de colágeno, essa resposta pode evoluir para fibrose. Por isso, a observação qualitativa de granulomas mais delimitados e colágeno, aparentemente mais organizado, é promissora. Para isso, seria necessário quantificar a área dos granulomas e medir a proporção de tecido hepático lesionado.

A resposta imune na esquistossomose envolve uma transição entre uma resposta inicial predominantemente Th1 e uma resposta posterior Th2, induzida principalmente pela deposição de ovos. Citocinas associadas ao perfil Th2, como IL-4, IL-5 e IL-13, participam da formação granulomatosa, recrutamento celular e ativação de vias pró-fibróticas. Além disso, estudos recentes apontam a participação de vias como IL-33/ST2 no desenvolvimento da fibrose induzida por granulomas de *S. mansoni* (Maggi et al., 2023). Outros mecanismos, incluindo regulação por microRNAs, metabolismo mitocondrial, estresse oxidativo e ativação de células estreladas hepáticas, também têm sido investigados como alvos terapêuticos para reduzir a progressão da fibrose hepática na esquistossomose (He et al., 2017; Luo; Shen, 2020). Dessa forma, os resultados histológicos observados no grupo *J. secunda* levantam a hipótese de que o extrato possa interferir em uma ou mais dessas vias, modulando a resposta inflamatória e a deposição de matriz extracelular.

Outro aspecto importante é que o extrato utilizado corresponde a uma mistura complexa de compostos. Assim, não é possível identificar qual metabólito ou conjunto de metabólitos seria responsável pelo possível efeito hepatoprotetor observado. A caracterização química do extrato utilizado neste estudo seria fundamental para comparar sua composição com a descrita na literatura e para orientar futuros ensaios com frações ou compostos isolados. Essa etapa também permitiria avaliar se os compostos com atividade antiparasitária descritos em estudos anteriores estão presentes no extrato testado em concentração suficiente para produzir efeito biológico.

Diante disso, estudos complementares são necessários para validar essas hipóteses, como a quantificação da área dos granulomas, dosagem de citocinas associadas às respostas Th1 e Th2, avaliação de marcadores pró-fibróticos e antifibróticos, além da investigação de

estresse oxidativo no tecido hepático. Também seriam relevantes ensaios imunológicos para a quantificação global e diferencial de células imunológicas que participam da infecção por *S. mansoni*, como também a dosagem de citocinas, como IL-10, responsável pela modulação da transição da resposta imune Th1 e Th2.

CONCLUSÃO

Conclui-se que o extrato etanólico foliar de *Justicia secunda* apresentou baixa citotoxicidade em concentrações inferiores, demonstrando efeitos sobre o metabolismo celular e a produção de óxido nítrico apenas em concentrações elevadas. No modelo experimental de esquistossomose mansônica, o extrato não reduziu significativamente a carga parasitária de *Schistosoma mansoni*, indicando ausência de efeito anti-helmíntico expressivo na dose avaliada.

Apesar disso, os achados histológicos sugerem que o tratamento com *J. secunda* pode ter contribuído para menor comprometimento hepático, evidenciado pela presença de granulomas mais organizados e deposição de colágeno aparentemente mais delimitada. Dessa forma, embora o extrato não tenha demonstrado ação direta sobre o parasito, os resultados indicam possível potencial modulador das alterações hepáticas associadas à infecção.

Dessa forma, o extrato de *Justicia secunda* apresenta-se como uma alternativa promissora a ser investigada como terapia complementar ao praziquantel, uma vez que o PZQ atua principalmente sobre os vermes adultos na infecção parasitária, enquanto o extrato pode contribuir para a proteção do tecido hepático e modulação dos danos inflamatórios e fibróticos decorrentes da esquistossomose mansônica experimental.

REFERÊNCIAS

Adegboye, O.; Field, M. A.; Kupz, A.; Pai, S.; Sharma, D.; Smout, M. J.; Wangchuk, P.; Wong, y.; Loiseau, C. Natural-product-based solutions for tropical infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 34, n. 4, e00348-20, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00348-20>

Ademola Adeyemi, N., Joshua Oniye, S., Ibrahim Rekwot, P., Yusuf, A., & Adamu Wada, Y. (2024). Pharmacological Efficacy of Ethanol Leaf Extract of *Justicia secunda* in Swiss Albino Mice Experimentally Infected with *Plasmodium berghei*. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**, 15(3). <https://doi.org/10.26502/ijabpt.202130>

Amer, A. S. et al. The interaction of *Schistosoma mansoni* infection with diabetes mellitus and obesity in mice. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 9417, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36445-4>

Angelucci, F. et al. The anti-schistosomal drug praziquantel is an adenosine antagonist. **Parasitology**, v. 134, n. 9, p. 1215–1221, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0031182007002800>

Anyasor, G. N., Moses, N., & Kale, O. (2020). Hepatoprotective and hematological effects of *Justicia secunda* Vahl leaves on carbon tetrachloride induced toxicity in rats. **Biotechnic & Histochemistry**, 95(5), 349–359. <https://doi.org/10.1080/10520295.2019.1700430>

ATCC. (2023). NIH/3T3 CRL-1658 TM. www.atcc.org

Azevedo, C. M. et al. Therapeutic potential of natural products in the treatment of schistosomiasis. **Molecules**, v. 28, n. 19, p. 6807, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28196807>

Barsoum, R. S.; Esmat, G.; El-Baz, T. Human schistosomiasis: clinical perspective. **Journal of Advanced Research**, v. 4, n. 5, p. 433–444, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.01.005>

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Departamento de Doenças Transmissíveis. Vigilância da esquistossomose mansoni: diretrizes técnicas [recurso eletrônico]. 1. ed. eletrônica. Brasília: Ministério da Saúde, 2024. 116 p. ISBN 978-65-5993-678-6. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia_esquistossome_mansoni_diretrizes_tecnicas.pdf_1ed.pdf. Acesso em: 10 jun. 2026

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Gestão do Trabalho e da Educação na Saúde. Departamento de Gestão da Educação na Saúde. Técnico em citopatologia: caderno de referência 3: técnicas de histopatologia. Brasília: Ministério da Saúde; Rio de Janeiro: CEPESC, 2012. 94 p. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/tecnico_citopatologia_caderno_referencia_3.pdf. Acesso em: 10 jun. 2026

Bruce, R. D. An up-and-down procedure for acute toxicity testing. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 5, n. 1, p. 151–157, 1985. DOI: [https://doi.org/10.1016/0272-0590\(85\)90059-4](https://doi.org/10.1016/0272-0590(85)90059-4)

Buonfrate, D.; Ferrari, T. C. A.; Adegnik, A. A.; Stothard, J. R.; Gobbi, F. G. Human schistosomiasis. **The Lancet**, London, v. 405, p. 658–670, 2025

Carneiro, A. T. M. et al. Estudo epidemiológico da esquistossomose no Brasil. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, v. 7, n. 8, p. 1333–1347, 2025. DOI: <https://doi.org/10.36557/2674-8169.2025v7n8p1333-1347>

Carvalho, O. S.; Coelho, P. M. Z.; Lenzi, H. L. (org.). *Schistosoma mansoni & esquistossomose: uma visão multidisciplinar*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008. DOI: <https://doi.org/10.7476/9788575413708>

Chen, Q. et al. The role of microRNAs in the pathogenesis, grading and treatment of hepatic fibrosis in schistosomiasis. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 611, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3866-0>

Cioli, D. et al. Schistosomiasis control: praziquantel forever? **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 195, n. 1, p. 23–29, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.06.002>

Day, C. E. Histopathology: methods and protocols. New York: **Springer**, 2014

Dejani, N. N. et al. Immunological and parasitological parameters in *Schistosoma mansoni*-infected mice treated with crude extract from the leaves of *Mentha × piperita* L. **Immunobiology**, v. 219, n. 8, p. 627–632, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.04.001>

Doenhoff, M. J.; Pica-Mattoccia, L. Praziquantel for the treatment of schistosomiasis: its use for control in areas with endemic disease and prospects for drug resistance. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 4, n. 2, p. 199–210, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1586/14787210.4.2.199>

El-kady AM, Altwaim SA, Wakid MH, Banjar AS, Mohammed K, Alfaifi MS, Elshazly H, Al-Megrin WAI, Alshehri EA, Sayed E and Elshabrawy HA (2024) Prior *Trichinella spiralis* infection protects against *Schistosoma mansoni* induced hepatic fibrosis. **Front. Vet. Sci.** 11:1443267. doi: 10.3389/fvets.2024.1443267

El-Lakkany, N.M., Hammam, O.A., El-Maadawy, W.H. et al. Anti-inflammatory/anti-fibrotic effects of the hepatoprotective silymarin and the schistosomicide praziquantel against *Schistosoma mansoni*-induced liver fibrosis. **Parasites Vectors** 5, 9 (2012). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-9>

Elbaz, T.; Esmat, G. Hepatic and intestinal schistosomiasis: review. **Journal of Advanced Research**, v. 4, n. 5, p. 445–452, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2012.12.001>

Fonseca, C. T. et al. Identification of immunodominant epitopes of *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens using human T cells. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, supl. 1, p. 63–66, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000900011>

Ghasemi, M. et al. The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 12827, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>

Gbolo, B. Z. et al. LC-MS/MS analysis of crude flavonoid compounds from *Justicia secunda* from Democratic Republic of the Congo and evaluation of their antisickling activity. **Natural Resources for Human Health**, v. 4, n. 4, p. 387–397, 2024. DOI: <https://doi.org/10.53365/nrfhh/192594>

Gordon, R. M.; Griffiths, R. B. Observations on the means by which the cercariae of *Schistosoma mansoni* penetrate mammalian skin, together with an account of certain morphological changes observed in the newly penetrated larvae. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 45, n. 3–4, p. 227–243, 1951. DOI: <https://doi.org/10.1080/00034983.1951.11685509>

Green, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-X)

Gryseels, B. et al. Human schistosomiasis. **The Lancet**, v. 368, n. 9541, p. 1106–1118, 2006. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69440-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69440-3)

He X, Sun Y, Lei N, Fan X, Zhang C, Wang Y, Zheng K, Zhang D, Pan W. MicroRNA-351 promotes schistosomiasis-induced hepatic fibrosis by targeting the vitamin D receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2018 Jan 2;115(1):180-185. doi: 10.1073/pnas.1715965115. Epub 2017 Dec 18. PMID: 29255036; PMCID: PMC5776818

Kamdem, S. D. et al. Host regulators of liver fibrosis during human schistosomiasis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2781, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02781>

Kamlo Kamso VF, Dongmo Melogmo YK, Tchegnitegni BT, Tchatat Tali MB, Dize D, Ngansop CN, Ambassa P, Ouete Nantchouang JL, Konga IS, Boyom FF, Ngadjui BT, Fotso GW. New lignan glycosides from *Justicia secunda* Vahl (Acanthaceae) with antimicrobial and

antiparasitic properties. **Heliyon**. 2023 Nov 27;9(12):e22897. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e22897. PMID: 38125494; PMCID: PMC10730754

Katz, N.; Chaves, A.; Pellegrino, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 14, n. 6, p. 397–400, 1972

Katz, N.; Peixoto, S. V. Critical analysis of the estimated number of schistosomiasis mansoni carriers in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 303–308, 2000

Lamberton, P.H., Faust, C.L. & Webster, J.P. Praziquantel decreases fecundity in *Schistosoma mansoni* adult worms that survive treatment: evidence from a laboratory life-history trade-offs selection study. **Infect Dis Poverty** 6, 110 (2017). <https://doi.org/10.1186/s40249-017-0324-0>

Llanwarne, F.; Helmby, H. Granuloma formation and tissue pathology in *Schistosoma japonicum* versus *Schistosoma mansoni* infections. **Parasite Immunology**, v. 43, n. 2, e12778, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/pim.12778>

Loyo, R. et al. Kato-Katz slide preservation technique: extension of viability and the benefits for schistosomiasis control programs. **Experimental Parasitology**, v. 265, 108802, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2024.108802>

Maggi, L. et al. Role of the IL-33/ST2 activation pathway in the development of the hepatic fibrosis induced by *Schistosoma mansoni* granulomas in mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 12, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms241210237>

Masamba, P.; Kappo A. P. Immunological and biochemical interplay between cytokines, oxidative stress and schistosomiasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, p. 7216, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22137216>

McManus, D. P. et al. Schistosomiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 13, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0013-8>

Mendonça, A. M. B. et al. The susceptibility of recent isolates of *Schistosoma mansoni* to praziquantel. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, e39, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201658039>

Miranda GS, Rodrigues JGM, de Rezende MC, et al. Experimental infection with *Schistosoma mansoni* isolated from the wild rodent *Holochilus sciureus* shows a low parasite burden but induces high schistosomiasis severity in BALB/c mice. **Parasitology**. 2022;149(11):1381-1396. doi:10.1017/S0031182022000774

Miranda VHS, Gomes TR, Eller DE, Ferraz LCN, Chaves AT, Bicalho KA, Silva CEC, Birbrair A, Pascoal Xavier MA, de Goes AM, Corrêa-Oliveira R, Alves ÉAR, Bozzi A. Liver damage in schistosomiasis is reduced by adipose tissue-derived stem cell therapy after praziquantel treatment. **PLoS Negl Trop Dis**. 2020 Aug 27;14(8):e0008635. doi: 10.1371/journal.pntd.0008635. PMID: 32853206; PMCID: PMC7480869

Mishra, K. N.; Upadhyay, H. C. Coumarin-1,2,3-triazole hybrids as leading-edge anticancer agents. **Frontiers in Drug Discovery**, v. 2, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fddsv.2022.1072448>

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

Nono, JK, Fu, K., Mpotje, T. et al. Investigando o efeito antifibrótico do fármaco antiparasitário Praziquantel em modelos pré-clínicos in vitro e in vivo. **Sci Rep** 10 , 10638 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67514-4>

Ogadinma, I. N.; Chuemere, A. N. Phytochemical analysis and in vitro antioxidant assay of crude ethanol extract of *Justicia secunda* Vahl leaves. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 13, n. 5, p. 15–21, 2024. DOI: <https://doi.org/10.22271/phyto.2024.v13.i5a.15053>

Onochie A. U. et al. The pharmacobiochemical effects of ethanol extract of *Justicia secunda* Vahl leaves in *Rattus norvegicus*. **Journal of Experimental Pharmacology**, v. 12, p. 423–437, 2020. DOI: <https://doi.org/10.2147/JEP.S267443>

Pellegrino, J.; Siqueira, A. F. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infectadas. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 8, p. 589–597, 1956

Pinto, Carlos José de Carvalho; Grisard, Edmundo Carlos; Ishida, Maria Márcia Imenes. *Parasitologia*. Florianópolis: CCB/EAD/UFSC, 2011. 136 p. ISBN 978-85-61485-46-7

Rey, L. Parasitologia. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008

Ross, A. G. P. et al. Schistosomiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 16, p. 1212–1220, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMra012396>

Salvador-Recatalà, V.; Greenberg, R. M. Calcium channels of schistosomes: unresolved questions and unexpected answers. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling**, v. 1, n. 1, p. 85–93, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1002/wmts.8>

Sanchez, M. E. et al. Transcriptomic analysis of reduced sensitivity to praziquantel in *Schistosoma mansoni*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 228, p. 6–15, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2018.11.003>

Shang, X.; Dai, L.; Cao, X.; Ma, Y.; Gulnaz, I.; Miao, X.; Li, X.; Yang, X. Natural products in antiparasitic drug discovery: advances, opportunities and challenges. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 42, n. 9, p. 1419–1458, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1039/D5NP00007F>

Siqueira, L. P. et al. Schistosomiasis: drugs used and treatment strategies. **Acta Tropica**, v. 176, p. 179–187, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.08.002>.

Sombetzki, M. et al. Preventive CTLA-4-Ig treatment reduces hepatic egg load and hepatic fibrosis in *Schistosoma mansoni*-infected mice. **BioMed Research International**, v. 2019, 1704238, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/1704238>

Souza, F. P. C. et al. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 9, n. 4, p. 300–307, 2011

Sun, J. et al. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. **Sensors**, v. 3, n. 8, p. 276–284, 2003. DOI: <https://doi.org/10.3390/s30800276>

Świątek, Ł. et al. Chemical characterization of different extracts of *Justicia secunda* Vahl and determination of their anti-oxidant, anti-enzymatic, anti-viral, and cytotoxic properties. **Antioxidants**, v. 12, n. 2, p. 509, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox12020509>

Utzing, J., N'goran, E.K., N'dri, A., Lengeler, C. and Tanner, M. (2000), Efficacy of praziquantel against *Schistosoma mansoni* with particular consideration for intensity of infection. **Tropical Medicine & International Health**, 5: 771-778. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2000.00646.x>

Vale, N. et al. Praziquantel for schistosomiasis: single-drug metabolism revisited, mode of action, and resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 5, e02582-16, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.02582-16>

Virginio, J. et al. Schiff bases complexed with iron and their relation with the life cycle and infection by *Schistosoma mansoni*. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 1021768, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1021768>

Wilson, R. A., & Jones, M. K. (2021). Fifty years of the schistosome tegument: discoveries, controversies, and outstanding questions. In **International Journal for Parasitology** (Vol. 51, Issues 13–14, pp. 1213–1232). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.11.002>

Wu, G. Y. Schistosomiasis: progress and problems. **World Journal of Gastroenterology**, v. 6, n. 1, p. 12–19, 2000. DOI: <https://doi.org/10.3748/wjg.v6.i1.12>

Zaia, M. G. et al. Anti-inflammatory properties of menthol and menthone in *Schistosoma mansoni* infection. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, p. 170, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00170>

Zhang, L. et al. The strategies and techniques of drug discovery from natural products. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 216, 107686, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107686>

Zheng, B. et al. T lymphocyte-mediated liver immunopathology of schistosomiasis. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 61, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00061>