

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**Atividade protetora do eugenol contra toxicidade hepática e reprodutiva
induzida por mercúrio em ratos Wistar machos**

Izabela da Silva Lopes
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

IZABELA DA SILVA LOPES

**Atividade protetora do eugenol contra toxicidade hepática e reprodutiva
induzida por mercúrio em ratos Wistar machos**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Mariana Machado Neves

Coorientador: Luiz O. Guimarães Ervilha

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

L864a
2025
Lopes, Izabela da Silva, 1999-
Atividade protetora do eugenol contra toxicidade hepática e reprodutiva induzida por mercúrio em ratos Wistar machos / Izabela da Silva Lopes. – Viçosa, MG, 2025.
1 dissertação eletrônica (95 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Mariana Machado Neves.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral, 2025.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.265>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Hepatócitos. 2. Testículos. 3. Histologia. 4. Estresse oxidativo. 5. Espermatozoides. I. Neves, Mariana Machado, 1977-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 617.5562

IZABELA DA SILVA LOPES

**Atividade protetora do eugenol contra toxicidade hepática e reprodutiva
induzida por mercúrio em ratos Wistar machos**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de fevereiro de 2025.

Assentimento:

Izabela da Silva Lopes
Autora

Mariana Machado Neves
Orientadora

Essa dissertação foi assinada digitalmente pela autora em 08/05/2025 às 18:28:10 e pela orientadora em 08/05/2025 às 20:50:03. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **N6NQ.FH8Q.4WAF** e clique no botão 'Validar documento'.

AGRADECIMENTOS

Sou grata ao Deus da minha vida por ter me sustentado e me dado forças para superar as dificuldades durante a caminhada. Tudo que sou é por causa Dele.

À minha mãe, Margareti, minha eterna gratidão por seu amor incondicional, por sua força e por sempre acreditar em mim. Ao meu pai, AlexSandro, minha eterna admiração por todo empenho para que eu chegasse até aqui. Todo mérito é deles. Aos meus irmãos, Arthur, Otávio, Esther e Isac, por serem a força que me move a querer ser alguém de quem possam se orgulhar. Tudo é por eles.

Ao meu amado avô Darcy, por sempre acreditar que eu posso fazer qualquer coisa. E à minha avó, Luzia, cuja lembrança me acompanha todos os dias.

Agradeço ao meu noivo, Álisson Carlos, meu companheiro de todas as horas, meu grande amor, meu grande amigo, meu ponto de equilíbrio. Aos meus sogros, Sue Elen e Sebastião, por toda receptividade, torcida e incentivo.

Agradeço também à toda minha família, por todo apoio, em especial à minha tia Margarida e minha prima Luana.

Agradeço aos meus amigos, mesmo os de longe, por toda torcida e companheirismo. Em especial, à Thayná, por ser minha irmã do coração e caminhar junto comigo.

Às minhas patinhas, Isabela e Thainá, agradeço por tornarem a jornada da pós-graduação mais leve. Agradeço ao meu grande amigo, Luiz Otávio, por sempre segurar minha mão e ser um exemplo a se seguir. Ainda que tivesse muito para lhe oferecer, seria pouco perto de tudo que ele faz por mim. À pessoa mais especial que eu já conheci, Mírian, dedico minha admiração e gratidão.

Às minhas parceiras de república, Bruna e Nathallia e aos meus companheiros de almoço, Ana e Marcos, agradeço por todas as conversas, risadas, desabafos e apoio.

Aos meus amigos do Laboratório de Reprodução Animal e Toxicologia da UFV (LARAT), obrigada pelas conversas, os almoços e aprendizados. Ao João Vitor e Luís Miguel, agradeço por todo o auxílio com os cuidados dos animais e com as análises experimentais.

Agradeço à minha orientadora, Prof^a Dr^a Mariana. Sou grata por toda paciência, disponibilidade e por me ensinar nos pequenos detalhes.

Aos membros da banca, agradeço por dedicarem um tempo para avaliar e contribuir com meu trabalho. Muito obrigada Marli Cupertino, Juliana Alves, Fernanda Dias e Reggiani Vilela.

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa, por cada oportunidade e por todas as experiências que me fizeram crescer como pessoa e profissionalmente.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo consentimento da bolsa de estudos na pós-graduação.

Às agências de fomento, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro que permite o funcionamento do laboratório e o desenvolvimento de nossas pesquisas.

“Quantas pessoas vencem quando você vence?”. Muitas pessoas vencem quando eu venço, minhas conquistas são fruto de esforço coletivo. Por isso, agradeço a todas as pessoas que caminharam comigo e me sinto imensamente honrada em dizer que a conquista é nossa.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

LOPES, Izabela da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2025. **Atividade protetora do eugenol contra toxicidade hepática e reprodutiva induzida por mercúrio em ratos Wistar machos.** Orientadora: Mariana Machado Neves. Coorientador: Luiz Otávio Guimarães Ervilha.

O mercúrio é um metal tóxico amplamente encontrado na natureza nas formas inorgânica, orgânica e elementar. Este metal pode causar sérios danos à órgãos vitais, como o fígado, e também, ao aparelho reprodutor masculino. Entre os mecanismos envolvidos nos efeitos nocivos causados pelo mercúrio, o estresse oxidativo destaca-se como um dos principais. O mercúrio causa aumento da geração de espécies reativas de oxigênio e interfere na atividade de diferentes enzimas antioxidantes. Compostos que apresentam propriedades antioxidantes, como o eugenol, interagem rapidamente com espécies reativas de oxigênio, protegendo estruturas celulares contra danos oxidativos. Neste contexto, considerando os impactos que o mercúrio provoca na saúde humana, principalmente através de mecanismos oxidativos, estudos experimentais tornam-se cruciais para investigação da atividade protetora de agentes antioxidantes como o eugenol, em um contexto de toxicidade induzida por mercúrio. Por isso, o presente estudo objetivou avaliar o efeito da exposição ao eugenol e mercúrio, separadamente e simultaneamente, sobre parâmetros hepáticos, uma vez que o fígado é um órgão central na desintoxicação do organismo, e reprodutivos, considerando o aparelho reprodutor masculino como um alvo crítico da toxicidade do mercúrio. Quarenta ratos Wistar machos (~100 dias de idade), foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n=10/grupo): controle, eugenol, mercúrio e eugenol + mercúrio. Os ratos receberam por gavagem, respectivamente, 0,5 mL de Tween-20 a 2% (veículo), 0,5 mL de eugenol, concentração de 10 mg Kg⁻¹, 0,5 mL de mercúrio (Cloreto de mercúrio - HgCl₂), na concentração de 0,6 mg Kg⁻¹, e os dois compostos (mesmo volume) nas suas respectivas concentrações. A exposição aos dois compostos ocorreu respeitando um intervalo de 30 minutos entre a ingestão de 0,5 mL de eugenol e de 0,5 mL de mercúrio (CEUA nº 06/2024). Após o período experimental de 30 dias (exposição subaguda), os fígados, testículos e epidídimos foram coletados e análises bioquímicas, histológicas e enzimáticas foram realizadas, além de determinar a proporção de mercúrio e outros microelementos no fígado dos animais. Ainda, amostras de espermatozoides foram também coletadas para avaliar viabilidade, motilidade e morfologia. Os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA) unidirecional, seguida do teste post hoc de Tukey e as

diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Os resultados mostram que o eugenol foi capaz de reduzir o acúmulo do mercúrio no fígado e reduzir significativamente as concentrações de marcadores de estresse oxidativo, como malondialdeído e óxido nítrico, elevados pela ação deste metal. Histologicamente, ratos expostos ao mercúrio exibiram lesões hepáticas em maior número e diversidade, como hemorragia, enquanto aqueles expostos ao eugenol apresentaram aspectos histológicos mais preservados. No aparelho reprodutor masculino, a exposição ao mercúrio reduziu a atividade das enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase e aumentou as concentrações de óxido nítrico. Ainda, a ingestão do metal afetou parâmetros espermáticos, causando diminuição da motilidade. A exposição ao eugenol mitigou os danos oxidativos e preservou a integridade histológica dos órgãos. Além disso, o eugenol melhorou a motilidade espermática, neutralizando os danos induzidos pelo mercúrio. Essas descobertas sugerem que o eugenol é um agente eficaz na proteção contra toxicidade hepática e reprodutiva induzida por mercúrio, enfatizando sua relevância para o desenvolvimento de estratégias de proteção contra poluentes ambientais.

Palavras-chave: Hepatócito; Testículo; Histologia; Estresse oxidativo; Espermatozoides

ABSTRACT

LOPES, Izabela da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2025. **Protective activity of eugenol against mercury-induced hepatic and reproductive toxicity in male Wistar rats.** Adviser: Mariana Machado Neves. Co-adviser: Luiz Otávio Guimarães Ervilha.

Mercury is a toxic metal widely found in nature in inorganic, organic, and elemental forms. This metal can cause severe damage to vital organs, such as the liver, and also to the male reproductive system. Among the mechanisms involved in the harmful effects caused by mercury, oxidative stress stands out as one of the main ones. The metal increases the production of reactive oxygen species and interferes with the activity of different antioxidant enzymes. Compounds with antioxidant properties like eugenol interact rapidly with reactive oxygen species, protecting cellular structures against oxidative damage. In this context, considering the impacts that mercury causes on human health, mainly through oxidative stress, experimental studies become crucial to investigate the protective activity of antioxidant agents, such as eugenol, in the context of mercury-induced toxicity. Therefore, the present study aimed to evaluate the effect of exposure to eugenol and mercury, separately and simultaneously, on hepatic parameters, since the liver is a central organ in the detoxification of the organism, and reproductive parameters, considering the male reproductive system as a critical target of mercury toxicity. Forty male Wistar rats (~100 days of age) were randomly divided into four experimental groups (n=10/group): control, eugenol, mercury, and eugenol + mercury. The rats received by gavage, respectively, 0.5 mL of 2% Tween-20 (vehicle), 0.5 mL of eugenol, a concentration of 10 mg Kg⁻¹, 0.5 mL of mercury (Mercuric chloride - HgCl₂), at a concentration of 0.6 mg Kg⁻¹, and the two compounds (same volume) and at their respective concentrations. Exposure to both compounds occurred via gavage, respecting a 30-minute interval between the ingestion of 0.5 mL of eugenol and 0.5 mL of mercury (CEUA no. 06/2024). After the 30-day experimental period (subacute exposure), the livers, testes, and epididymis were collected, and biochemical, histological, and enzymatic analyses were performed, in addition to the determining the proportion of mercury and other microelements in the animals' livers. Furthermore, sperm samples were also collected to assess viability, motility, and morphology. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test, and differences were considered significant when $p < 0.05$. The results show that eugenol reduced mercury accumulation in the liver and the concentrations of oxidative stress

markers, such as malondialdehyde and nitric oxide, elevated by the action of this metal. Histologically, rats exposed to mercury exhibited a greater number and diversity of liver lesions, such as hemorrhage, while those exposed to eugenol showed preserved histological aspects. In the male reproductive tract, mercury exposure reduced the activity of antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase, and increased nitric oxide concentrations. Furthermore, metal ingestion affected sperm parameters, causing decreased motility. Exposure to eugenol mitigated oxidative damage and preserved the histological integrity of the testes and epididymis. Furthermore, eugenol improved sperm motility, counteracting mercury-induced damage. These findings suggest that eugenol is an effective agent in protecting against mercury-induced liver and reproductive toxicity, emphasizing its relevance for developing protective strategies against environmental pollutants.

Keywords: Hepatocyte; Testis; Histology; Oxidative stress; Sperm

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 <i>Metais pesados e toxicidade</i>	11
2.2 <i>Características e mecanismos de toxicidade do mercúrio</i>	12
2.3 <i>Hepatotoxicidade induzida por mercúrio</i>	14
2.4 <i>Impactos do mercúrio no aparelho reprodutor masculino</i>	15
2.5 <i>Estratégias de mitigação da toxicidade causada por mercúrio</i>	16
2.6 <i>Atividade protetora do eugenol</i>	16
2.7 <i>Referências bibliográficas</i>	18
3. CAPÍTULO 1: Ação hepatoprotetora do eugenol contra danos oxidativos e alterações morfológicas induzidas por mercúrio em ratos Wistar	25
Resumo	26
Introdução	27
Materiais e métodos	28
Resultados	33
Discussão	44
Conclusão	48
Referências Bibliográficas	49
4. CAPÍTULO 2: Eugenol atenua os danos reprodutivos induzidos pelo mercúrio em ratos Wistar machos: evidências antioxidantes, histológicas e funcionais	56
Resumo	57
Introdução	58
Materiais e métodos	59
Resultados	65
Discussão	81
Referências bibliográficas	87
5. CONCLUSÕES GERAIS	95

1. INTRODUÇÃO GERAL

Além de fenômenos naturais, como processos erosivos, as atividades antropogênicas, como a mineração e produção industrial, têm contribuído significativamente para o aumento de metais pesados disponíveis no meio ambiente (Fulke et al., 2024). Apesar da ampla regulamentação e dos esforços para reduzir a contaminação ambiental, esses metais continuam a representar um desafio significativo para a saúde pública, devido à sua persistência no ambiente e ao seu potencial de bioacumulação e biomagnificação no corpo, o que pode desencadear efeitos adversos à saúde humana (Obeng-Gyasi & Obeng-Gyasi, 2024). Uma característica comum associada à toxicidade dos metais pesados, é a perturbação do estado oxidativo nas células, levando à danos celulares e ao comprometimento de diversas funções fisiológicas, especialmente no fígado, no sistema nervoso e no aparelho reprodutor masculino (Balali-Mood et al., 2021; Kou et al., 2024).

Dentro do grupo de metais pesados, o mercúrio se destaca como um dos mais tóxicos, apresentando meia-vida variável a depender do seu estado redox, com valores que vão de alguns dias a vários meses (Bernhoft, 2012). Uma vez absorvido pelo trato gastrointestinal, o mercúrio acumula-se nos rins e no fígado, onde exibe uma taxa de excreção lenta e induz vários efeitos nocivos (Chen & Ding, 2025). Os efeitos tóxicos do mercúrio são amplificados em diversos órgãos e sistemas, incluindo o sistema nervoso central e o aparelho reprodutor masculino (Ynalvez et al., 2025). Estudos revelam que a exposição ao mercúrio pode resultar em danos estruturais e funcionais no fígado, como necrose e comprometimento da integridade das membranas celulares (Deng et al., 2012; Renu et al., 2021). O mercúrio é reconhecido por sua ação disruptiva sobre a função do aparelho reprodutor masculino, afetando a motilidade espermática e a produção de hormônios como a testosterona, podendo levar à infertilidade (Sampada & Akarsu, 2024). As evidências de danos no aparelho reprodutor masculino, como alterações histológicas e bioquímicas nos testículos e epidídimos, demonstram o impacto do mercúrio na saúde reprodutiva (Rathore, 2000; Akarsu et al., 2024).

Compostos com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, como o eugenol, tem demonstrado considerável eficácia na redução do estresse oxidativo e na modulação da resposta inflamatória (Khalil et al., 2017; Ulanowska & Olas, 2021). O eugenol apresenta efeitos benéficos tanto para a saúde do fígado quanto para o aparelho reprodutor masculino. Esse composto demonstra considerável eficácia na proteção contra a toxicidade hepática, segurança no aparelho reprodutor masculino e potencial como um agente antioxidante natural (Jo et al., 2014; Kumar et al., 2021; Chilukoti et al., 2023).

Diante dos graves impactos que o mercúrio provoca na saúde humana, especialmente no fígado e no aparelho reprodutor masculino, torna-se fundamental reduzir as fontes de exposição ao metal e explorar alternativas que possam mitigar esses danos. Neste contexto, as bem documentadas e promissoras propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias do eugenol, o posicionam como um candidato relevante para ser usado em diferentes estratégias terapêuticas. Com isso, o presente estudo visou testar a hipótese de que o eugenol pode apresentar atividade protetora contra danos teciduais e funcionais causados pelo mercúrio ao fígado e aos componentes do aparelho reprodutor (testículos, epidídimos e espermatozoides) de ratos Wistar machos. Para isso, foram definidos os seguintes objetivos, geral e específicos:

Objetivo geral:

- Avaliar o efeito da exposição ao eugenol e mercúrio, separadamente e simultaneamente, sobre parâmetros hepáticos e reprodutivos de ratos Wistar machos.

Objetivos específicos:

- Avaliar parâmetros morfológicos hepáticos, testiculares e epididimários, como biometria e histologia, após 30 dias de exposição ao eugenol e ao mercúrio;
- Analisar a saúde hepática após a exposição ao eugenol e ao mercúrio, considerando marcadores funcionais de dano e metabolismo, atividade de ATPases, atividade de enzimas antioxidantes e concentrações de marcadores de estresse oxidativo;
- Determinar a proporção de microminerais e a bioacumulação de mercúrio no fígado, após exposição subaguda ao eugenol e ao mercúrio;
- Analisar a funcionalidade testicular e epididimária após a exposição ao eugenol e ao mercúrio, considerando atividade de ATPases, atividade de enzimas antioxidantes e concentrações de marcadores de estresse oxidativo;
- Avaliar parâmetros espermáticos, desde sua produção, morfologia até funcionalidade, em ratos Wistar expostos ao eugenol e ao mercúrio por 30 dias.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Metais pesados e toxicidade

Os metais são elementos químicos amplamente distribuídos na crosta terrestre, cuja presença em diferentes ambientes decorre tanto de processos naturais, como erupções vulcânicas e erosão, quanto de atividades antropogênicas, incluindo mineração, atividades

industriais e agrícolas (Fulke et al., 2024). Alguns desses elementos químicos, como zinco, ferro e manganês, são essenciais para o metabolismo de procariotos e eucariotos, atuando como cofatores de enzimas, integrando a estrutura de moléculas e participando do processo de defesa antioxidante (Chalkiadaki et al., 2014). Todavia, as concentrações desses elementos no organismo devem ser reguladas por mecanismos refinados que controlam as taxas de absorção, retenção e excreção. Isso porque, quando presentes em excesso, podem se tornar tóxicos e prejudicar as funções celulares normais (Rami et al., 2022). Em contrapartida, outros metais não possuem funções biológicas conhecidas (metais não essenciais), como mercúrio, arsênio, chumbo e cádmio, sendo tóxicos mesmo em baixas concentrações. Esses metais são nomeados como metais pesados e classificados entre as 10 principais substâncias tóxicas prioritárias de acordo com a Agência de Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças (Balali-Mood et al., 2021; ATSDR, 2022; Kang et al., 2024). Por não serem biodegradáveis, os metais pesados acumulam e permanecem por mais tempo no organismo, interferindo em mecanismos biológicos normais, representando assim um risco à saúde (Hamdy et al., 2018; Renu et al., 2021). Seus efeitos tóxicos em diversos órgãos estão associados, principalmente, ao estresse oxidativo desencadeado pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio que, por sua vez, ativam uma série de vias inflamatórias (Renu et al., 2021). Ainda, os metais pesados interrompem o funcionamento normal do sistema imunológico, afetando diretamente as células imunológicas ou modificando a expressão de citocinas e outros mediadores inflamatórios (Obeng-Gyasi & Obeng-Gyasi, 2024). Ao final, esses efeitos podem levar à perda de funcionalidade de órgãos devido à danos estruturais e teciduais resultantes da resposta imune prolongada (Wu et al., 2024).

2.2 Características e mecanismos de toxicidade do mercúrio

Entre os metais pesados, o mercúrio ocupa uma posição de destaque no contexto da toxicologia, devido à sua alta toxicidade e ampla distribuição ambiental (Witczak et al., 2024). Sua natureza não biodegradável, bem como ausência de funções fisiológicas essenciais, torna esse metal uma ameaça substancial à saúde humana (Machado-Neves, 2022; Witczak et al., 2024). Em seu estado de oxidação zero, ele é denominado mercúrio elementar (Hg^0), sendo o único dentre os metais que existe na forma líquida à temperatura ambiente (Bridges & Zalups, 2005; Georgina et al., 2024). A partir do mercúrio elementar, devido sua alta pressão de vapor, é produzido um gás monoatômico conhecido como vapor de mercúrio. Em seu primeiro estado de oxidação, quando o átomo de mercúrio perde um elétron, o íon formado é denominado como íon mercurioso (Hg^+). Já em seu segundo estado de oxidação, forma-se o íon mercúrico ou

mercúrio divalente (Hg^{2+}). Em combinação com elementos como oxigênio, cloro e enxofre, os íons de mercúrio podem formar sais de mercúrio, como o cloreto de mercúrio (HgCl_2). Os compostos orgânicos de mercúrio são formados quando íons de mercúrio se ligam covalentemente a átomos de carbono de grupos metil, etil ou fenil (Bridges & Zalups, 2005; Clarkson & Magos, 2008; Kang et al., 2024). A depender de sua forma, o mercúrio apresenta diferentes taxas e mecanismos de absorção, que pode ocorrer via trato gastrointestinal, pulmões ou através da pele. O Hg^0 , antes utilizado na confecção de termômetros, por exemplo, é facilmente absorvido através dos pulmões, mas sua absorção através do trato gastrointestinal e da pele é praticamente insignificante (Gochfeld, 2003).

O mercúrio é liberado no meio ambiente tanto por fontes naturais, como erupções vulcânicas, quanto por atividades humanas, incluindo a queima de combustíveis fósseis, mineração de ouro e processos industriais (Bernhoft, 2012; Basta, 2024). Estudos mostram que as concentrações de mercúrio em águas superficiais triplicaram desde a Revolução Industrial devido a atividades humanas (Braune et al., 2005; Yang et al., 2020). A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica o mercúrio como um elemento químico de alto risco à saúde humana, recomendando uma concentração máxima de $0,006 \text{ mg Kg}^{-1}$ em água potável (WHO, 2017). Embora o uso global de mercúrio metálico tenha diminuído nas últimas décadas, a mineração de ouro, geralmente ilegal, em países em desenvolvimento, como Brasil, Peru e Colômbia, continua a ser uma fonte significativa de contaminação ambiental (Hazelhoff, & Torres, 2018; Basta, 2024). No Brasil, um exemplo atual é a contaminação por mercúrio em populações indígenas, como os Yanomami, cujas amostras de cabelo revelaram altos níveis do metal, afetando homens, mulheres, crianças e idosos, com impactos significativos à saúde e ao meio ambiente (Basta, 2024).

A toxicidade do mercúrio pode ocorrer por mecanismos diretos e indiretos. Entre os mecanismos diretos destacam-se a interação do metal com grupos sulfidril, a competição com metais essenciais e a indução da produção de espécies reativas de oxigênio. Os mecanismos indiretos, por sua vez, envolvem efeitos secundários sobre processos celulares, como desregulação da expressão de genes e do metabolismo celular. Além disso, o mercúrio pode comprometer a função mitocondrial por reduzir a produção de energia e aumentar a geração de espécies reativas de oxigênio (Ynalvez et al., 2025). Todas as formas químicas de mercúrio induzem efeitos tóxicos em mamíferos, variando na absorção e biotransformação do metal no organismo. Os efeitos tóxicos dependem não apenas da dose, mas também do tempo de exposição ao metal (Broussard et al, 2002; Bernhoft, 2012). Sais de mercúrio frequentemente encontrados em produtos de uso rotineiro, como cremes clareadores, laxantes, antissépticos e

diuréticos, destacam-se pelos impactos toxicológicos, já que podem ser metabolizados em Hg^{2+} , um íon com alta afinidade por grupos tiol presentes em biomoléculas como glutathione (Clarkson & Magos, 2008; Hazelhoff, & Torres, 2018). Além disso, outras formas de mercúrio, como Hg^0 , Hg^+ e compostos orgânicos, podem ser metabolizados no organismo formando Hg^{2+} . Na corrente sanguínea, esses íons ligam-se a grupos tiol em eritrócitos, glutathione ou metalotioneínas, podendo ser transportados no plasma e acumulados em diversos órgãos e tecidos (Hansen & Jones, 2006; Boujbiha et al., 2009; Joshi et al., 2017).

2.3 Hepatotoxicidade induzida por mercúrio

O fígado, essencial para a detoxificação de agentes tóxicos, desempenha um papel central na biotransformação e ciclagem do mercúrio, tornando-se um dos órgãos mais afetados pela toxicidade desse metal pesado (Joshi et al. 2017; Shawon et al., 2024). A exposição às formas orgânicas e inorgânicas de mercúrio ocorrem principalmente por meio da dieta e sua absorção ocorre através das células epiteliais intestinais. Uma vez absorvido e transportado pela corrente sanguínea, o mercúrio pode acumular-se em órgãos como rins e fígado (Abdullah, 2020). No fígado, o mercúrio pode ser metabolizado em um ciclo hepato-biliar, no qual é excretado pela bile ligado a glutathione reduzida através de uma proteína transportadora dependente de adenosina trifosfato (Keppler et al., 1998; Deng et al., 2012), sendo a excreção biliar de mercúrio intimamente relacionada à taxa de secreção de glutathione reduzida (Ballatori & Clarkson, 1984). Apesar disso, o mercúrio é parcialmente reabsorvido no sistema circulatório, promovendo sua redistribuição e conseqüente retorno ao fígado. Esse processo de recirculação favorece o acúmulo gradual de mercúrio no fígado (Dutczak & Ballatori, 1994; Deng et al., 2012). Ainda, é provável que outros mecanismos atuem na excreção hepatobiliar do mercúrio e que a falha dos mesmos resulte em deposição de mercúrio no órgão (Deng et al., 2012).

O acúmulo do mercúrio no fígado desencadeia uma série de respostas celulares adversas, principalmente por meio da indução de estresse oxidativo, caracterizado por produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, depleção de antioxidantes endógenos, como a glutathione reduzida e despolarização mitocondrial (Flora et al., 2008; Agarwal et al., 2010; Joshi et al., 2017; Kahramanoğullari et al., 2024). Essas alterações comprometem as funções enzimáticas que impactam a produção de ATP e a síntese de proteínas essenciais para a viabilidade celular (Agarwal et al., 2010; Joshi et al., 2017). Danos estruturais causados pelo mercúrio ao fígado incluem necrose, congestão dos capilares sinusoides e edema intersticial (Deng et al., 2012; Kahramanoğullari et al., 2024). Foi sugerido que os metabólitos reativos derivados do metabolismo do mercúrio desempenham um papel central nos danos hepáticos,

particularmente por meio da indução de peroxidação lipídica e da disfunção do sistema antioxidante (Flora et al., 2008). A ativação do citocromo CYP450 no metabolismo do mercúrio, contribui para a formação de radicais livres, exacerbando os danos oxidativos e comprometendo a integridade das membranas celulares e organelas (Othman et al., 2014). O citocromo CYP450 atua como a primeira resposta para a biotransformação de xenobióticos e por isso foi proposto como um biomarcador para poluentes (Tabrez & Ahmad, 2010; Li et al., 2021). Estudos reportam que concentrações elevadas de citocromos CYP450 estão relacionadas à iniciação de estresse oxidativo e morte celular por apoptose (Moyano et al., 2019; Li et al., 2021). Esses mecanismos destacam a relevância do estresse oxidativo como um fator chave na toxicidade hepática induzida pelo mercúrio (Othman et al., 2014; Li et al., 2021).

2.4 Impactos do mercúrio no aparelho reprodutor masculino

Além de comprometer órgãos como o fígado, o mercúrio afeta negativamente o aparelho reprodutor masculino, uma vez que órgãos reprodutores masculinos estão entre os primeiros órgãos a serem danificados por substâncias tóxicas (Akarsu et al., 2024). Metais pesados podem afetar a função do aparelho reprodutor masculino por três mecanismos principais: ação direta sobre os órgãos reprodutivos, interferência no eixo hipotálamo-hipófise-testicular e alteração de processos pós-testiculares, como a maturação e motilidade espermática (Sampada & David, 2024). Estudos em modelos murinos expostos a este metal pesado mostraram danos em testículos, epidídimos e espermatozoides com consequente disfunção reprodutiva por diminuir o peso testicular e a produção e contagem de espermatozoides (Rao & Sharma, 2001; Martinez et al., 2014; Rizzetti et al., 2017; Akarsu et al., 2024). Camundongos adultos expostos ao cloreto de mercúrio apresentaram alterações histopatológicas, como deformação das células de Leydig, degeneração de túbulos seminíferos e redução nas concentrações séricas de testosterona, causando infertilidade (Rathore, 2000; Sampada & David, 2024). Além disso, a exposição ao cloreto de mercúrio em ratos resultou em uma queda acentuada nos níveis de glutatona reduzida e na atividade da superóxido dismutase, concomitante ao aumento nas concentrações de malondialdeído nos testículos, indicando estresse oxidativo (Fadda et al., 2020). Adicionalmente, outro efeito associado à toxicidade do mercúrio no aparelho reprodutor masculino é a elevação de marcadores pró-inflamatórios, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), sugerindo respostas inflamatórias significativas (Mohamed, 2018; Akarsu et al., 2024).

2.5 Estratégias de mitigação da toxicidade causada por mercúrio

Diante dos efeitos adversos causados por metais pesados como o mercúrio, compostos com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias têm sido amplamente investigados como alternativas terapêuticas para mitigar os efeitos adversos associados à exposição a contaminantes ambientais. A OMS destaca a importância de estratégias baseadas em agentes naturais para o controle da toxicidade por metais pesados (Rizzetti et al., 2017). Neste contexto, estudos toxicológicos tem se voltado para investigar a eficácia de diferentes agentes e nutrientes para prevenir ou reverter a toxicidade induzida por mercúrio. Vitamina C, vitamina E, cloreto de zinco, berberina, rutina e o ácido siríngico, mostraram-se eficazes em melhorar os efeitos tóxicos causados pelo mercúrio (Kandemir et al., 2010; Jahan et al., 2019; Albasher et al., 2020; Shalan, 2022; Akarsu et al., 2024). A vitamina E, por exemplo, é um antioxidante reconhecido por sua capacidade de prevenir a peroxidação lipídica e a formação de radicais livres, além de manter os níveis de glutathione nos tecidos (Shalan, 2022). De forma similar, o uso do eugenol, um composto fenólico encontrado em óleos essenciais e extratos de plantas como o cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), tem emergido como uma abordagem terapêutica promissora contra a toxicidade induzida por metais pesados. Suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias têm sido amplamente documentadas, reforçando seu potencial para neutralizar os efeitos adversos causados por metais pesados em sistemas biológicos (Ito et al., 2005; Bal et al., 2018; Kumar et al., 2021; Huang et al., 2024; Kumar & Sharma, 2024).

2.6 Atividade protetora do eugenol

O eugenol ($C_{10}H_{12}O_2$), é um composto aromático que pertence ao grupo dos fenóis (Ulanowska & Olas, 2021). Ele é o principal componente do óleo de cravo-da-índia, estando também presente em folhas de louro e pimenta-da-Jamaica (Ito et al., 2005). Com uma coloração amarelo-claro, consistência oleosa e aroma picante, o eugenol é pouco solúvel em água, mas apresenta alta solubilidade em solventes orgânicos (Ulanowska & Olas, 2021). Esse composto natural possui diversas propriedades farmacológicas, incluindo atividades analgésicas, anestésicas, anti-inflamatórias, antifúngicas, antibacterianas e antioxidantes (Ulanowska & Olas, 2021; Damasceno et al., 2024; Huang et al., 2024). Devido à sua baixa toxicidade e aos efeitos colaterais mínimos em baixas doses, além de ser amplamente utilizado nas indústrias cosmética e farmacêutica, o eugenol também é consideravelmente utilizado como conservante alimentar (Khalil et al., 2017; Rajput et al., 2018; Ulanowska & Olas, 2021). O composto tem aplicações terapêuticas em diversas condições, demonstrando eficácia no combate ao estresse oxidativo, inflamação, hiperglicemia e distúrbios neurológicos (Khalil et

al., 2017; Carvalho et al., 2021). Na medicina tradicional, ele é reconhecido por seu papel no tratamento de distúrbios hepáticos, incluindo cirrose hepática e doenças causadas por medicamentos (Anbu & Anuradha, 2012).

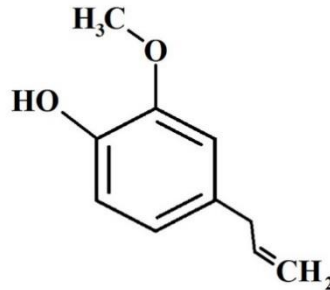


Figura 1: Estrutura química do eugenol

O potencial antioxidante do eugenol foi atribuído à sua estrutura química, que lhe permite estabilizar radicais fenoxi, destacando-se na eliminação de radicais livres, na prevenção da produção de espécies reativas de oxigênio e na prevenção da produção de formas reativa de nitrogênio (Ulanowska & Olas, 2021). Além disso, o eugenol também atua como inibidor da monoamina oxidase e apresenta propriedades neuroprotetoras (Kabuto et al., 2007). Tanto o eugenol puro, quanto os compostos que o contém, como o óleo de cravo, demonstram forte potencial antioxidante em baixas doses. Entretanto, em estudos com altas concentrações, o eugenol aumentou a produção de radicais livres agindo como um pró-oxidante (Raja et al., 2015; Nejad et al., 2017; Fathy et al., 2019). Isso reforça a importância da administração de doses seguras que, segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, são aquelas abaixo de 2,5 mg Kg⁻¹ (Ulanowska & Olas, 2021). Além das propriedades antioxidantes, está bem documentado que o eugenol apresenta efeitos anti-inflamatórios (Damasceno et al., 2024). Essa atividade está associada à inibição da quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos, bem como à redução na síntese de neurotransmissores inflamatórios, como prostaglandinas e leucotrienos (Ulanowska & Olas, 2021). Evidências sugerem que o eugenol tem a capacidade de inibir a produção de ânions superóxido em neutrófilos pela inibição da via de fosforilação Raf/MEK/ERK1/2/p47. Ele também é conhecido por inibir mediadores pró-inflamatórios, incluindo interleucina (IL)-1 β e IL-6 e TNF- α (Das Chagas Pereira de Andrade & Mendes, 2020; Kumar et al., 2021).

No fígado, o eugenol demonstrou prevenir lesões hepáticas ao reduzir a atividade de mediadores de estresse oxidativo, diminuindo a peroxidação lipídica, a oxidação de proteínas e os níveis de marcadores inflamatórios. Esses efeitos foram evidenciados por reduções significativas na produção de citocinas pró-inflamatórias e nas concentrações de alanina

aminotransferase e fosfatase alcalina, indicadores de lesão hepática (Jo et al., 2014; Kumar et al., 2021). Além disso, o tratamento com eugenol na concentração de 10 mg Kg⁻¹, se mostrou eficaz em proteger o fígado de lesões causadas por isquemia, sendo observadas melhorias nas características histológicas do órgão, assim como reduções nos níveis séricos de alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase dos ratos tratados (Abd El Motteleb et al., 2014). Adicionalmente, outro estudo revelou que o eugenol não interferiu negativamente na biometria, histologia e histomorfometria dos testículos e epidídimos, nem na produção, no número e no tempo de trânsito dos espermatozoides em ratos saudáveis, destacando seu perfil de segurança em funções reprodutivas masculinas (Carvalho et al., 2022). Ainda, em um estudo realizado com ratos diabéticos, o tratamento com eugenol contribuiu para aumento significativo no peso testicular e do epidídimo, melhorou significativamente o estresse oxidativo nos testículos e também normalizou proeminentemente a espermatogênese e os parâmetros espermáticos, mostrando-se como opção de tratamento eficaz para prevenir a disfunção reprodutiva masculina e proteger as células germinativas da toxicidade (Chilukoti et al., 2024).

2.7 Referências bibliográficas

- Abd El Motteleb, D. M., Selim, S. A., & Mohamed, A. M. (2014). Differential effects of eugenol against hepatic inflammation and overall damage induced by ischemia/re-perfusion injury. *Journal of immunotoxicology*, *11*(3), 238-245. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2013.832444>
- Abdullah, N. (2020). Mercury in the diet, absorption and bio accessibility. *Technium BioChemMed*, *1*(1), 18-30.
- Agarwal, R., Goel, S. K., Chandra, R., & Behari, J. R. (2010). Role of vitamin E in preventing acute mercury toxicity in rat. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *29*(1), 70-78. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.10.003>
- Akarsu, S. A., Gür, C., Küçükler, S., Akaras, N., İleritürk, M., & Kandemir, F. M. (2024). Protective effects of syringic acid against oxidative damage, apoptosis, autophagy, inflammation, testicular histopathologic disorders, and impaired sperm quality in the testicular tissue of rats induced by mercuric chloride. *Environmental Toxicology*, *39*(10), 4803-4814. <https://doi.org/10.1002/tox.24395>
- Albasher, G., Alkahtani, S., & Alarifi, S. (2020). Berberine mitigates oxidative damage associated with testicular impairment following mercury chloride intoxication. *Journal of Food Biochemistry*, *44*(9), e13385. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13385>
- Anbu, S., & Anuradha, C. V. (2012). Protective effect of eugenol against alcohol-induced biochemical changes in rats. *International Journal of Research in Biotechnology and Biochemistry*, *2*(2), 13-18.
- Balali-Mood, M., Naseri, K., Tahergorabi, Z., Khazdair, M. R., & Sadeghi, M. (2021). Toxic mechanisms of five heavy metals: mercury, lead, chromium, cadmium, and arsenic. *Frontiers in pharmacology*, *12*, 643972. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.643972>

- Ballatori, N., & Clarkson, T. W. (1984). Dependence of biliary secretion of inorganic mercury on the biliary transport of glutathione. *Biochemical pharmacology*, *33*(7), 1093-1098. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(84\)90519-7](https://doi.org/10.1016/0006-2952(84)90519-7)
- Bal, S., Yadav, A., Verma, N., Aggarwal, N. K., & Gupta, R. (2018). Protective role of eugenol on arsenic induced oxidative DNA damage and modulatory effect of GSTO2 polymorphism. *Journal of Food Biochemistry*, *42*(5), e12565. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12565>
- Basta, P. C. (2024). Impacto do mercúrio em áreas protegidas e povos da floresta na Amazônia: uma abordagem integrada saúde-ambiente-Relatório Técnico.
- Bernhoft, R. A. (2012). Mercury toxicity and treatment: a review of the literature. *Journal of environmental and public health*, *2012*(1), 460508. <https://doi.org/10.1155/2012/460508>
- Boujbiha, M. A., Hamden, K., Guermazi, F., Bouslama, A., Omezzine, A., Kammoun, A., & El Feki, A. (2009). Testicular toxicity in mercuric chloride treated rats: association with oxidative stress. *Reproductive toxicology*, *28*(1), 81-89. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.03.011>
- Braune, B. M., Outridge, P. M., Fisk, A. T., Muir, D. C. G., Helm, P. A., Hobbs, K., Hoekstra, P. F., Kuzyk, Z. A., Kwan, M., Letcher, R. J., Lockhart, W. L., Norstrom, R. J., Stern, G. A., & Stirling, I. (2005). Persistent organic pollutants and mercury in marine biota of the Canadian Arctic: an overview of spatial and temporal trends. *Science of the total environment*, *351*, 4-56. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.10.034>
- Bridges, C. C., & Zalups, R. K. (2005). Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicology and applied pharmacology*, *204*(3), 274-308. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.09.007>
- Broussard, L. A., Hammett-Stabler, C. A., Winecker, R. E., & Roper-Miller, J. D. (2002). The toxicology of mercury. *Laboratory medicine*, *33*(8), 614-625.
- Carvalho, R. P. R., de Almeida Lima, G. D., & Machado-Neves, M. (2021). Effect of eugenol treatment in hyperglycemic murine models: A meta-analysis. *Pharmacological Research*, *165*, 105315.
- Carvalho, R. P. R., de Almeida Lima, G. D., Ribeiro, F. C. D., Ervilha, L. O. G., Oliveira, E. L., Viana, A. G. A., & Machado-Neves, M. (2022). Eugenol reduces serum testosterone levels and sperm viability in adult Wistar rats. *Reproductive Toxicology*, *113*, 110-119. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2022.08.012>
- Chen, S., & Ding, Y. (2025). Systematic bibliographic analysis of heavy metal remediation. *Water Science & Technology*, *91*(1), 56-68. <https://doi.org/10.2166/wst.2024.396>
- Chilukoti, S. R., Sahu, C., & Jena, G. (2024). Protective role of eugenol against diabetes-induced oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in rat testes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, *38*(1), e23593. <https://doi.org/10.1002/jbt.23593>
- Clarkson, T. W., & Magos, L. (2008). The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Critical reviews in toxicology*, *36*(8), 609-662. <https://doi.org/10.1080/10408440600845619>
- Damasceno, R. O. S., Pinheiro, J. L. S., Rodrigues, L. H. M., Gomes, R. C., Duarte, A. B. S., Emídio, J. J., Diniz, L. R. L., & Sousa, D. P. (2024). Anti-Inflammatory and Antioxidant

- Activities of Eugenol: An Update. *Pharmaceuticals*, 17(11), 1505. <https://doi.org/10.3390/ph17111505>
- Das Chagas Pereira de Andrade, F., & Mendes, A. N. (2020). Computational analysis of eugenol inhibitory activity in lipoxygenase and cyclooxygenase pathways. *Scientific reports*, 10(1), 16204. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73203-z>
- Deng, Y., Xu, Z., Liu, W., Yang, H., Xu, B., & Wei, Y. (2012). Effects of lycopene and proanthocyanidins on hepatotoxicity induced by mercuric chloride in rats. *Biological trace element research*, 146, 213-223.
- Dutczak, W. J., & Ballatori, N. (1994). Transport of the glutathione-methylmercury complex across liver canalicular membranes on reduced glutathione carriers. *Journal of Biological Chemistry*, 269(13), 9746-9751. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)36946-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)36946-6)
- Fadda, L. M., Alhusaini, A. M., Al-Qahtani, Q. H., Ali, H. M., & Hasan, I. H. (2020). Role of α -tocopherol and *Lactobacillus plantarum* in the alleviation of mercuric chloride-induced testicular atrophy in rat's model: Implication of molecular mechanisms. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 34(6), e22481. <https://doi.org/10.1002/jbt.22481>
- Fathy, M., Fawzy, M. A., Hintzsche, H., Nikaido, T., Dandekar, T., & Othman, E. M. (2019). Eugenol exerts apoptotic effect and modulates the sensitivity of HeLa cells to cisplatin and radiation. *Molecules*, 24(21), 3979. <https://doi.org/10.3390/molecules24213979>
- Flora, S. J. S., Mittal, M., & Mehta, A. (2008). Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian Journal of Medical Research*, 128(4), 501-523.
- Fulke, A. B., Ratanpal, S., & Sonker, S. (2024). Understanding heavy metal toxicity: Implications on human health, marine ecosystems and bioremediation strategies. *Marine Pollution Bulletin*, 206, 116707. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2024.116707>
- Georgin, J., Franco, D. S. P., Dehmani, Y., Nguyen-Tri, P., & El Messaoudi, N. (2024). Current status of advancement in remediation technologies for the toxic metal mercury in the environment: A critical review. *Science of the Total Environment*, 174501. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.174501>
- Gochfeld, M. (2003). Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. *Ecotoxicology and environmental safety*, 56(1), 174-179. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00060-5](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00060-5)
- Hazelhoff, M. H., & Torres, A. M. (2018). Gender differences in mercury-induced hepatotoxicity: potential mechanisms. *Chemosphere*, 202, 330-338. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.106>
- Huang, W.-C., Shu, L.-H., Kuo, Y.-J., Lai, K. S.-L., Hsia, C.-W., Yen, T.-L., Hsia, C.-H., Jayakumar, T., Yang, C.-H., & Sheu, J.-R. (2024). Eugenol Suppresses Platelet Activation and Mitigates Pulmonary Thromboembolism in Humans and Murine Models. *International journal of molecular sciences*, 25(4), 2098. <https://doi.org/10.3390/ijms25042098>
- Ito, M., Murakami, K., & Yoshino, M. (2005). Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. *Food and chemical toxicology*, 43(3), 461-466. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.11.019>
- Jo, H. K., Kim, G. W., Jeong, K. J., Do, Y. K., & Chung, S. H. (2014). Eugenol ameliorates hepatic steatosis and fibrosis by down-regulating SREBP1 gene expression via AMPK-

- mTOR-p70S6K signaling pathway. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 37(8), 1341-1351. <https://doi.org/10.1248/bpb.b14-00281>
- Kabuto, H., Tada, M., & Kohno, M. (2007). Eugenol [2-methoxy-4-(2-propenyl) phenol] prevents 6-hydroxydopamine-induced dopamine depression and lipid peroxidation inductivity in mouse striatum. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(3), 423-427.
- Kahramanoğullari, M., Erişir, M., Yaman, M., & Parlak Ak, T. (2024). Effects of naringenin on oxidative damage and apoptosis in liver and kidney in rats subjected to chronic mercury chloride. *Environmental Toxicology*, 39(5), 2937-2947. <https://doi.org/10.1002/tox.24164>
- Kandemir, F. M., Caglayan, C., Aksu, E. H., Yildirim, S., Kucukler, S., Gur, C., & Eser, G. (2020). Protective effect of rutin on mercuric chloride-induced reproductive damage in male rats. *Andrologia*, 52(3), e13524. <https://doi.org/10.1111/and.13524>
- Keppler, D., Leier, I., Jedlitschky, G., & König, J. (1998). ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance protein MRP1 and its apical isoform MRP2. *Chemico-Biological Interactions*, 111, 153-161. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(97\)00158-0](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(97)00158-0)
- Khalil, A. A., ur Rahman, U., Khan, M. R., Sahar, A., Mehmood, T., & Khan, M. (2017). Essential oil eugenol: Sources, extraction techniques and nutraceutical perspectives. *RSC advances*, 7(52), 32669-32681. <https://doi.org/10.1039/C7RA04803C>
- Kou, Z., Tran, F., & Dai, W. (2024). Heavy metals, oxidative stress, and the role of AhR signaling. *Toxicology and applied pharmacology*, 482, 116769. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2023.116769>
- Kumar, A., & Sharma, B. (2024). Cardioprotective Effect of Eugenol Against Cd-Induced Inflammation, Oxidative Stress, and Dyslipidemia in Male Rats: An In Vivo and Molecular Docking Study. *Biological Trace Element Research*, 203(1), 261-279. <https://doi.org/10.1007/s12011-024-04162-z>
- Kumar, A., Siddiqi, N. J., Alrashood, S. T., Khan, H. A., Dubey, A., & Sharma, B. (2021). Protective effect of eugenol on hepatic inflammation and oxidative stress induced by cadmium in male rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 139, 111588. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111588>
- Hamdy, S. M., Shaban, A. M., Aziz, Y. S. A., Mahmoud, A. M., Moemen, L. A. A., Ibrahim, W. M., & Gad, N. S. (2018). Ameliorative role of jania rubens alga against toxicity of heavy metal polluted water in male rats. *Policy*, 2(2), 38-46.
- Hansen, J. M., Zhang, H., & Jones, D. P. (2006). Differential oxidation of thioredoxin-1, thioredoxin-2, and glutathione by metal ions. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(1), 138-145. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.09.023>
- Jahan, S., Azad, T., Ayub, A., Ullah, A., Afsar, T., Almajwal, A., & Razak, S. (2019). Ameliorating potency of Chenopodium album Linn. and vitamin C against mercuric chloride-induced oxidative stress in testes of Sprague Dawley rats. *Environmental health and preventive medicine*, 24, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12199-019-0820-x>
- Joshi, D., Mittal, D. K., Shukla, S., Srivastav, S. K., & Dixit, V. A. (2017). Curcuma longa Linn. extract and curcumin protect CYP 2E1 enzymatic activity against mercuric chloride-induced hepatotoxicity and oxidative stress: A protective approach. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 69(6), 373-382. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2017.02.009>

- Kang, B., Wang, J., Guo, S., & Yang, L. (2024). Mercury-induced toxicity: Mechanisms, molecular pathways, and gene regulation. *Science of The Total Environment*, 173577. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.173577>
- Li, S., Wang, X., Xiao, Y., Wang, Y., Wan, Y., Li, X., Li, Q., Tang, X., Cai, D., Ran, B., & Wu, C. (2021). Curcumin ameliorates mercuric chloride-induced liver injury via modulating cytochrome P450 signaling and Nrf2/HO-1 pathway. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111426. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111426>
- Machado-Neves, M. (2022). Effect of heavy metals on epididymal morphology and function: An integrative review. *Chemosphere*, 291, 133020. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133020>
- Martínez, C. S., Torres, J. G. D., Peçanha, F. M., Anselmo-Franci, J. A., Vassallo, D. V., Salaices, M., Alonso, M. J., & Wiggers, G. A. (2014). 60-Day chronic exposure to low concentrations of HgCl₂ impairs sperm quality: hormonal imbalance and oxidative stress as potential routes for reproductive dysfunction in rats. *PLoS One*, 9(11), e111202. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111202>
- Mohamed, N. E. S. (2018). Protective effect of origanum oil on alterations of some trace elements and antioxidant levels induced by mercuric chloride in male rats. *Biological trace element research*, 182, 49-56.
- Moyano, P., Ruiz, M., García, J. M., Frejo, M. T., Anadon Baselga, M. J., Lobo, M., García, J., & del Pino, J. (2019). Oxidative stress and cell death induction by amitraz and its metabolite BTS-27271 mediated through cytochrome P450 and NRF2 pathway alteration in primary hippocampal cell. *Food and Chemical Toxicology*, 129, 87-96. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.042>
- Nejad, S. M., Özgüneş, H., & Başaran, N. (2017). Pharmacological and toxicological properties of eugenol. *Turkish journal of pharmaceutical sciences*, 14(2), 201.
- Obeng-Gyasi, E., & Obeng-Gyasi, B. (2024). Association of combined lead, cadmium, and mercury with systemic inflammation. *Frontiers in Public Health*, 12, 1385500. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2024.1385500>
- Othman, M. S., Safwat, G., Aboulkhair, M., & Moneim, A. E. A. (2014). The potential effect of berberine in mercury-induced hepatorenal toxicity in albino rats. *Food and Chemical Toxicology*, 69, 175-181. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.04.012>
- Raja, M. C., Srinivasan, V., Selvaraj, S., & Mahapatra, S. K. (2015). Versatile and synergistic potential of eugenol: a review. *Pharm. Anal. Acta*, 6(5), 1-6.
- Rajput, J. D., Bagul, S. D., Pete, U. D., Zade, C. M., Padhye, S. B., & Bendre, R. S. (2018). Perspectives on medicinal properties of natural phenolic monoterpenoids and their hybrids. *Molecular Diversity*, 22, 225-245. <https://doi.org/10.1007/s11030-017-9787-y>
- Rami, Y., Ebrahimpour, K., Maghami, M., Shoshtari-Yeganeh, B., & Kelishadi, R. (2022). The association between heavy metals exposure and sex hormones: a systematic review on current evidence. *Biological Trace Element Research*, 1-20. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-02947-0>
- Rao, M. V., & Sharma, P. S. N. (2001). Protective effect of vitamin E against mercuric chloride reproductive toxicity in male mice. *Reproductive Toxicology*, 15(6), 705-712. [https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(01\)00183-6](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(01)00183-6)

- Rathore, H. S. (2000). Prevention of toxic effects of mercuric chloride on Some male accessory organs in mice with a Multiherbal drug “SPEMAN”. *Ancient Science of Life*, 20(1&2), 6-10.
- Renu, K., Chakraborty, R., Myakala, H., Koti, R., Famurewa, A. C., Madhyastha, H., Vellingiri, B., George, A., & Valsala Gopalakrishnan, A. (2021). Molecular mechanism of heavy metals (Lead, Chromium, Arsenic, Mercury, Nickel and Cadmium)-induced hepatotoxicity—A review. *Chemosphere*, 271, 129735. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129735>
- Rizzetti, D. A., Martinez, C. S., Escobar, A. G., Silva, T. M., Uranga-Ocio, J. A., Peçanha, F. M., Vassallo, D. V., Castro, M. M., & Wiggers, G. A. (2017). Egg white-derived peptides prevent male reproductive dysfunction induced by mercury in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 100, 253-264. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.12.038>
- Sampada, M. P., & David, M. (2024). Mercuric chloride induced reproductive toxicity associated with oxidative damage in male Wistar albino rat, *Rattus norvegicus*. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 1-27. <https://doi.org/10.1007/s00210-024-03585-8>
- Shalan, M. G. (2022). Amelioration of mercuric chloride-induced physiologic and histopathologic alterations in rats using vitamin E and zinc chloride supplement. *Heliyon*, 8(12). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12036>
- Shawon, S. I., Reyda, R. N., & Qais, N. (2024). Medicinal herbs and their metabolites with biological potential to protect and combat liver toxicity and its disorders: A review. *Heliyon*, 10(3), e25340. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e25340>
- Tabrez, S., & Ahmad, M. (2010). Cytochrome P450 system as a toxicity biomarker of industrial wastewater in rat tissues. *Food and Chemical Toxicology*, 48(3), 998-1001. doi: 10.1016/j.fct.2009.12.024
- Ulanowska, M., & Olas, B. (2021). Biological properties and prospects for the application of eugenol—a review. *International journal of molecular sciences*, 22(7), 3671. <https://doi.org/10.3390/ijms22073671>
- Wadaan, M. A. (2009). Effects of mercury exposure on blood chemistry and liver histopathology of male rats. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 4(3), 126-131.
- Witczak, A., Rajkowska-Myśliwiec, M., Pokorska-Niewiada, K., & Navarro, C. B. (2024). Health risks associated with mercury intake from rice and rice products. *Food and Chemical Toxicology*, 191, 114905. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2024.114905>
- World Health Organization. (2002). *Guidelines for drinking-water quality*. World Health Organization.
- Wu, Y.-S., Osman, A. I., Hosny, M., Elgarahy, A. M., Eltaweil, A. S., Rooney, D. W., Chen, Z., Rahim, N. S., Sekar, M., Gopinath, S. C. B., Mat Rani, N. N. I., Batumalaie, K., & Yap, P.-S. (2024). The toxicity of mercury and its chemical compounds: molecular mechanisms and environmental and human health implications: a comprehensive review. *Acs Omega*, 9(5), 5100-5126.
- Yang, L., Zhang, Y., Wang, F., Luo, Z., Guo, S., & Strähle, U. (2020). Toxicity of mercury: Molecular evidence. *Chemosphere*, 245, 125586. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125586>

Ynalvez, R. A., Rangel Jr, R. A., & Gutierrez Jr, J. A. (2025). Mercury toxicity resulting from enzyme alterations-minireview. *BioMetals*, 1-14. <https://doi.org/10.1007/s10534-025-00663-z>

3. CAPÍTULO 1: Ação hepatoprotetora do eugenol contra danos oxidativos e alterações morfológicas induzidas por mercúrio em ratos Wistar

Resumo

A exposição ao mercúrio é um problema de saúde pública por seus efeitos hepatotóxicos, causando estresse oxidativo, alterações enzimáticas e danos morfológicos. A busca por compostos que mitiguem os efeitos danosos causados pelo metal torna-se importante. Entre esses compostos, o eugenol se mostra promissor ao atuar na proteção, em diferentes órgãos, contra a toxicologia de metais pesados, não havendo estudos sobre sua ação mediante os efeitos nocivos do mercúrio. Assim, este estudo investigou a ação protetora do eugenol contra a toxicidade hepática induzida pelo mercúrio em ratos Wistar. Quarenta ratos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: controle, eugenol, mercúrio e eugenol + mercúrio. Os animais receberam 10 mg Kg⁻¹ de eugenol e 0,6 mg Kg⁻¹ de mercúrio, nos respectivos grupos, diariamente por 30 dias. Após o período experimental, os fígados foram recuperados e análises bioquímicas, histológicas e enzimáticas foram realizadas para avaliar o impacto da exposição ao mercúrio e a potencial atividade protetora do eugenol. As concentrações de marcadores séricos de danos hepático foram maiores em animais expostos ao mercúrio, enquanto a exposição ao eugenol diminuiu a concentração sérica dos marcadores. Os resultados mostraram que a exposição ao eugenol reduziu as concentrações de marcadores de estresse oxidativo, incluindo malondialdeído e óxido nítrico, elevados pela ação do mercúrio. Além disso, o composto fenólico preservou a atividade de enzimas antioxidantes como catalase e glutathione-S-transferase. Histologicamente, os animais expostos ao mercúrio exibiram maior número de lesões exemplificadas pela presença de infiltrado inflamatório e hemorragia focal, enquanto aqueles expostos ao eugenol apresentaram estrutura mais preservada do órgão. O eugenol também foi capaz de reduzir o acúmulo do mercúrio no fígado. Os dados obtidos sugerem que o eugenol é um agente eficaz na proteção contra a hepatotoxicidade induzida por metais pesados, destacando seu potencial terapêutico para minimizar os danos hepáticos causados pelo mercúrio.

Palavras-chave: Hepatócito; Histomorfometria; Estresse oxidativo; Bioacumulação.

Introdução

A contaminação por mercúrio representa um problema grave de saúde pública, sendo a segunda causa mais comum de contaminação por metais (Zhao et al., 2022; Brocza et al., 2024; Kang et al., 2024). A disponibilidade ambiental ao mercúrio é exacerbada por atividades antropogênicas, como mineração ilegal e atividade industrial, que liberam aproximadamente 2.220 toneladas de mercúrio na atmosfera a cada ano (Jahan et al., 2019; Li et al., 2022). O mercúrio em sua forma inorgânica, particularmente como cloreto de mercúrio (HgCl_2), é altamente tóxico e foi classificado como carcinogênico pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA; Jahan et al., 2019). As principais vias de exposição ao mercúrio inorgânico incluem água, alimentos e o ar (SaravanaKumar et al., 2014). Devido à sua natureza não biodegradável, toxicidade em baixas concentrações e à ausência de função fisiológica no corpo humano, o mercúrio é considerado um metal pesado de grande interesse para estudos toxicológicos (Martinez et al., 2014).

Concentrações elevadas de mercúrio estão associadas à danos em órgãos vitais, como fígado, rins e o cérebro. O fígado, sendo um órgão central na desintoxicação do organismo, é particularmente afetado pela ação do mercúrio. Após ingerido, o mercúrio é absorvido no intestino e pode causar danos celulares irreversíveis (Goudarzi et al., 2017; Shalan, 2022). Um exemplo recente de contaminação por mercúrio ocorreu entre os indígenas Yanomamis da Amazônia brasileira, que foram gravemente afetados pelo mercúrio inorgânico proveniente do garimpo ilegal em suas terras (Basta, 2024). O mercúrio inorgânico liberado nos rios é transformado em metilmercúrio, acumulando em peixes consumidos pela população local. Entre os sintomas dessa contaminação involuntária estão distúrbios neurológicos, alterações cognitivas e disfunções imunológicas (Kim et al., 2016; Kang et al., 2024). Um dos principais mecanismos de ação do mercúrio é a indução de estresse oxidativo, que provoca lesões celulares e disfunções orgânicas severas (Farina et al., 2013). Estudos envolvendo animais revelaram um desbalanço na atividade das enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase e catalase, em diferentes órgãos após exposição ao mercúrio, bem como aumento de malondialdeído, um indicador de peroxidação lipídica (Boujbiha et al., 2009; Goudarzi et al., 2017; Naderi et al., 2023).

Dado que o estresse oxidativo é um dos principais mecanismos pelos quais o mercúrio induz danos hepáticos, torna-se relevante a busca por compostos antioxidantes que atuem como quelante desse metal. Compostos que possuem grupos fenólicos, como o eugenol, têm apresentado propriedades antioxidantes eficazes na neutralização de radicais livres (Nagababu

et al., 2010). Eles podem interagir rapidamente com espécies reativas de oxigênio, como os radicais hidroxila (OH•) e ânion superóxido (O²⁻), protegendo estruturas celulares contra danos oxidativos. A capacidade antioxidante desses compostos depende da facilidade com que eles perdem elétrons para neutralizar radicais livres (Fujisawa et al., 2002; Nagababu et al., 2010). O eugenol, encontrado em óleos essenciais e extratos de cravo (*Syzygium aromaticum*), tem se destacado como um potente antioxidante e sem efeitos colaterais conhecidos, diferente de compostos fenólicos sintéticos (Ito et al., 2005; Adefegha et al., 2021; Carvalho et al., 2022). O eugenol tem mostrado eficácia na redução da peroxidação lipídica e na proteção de tecidos contra metais pesados, como cádmio e chumbo (Ito et al., 2005; Nagababu et al., 2010; Chilukoti et al., 2024; Huang et al., 2024).

Diante dos impactos graves que o mercúrio provoca na saúde humana e a necessidade em mitigar esses danos, é relevante avaliar o efeito protetor de substâncias como o eugenol. Por isso, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da ingestão de eugenol e mercúrio, separadamente e simultaneamente, sobre parâmetros hepáticos de ratos Wistar adultos. A maneira como eugenol e mercúrio foram fornecidos visa verificar se há uma atividade protetora do eugenol contra efeitos hepatotóxicos deste metal pesado. Para isso, adotamos uma abordagem que engloba análises bioquímicas, enzimáticas, histológicas e histomorfométricas, além de determinar a proporção de mercúrio e outros microelementos no fígado dos animais.

Materiais e métodos

Animais e declaração de ética

Quarenta ratos Wistar machos (~100 dias de idade; ± 300g) foram fornecidos pelo Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os animais foram alojados em gaiolas individuais de polipropileno e mantidos sob condições controladas de temperatura (21 °C) e fotoperíodo (ciclo claro/escuro de 12 h). Os animais tiveram acesso à ração comercial (Nuvilab CR-1; Quimtia S.A; Paraná, Brazil) e água filtrada *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa, Brasil (CEUA nº 06/2024). Ainda, as práticas e cuidados na manipulação dos animais seguiu as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Desenho experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais ($n = 10$ animais por grupo). Ratos controle receberam 0,5 mL de Tween-20 a 2% (veículo), enquanto os demais grupos experimentais tiveram seus animais expostos ao eugenol (10 mg Kg^{-1} ; Sigma Chemical Co. [St. Louis, MO, USA]), mercúrio ($0,6 \text{ mg Kg}^{-1}$) na forma de HgCl_2 (Sigma Chemical Co. [St. Louis, MO, USA]), e as duas substâncias (eugenol [10 mg Kg^{-1}] e mercúrio [$0,6 \text{ mg Kg}^{-1}$]). Todas essas substâncias foram fornecidas por gavagem, no volume de 0,5 mL por 30 dias, caracterizando uma exposição subaguda (Eaton & Gilbert, 2013). No grupo de ratos co-expostos aos dois compostos, a administração da solução de mercúrio ocorreu 30 minutos depois da administração do eugenol. O HgCl_2 foi dissolvido em água destilada, enquanto o eugenol foi diluído em solução de Tween-20 a 2% (veículo) que, de acordo com estudos prévios, não causa alterações teciduais (Carvalho et al., 2022). A dose de mercúrio ($0,6 \text{ mg Kg}^{-1}$) testada corresponde a 100x a dose diária de mercúrio inorgânico permitida na água (World Health Organization, 2017). Já a dose de eugenol (10 mg Kg^{-1}) corresponde a uma dose segura para utilização no tratamento de ratos a longo prazo (Carvalho et al., 2022).

Eutanásia, coleta de órgãos e biometria

Após 30 dias de tratamento, os animais foram pesados, sedados e anestesiados com altas concentrações de xilazina (30 mg Kg^{-1} intraperitoneal) e cloridrato de quetamina (300 mg Kg^{-1} intraperitoneal), respectivamente. Com os animais anestesiados, o sangue foi coletado por punção cardíaca para obtenção do soro destinado a análises bioquímicas. Em seguida, os fígados foram removidos, dissecados e pesados, sendo também mensurado o volume do órgão. Fragmentos do lobo direito foram recuperados, rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ para determinação enzimática, mineral e quantificação de atividade de ATPases. Outros fragmentos do órgão foram fixados em solução de formalina tamponada a 10% por 48 h, para análises histológicas e estereológicas. Além disso, fragmentos frescos do fígado foram utilizados para avaliar o conteúdo de água no órgão (mL/g). Para isso, os fragmentos foram pesados e secos a 60°C por 96 h. O conteúdo de água (%) resultou da diferença entre o peso dos fragmentos úmidos e secos (Novaes et al., 2012). Por fim, o índice somático do fígado (ISF%) foi calculado, normalizando o peso do fígado pelo peso corporal final (Gonçalves et al., 2012).

Marcadores funcionais de dano e do metabolismo hepático

Amostras de sangue ($n = 6/\text{grupo}$) foram centrifugadas a $2000 \times g$ por 15 min para obtenção do soro. Além disso, fragmentos congelados do parênquima hepático (100 mg; $n = 6/\text{grupo}$) foram homogeneizados em 1 mL de tampão fosfato (PBS; pH 7.4, 0.2M) e centrifugadas a $15.000 \times g$ por 10 min a 4°C (Carvalho et al., 2022). Em seguida, amostras de soro e os sobrenadantes da homogeneização do órgão foram utilizados para avaliar as concentrações séricas e hepáticas das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP), utilizando kits bioquímicos (Laboratórios Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil) seguindo as instruções do fabricante.

Determinação de microminerais

A proporção de mercúrio e outros elementos químicos no fígado foi determinada em fragmentos de órgãos congelados ($n = 6/\text{grupo}$) (Guimarães-Ervilha et al., 2021). Os fragmentos foram secos em estufa a 60°C por 96 horas e revestidos por carbono (Quorum Q150 T, East Grinstead, West Sussex, Reino Unido). Após, as amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL, JSM-6010LA) equipado com um detector de desvio de silício com radiação de raios X. Foi obtida a proporção de mercúrio (Hg), selênio (Se), zinco (Zn), potássio (K), cobre (Cu), magnésio (Mg), sódio (Na), cálcio (Ca), manganês (Mn) e ferro (Fe). Os resultados foram expressos como o valor percentual médio (%) das proporções entre os elementos presentes nas amostras.

Análise de enzimas antioxidantes marcadores de estresse oxidativo

Amostras de fígado ($n = 6/\text{grupo}$) foram homogeneizadas em PBS (1 mL/100 mg; pH 7,4), centrifugadas a $10.000 \times g$ por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi separado para análises da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST). A atividade de SOD foi estimada com base na capacidade desta enzima de catalisar a reação do superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (Dieterich et al., 2000). A atividade da CAT foi avaliada medindo a taxa de decomposição de H_2O_2 (Aebi, 1984). Além disso, a atividade da GST foi calculada com base na taxa de formação do conjugado 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno com glutathione (Habig et al., 1974). Os resultados foram normalizados em relação às concentrações de proteína total, quantificada pelo método de Bradford (1976). A atividade dessas enzimas foi expressa como unidade (U) por miligrama de proteína. A capacidade antioxidante total foi medida no fígado pelo método do Poder Antioxidante Redutor de Férrico (FRAP) (Benzie & Strain, 1996).

A peroxidação lipídica foi avaliada no órgão pela análise das concentrações teciduais de malondialdeído (MDA), para isso o sobrenadante foi adicionado à solução de TBARS (15% de ácido tricloroacético, 0,375% de ácido tiobarbitúrico, 0,25 N de HCl) por 15 min. A formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi monitorada a 535 nm (Buege & Aust, 1978). A produção de óxido nítrico (NO) foi determinada através da reação de Griess (Tsikas 2007). 50 µL de amostras foram incubadas com reagente de Griess (1:1) (1% sulfanilamida, 0,1% N-(1-naftil) etilenodiamina e 2,5% de ácido fosfórico). A absorbância foi medida a 570 nm. A oxidação de proteínas foi analisada pela quantificação de proteínas carboniladas (PC) nos pellets dos órgãos homogeneizados, usando o método do 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) (Levine et al., 1994). Tais análises foram realizadas utilizando leitor de microplaca ELISA (Multiskan SkyHigh, Thermo Scientific).

Atividades das ATPases totais, Ca^{2+} , Na^+/K^+ e Mg^{2+} ATPases

Fragmentos do fígado (100 mg; $n = 6$ /grupo) foram homogeneizados em tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 7,4) e centrifugados a $1500 \times g$ por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi usado para a determinação da atividade de ATPases total (Evans, 1969), Ca^{2+} (Hjertén & Pan, 1983), Na^+/K^+ (Bonting et al., 1962) e Mg^{2+} ATPases (Ohnishi et al., 1982). Uma solução de ATP (0,01 M) foi utilizada como substrato para gerar fosfato livre pela atividade de ATPases. Foi adicionado 500 µL de ácido tricloroacético a 10% (TCA 10%) para interromper a reação e os tubos foram centrifugados a $1.500 \times g$ por 10 min. Por fim, o sobrenadante foi usado para medir o teor de fósforo utilizando um kit bioquímico (Laboratórios Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil), conforme descrito nas instruções do fabricante. A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). A atividade da ATPase foi expressa em microgramas de fósforo liberado por minuto por miligrama de proteína (Carvalho et al., 2022).

Processamento histológico e histopatologia

Após o período de fixação, os fragmentos de fígado ($n = 6$ /grupo) foram desidratados em séries crescentes de etanol (70, 80, 90 e absoluto) e incluídos em 2-hidroxietil metacrilato (Historesin[®], Leica Microsystems, Nussloch, Alemanha). Cortes semi-seriados de 3 µm de espessura foram obtidos utilizando um micrótomo rotativo (RM 2255, Leica, Nussloch, Alemanha). Os cortes foram corados com os corantes hematoxilina e eosina (HE) para análises histológicas e estereológicas, e com ácido periódico-Schiff (PAS) para quantificação de glicogênio por histoquímica. Cada lâmina continha 10 secções do órgão, com distância de 10 cortes entre as secções. Nas lâminas coradas com HE, foram avaliadas 10 regiões do

parênquima hepático por animal, utilizando um microscópio (Olympus CX40, Tóquio, Japão) com aumento de 200x. As lesões identificadas foram classificadas quanto a sua distribuição e intensidade, como i) Focal: com a presença discreta de 1 a 3 pontos de lesão no mesmo corte histológico; ii) Multifocal: focos de lesões moderadas em mais de 3 pontos no mesmo corte histológico; iii) Difusa: presença de lesões intensas em todo o corte histológico (Estrela-Lima et al., 2018).

Estereologia hepática e histoquímica

Para as análises estereológicas, foram obtidas dez imagens digitais por animal, de cada coloração realizada com aumento de 200x, utilizando um microscópio óptico (Olympus BX-53, Tóquio, Japão) conectado a uma câmera digital (Olympus DP73, Tóquio, Japão). Para o cálculo de proporção de cada componente hepático, as secções coradas com HE foram analisadas em um sistema de grade de 266 pontos em áreas de teste padrão ($2,38 \times 10^6 \mu\text{m}^2$), totalizando 2.660 pontos por animal. Foram registrados pontos coincidentes em componentes hepáticos como citoplasma e núcleo de hepatócitos, capilares sinusoidais, vasos sanguíneos e células de Kupffer, e em infiltrados inflamatórios. A análise foi realizada com o software ImageJ[®] (*National Institutes of Health*). Para o cálculo do volume de cada componente foi utilizada a seguinte fórmula: $V = PP/PT \times V_0$, onde PP é o número de pontos localizados no componente de interesse, PT é o número total de pontos na área analisada e V_0 é o volume do órgão (Souza et al., 2018; Mandarin-de-Lacerda, 2003). As secções coradas com PAS foram analisadas no software Image ProPlus[®] (Media Cybernetics, Inc). Os pixels identificados como positivos para glicogênio foram quantificados com base no histograma de cores do software, e os resultados expressos como porcentagem da área total da imagem (Mandarin-de-Lacerda, 2003; Souza et al., 2018).

Análise estatística

Os resultados foram avaliados a avaliação de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) unidirecional. As médias foram comparadas pelo *teste post hoc* de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. A análise estatística e os gráficos foram gerados utilizando o software estatístico GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (média \pm DP).

Resultados

Parâmetros biométricos do corpo e fígado de ratos expostos ao eugenol e mercúrio

Os resultados mostraram que não houve diferença entre grupos experimentais quanto ao peso corporal, índice somático do fígado e teor de água no órgão ($p > 0,05$; Tab. 1). O peso médio do fígado foi maior em ratos expostos ao eugenol que em ratos expostos ao mercúrio ($p < 0,05$; Tab. 1).

Tabela 1. Parâmetros biométricos de ratos Wistar expostos ao eugenol e ao mercúrio por 30 dias.

Parâmetros	Controle	Eugenol	Mercúrio	Eugenol + Mercúrio
Peso corporal (g)	386,60 ± 34,29 ^a	391,20 ± 18,35 ^a	363,00 ± 16,26 ^a	377,50 ± 17,01 ^a
Peso do fígado (g)	13,75 ± 1,50 ^{ab}	14,94 ± 1,50 ^a	12,57 ± 1,49 ^b	14,40 ± 0,91 ^{ab}
Índice somático do fígado (%)	0,04 ± 0,002 ^a	0,04 ± 0,003 ^a	0,04 ± 0,002 ^a	0,04 ± 0,001 ^a
Teor de água (%)	67,79 ± 1,44 ^a	67,51 ± 0,96 ^a	68,68 ± 1,73 ^a	67,71 ± 3,84 ^a

Média ± DP. Grupo controle: ratos que receberam Tween-20 a 2% (0,5 mL) por gavagem; Grupo eugenol: ratos expostos ao eugenol 10 mg Kg⁻¹ (diluído Tween-20 a 2%; 0,5 mL) por gavagem; Grupo mercúrio: ratos expostos ao mercúrio 0,6 mg Kg⁻¹ (diluído em água destilada; 0,5 mL) por gavagem; Grupo eugenol + mercúrio: ratos expostos a eugenol 10 mg Kg⁻¹ e, 30 minutos depois, ao mercúrio 0,6 mg Kg⁻¹ (0,5 mL) por gavagem. Diferentes letras sobrescritas na mesma linha (a e b) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$) por ANOVA e teste de Tukey. ($n = 6$ ratos/grupo).

Proporção de microminerais no fígado de ratos expostos ao eugenol e mercúrio

A exposição ao mercúrio causou acúmulo deste metal pesado no fígado de ratos dos grupos experimentais mercúrio e eugenol + mercúrio. No entanto, a concentração de mercúrio foi menor no fígado de animais expostos simultaneamente às duas substâncias ($p < 0,05$; Fig. 1). A proporção de Se, K e Fe foi menor em ratos expostos somente ao mercúrio que em ratos controle ($p < 0,05$; Fig. 1). A proporção de Fe também foi menor nos animais do grupo mercúrio em comparação aos animais do grupo eugenol ($p < 0,05$; Fig. 1). A proporção de Zn, Cu, Mg, Na, Ca e Mn não diferiu entre ratos dos grupos experimentais ($p > 0,05$; Fig. 1).

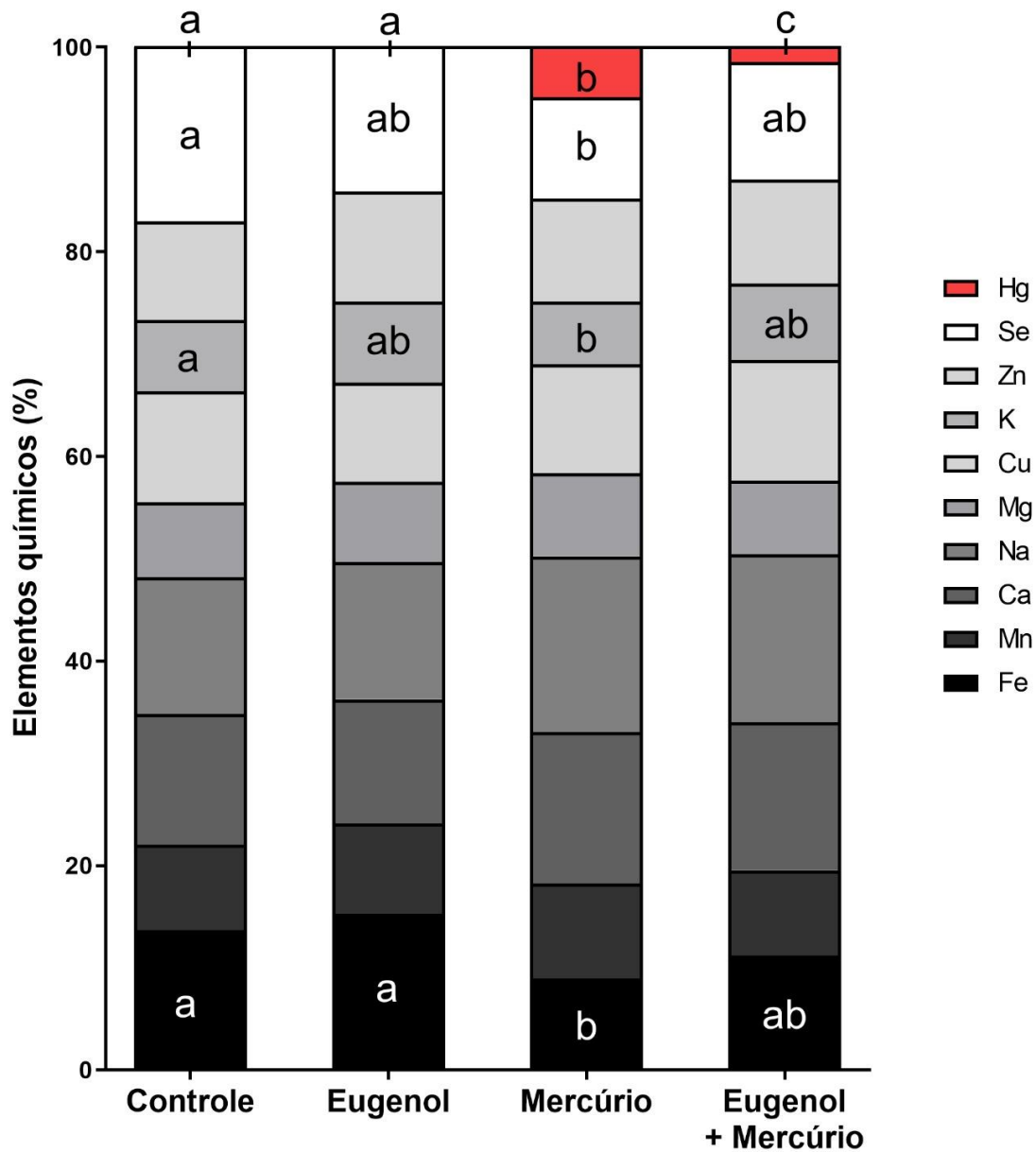


Figura 1: Proporção de elementos químicos no fígado de ratos Wistar expostos a 10 mg Kg⁻¹ de eugenol e 0,6 mg Kg⁻¹ de mercúrio por 30 dias. A proporção de mercúrio (Hg), selênio (Se), zinco (Zn), potássio (K), cobre (Cu), magnésio (Mg), sódio (Na), cálcio (Ca), manganês (Mn) e ferro (Fe) no parênquima hepático foi expressa como uma porcentagem. Diferentes letras sobscritas na mesma linha (a, b e c) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$) por ANOVA e teste de Tukey ($n = 6$ ratos/grupo).

Marcadores de dano e metabolismo hepático

A exposição ao mercúrio causou um aumento nas concentrações séricas de ALT e AST em relação às concentrações detectadas no soro de ratos controle, expostos ao eugenol e expostos simultaneamente ao eugenol e mercúrio ($p < 0,05$; Fig. 2A e C). As concentrações séricas de ALP foram maiores em animais expostos ao mercúrio que em animais controle e aqueles expostos ao eugenol ($p < 0,05$; Fig. 2E). No fígado, ALT apresentou maior

concentração em ratos expostos ao mercúrio que ratos controle e expostos ao eugenol ($p < 0,05$; Fig. 2B). Já a concentração hepática de AST não diferiu entre os grupos experimentais ($p > 0,05$; Fig. 2D). ALP, por sua vez, apresentou maior concentração em ratos expostos ao mercúrio que em ratos controle ($p < 0,05$; Fig. 2F).

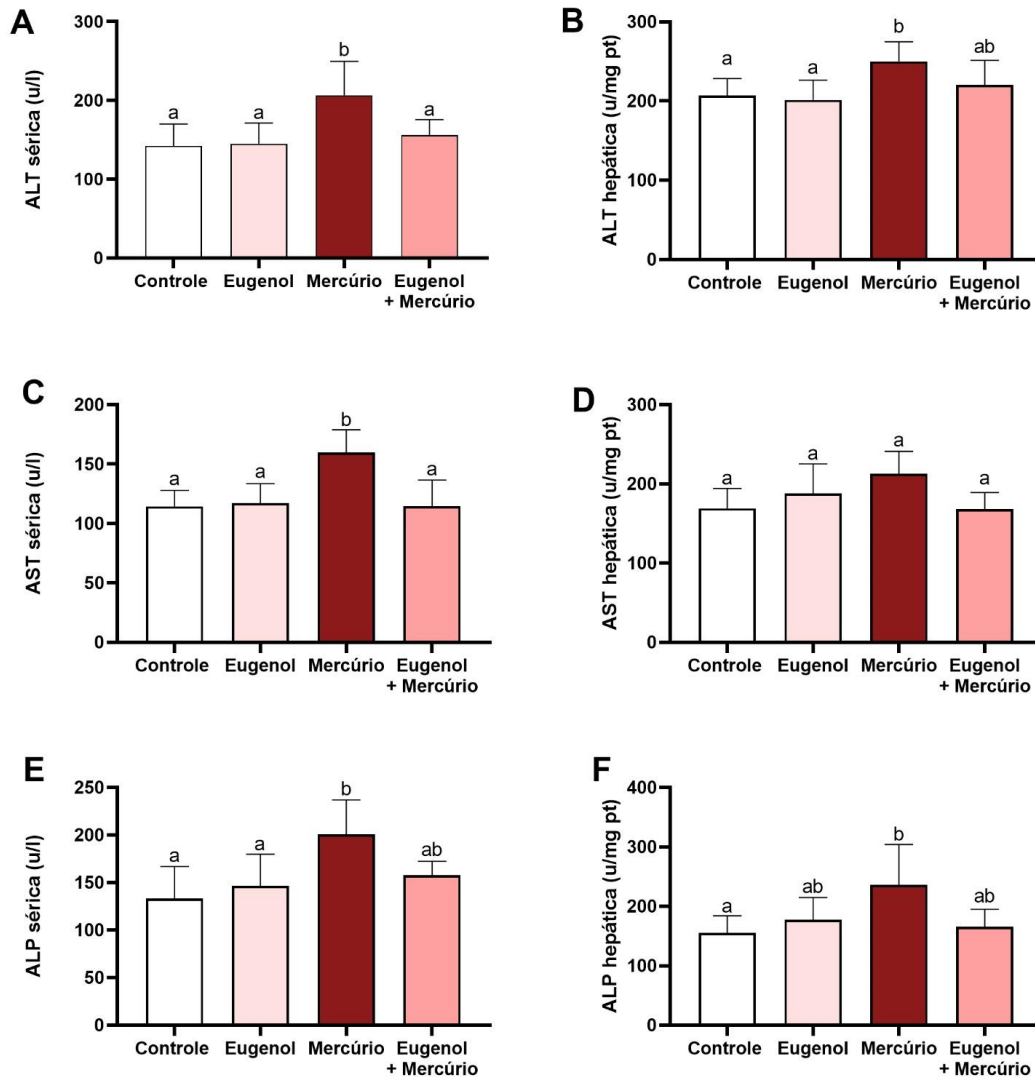


Figura 2: Efeito subagudo da exposição ao eugenol (10 mg Kg^{-1}) e ao mercúrio ($0,6 \text{ mg Kg}^{-1}$) sobre enzimas séricas e hepáticas de ratos Wistar adultos. Atividade da alanina aminotransferase (ALT) no soro (A) e fígado (B), aspartato aminotransferase (AST) no soro (C) e fígado (D) e fosfatase alcalina (ALP) no soro (E) e fígado (F). Os dados são apresentados como média \pm DP. Diferentes letras sobrescritas na mesma linha (a e b) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$) por ANOVA e teste de Tukey. ($n = 6$ ratos/grupo).

Atividades das ATPases totais, Ca^{2+} , Na^+/K^+ e Mg^{2+}

A atividade das ATPases totais foi maior em ratos expostos ao mercúrio que em ratos controle ($p < 0,05$; Fig. 3A). Já a atividade da Na^+/K^+ ATPase foi maior em ratos expostos isoladamente ao eugenol e ao mercúrio que em ratos controle ($p < 0,05$; Fig. 3B). A atividade

de Ca^{2+} ATPase e Mg^{2+} ATPase não diferiu entre ratos dos grupos experimentais ($p > 0,05$; Fig. 3C e D).

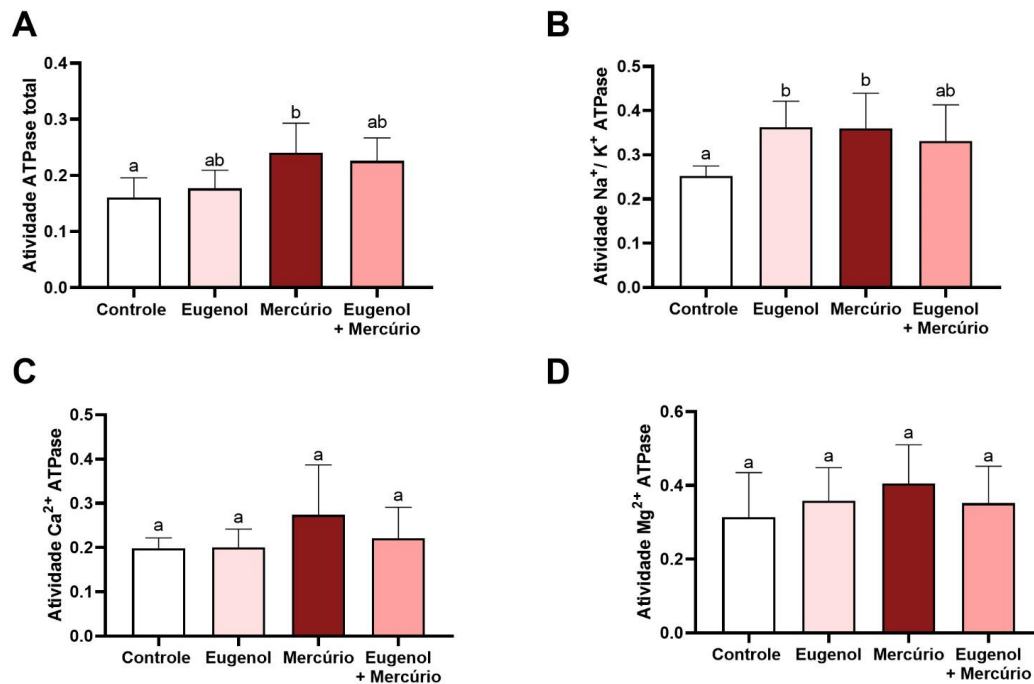


Figura 3: Efeito do eugenol (10 mg Kg^{-1}) e do mercúrio ($0,6 \text{ mg Kg}^{-1}$) na atividade da ATPase no fígado de ratos Wistar adultos. (A) Atividade de ATPase total, (B) Atividade de Na^+/K^+ ATPase, (C) Atividade de Ca^{2+} ATPase e (D) Atividade de Mg^{2+} ATPase. Os dados são apresentados como média \pm DP. Diferentes letras sobrescritas na mesma linha (a e b) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$) por ANOVA e teste de Tukey. ($n = 6$ ratos/grupo).

Análise da atividade de enzimas antioxidantes e metabólitos oxidativos

Não foram observadas alterações na atividade da enzima SOD entre os animais dos grupos controle e expostos ao eugenol e mercúrio ($p > 0,05$; Fig. 4A). A atividade de CAT e GST foi menor no fígado de animais expostos ao mercúrio que em ratos controle ou aqueles que ingeriram somente eugenol ($p < 0,05$; Fig. 4B e C). Animais expostos ao mercúrio isoladamente apresentaram menores valores para FRAP que ratos expostos ao eugenol de forma isolada ou associado ao mercúrio ($p < 0,05$; Fig. 4D).

Além disso, as concentrações de NO foram maiores no fígado de ratos expostos ao mercúrio que em ratos controle e aqueles expostos ao eugenol e mercúrio ($p < 0,05$; Fig. 4E). As concentrações de MDA foram maiores no fígado de ratos expostos ao mercúrio em relação aos ratos dos outros grupos experimentais ($p < 0,05$; Fig. 4F). Já as concentrações de PC foram maiores em ratos expostos ao mercúrio, tanto de forma isolada quanto simultaneamente com o eugenol, em relação aos ratos controle ($p > 0,05$; Fig. 4G).

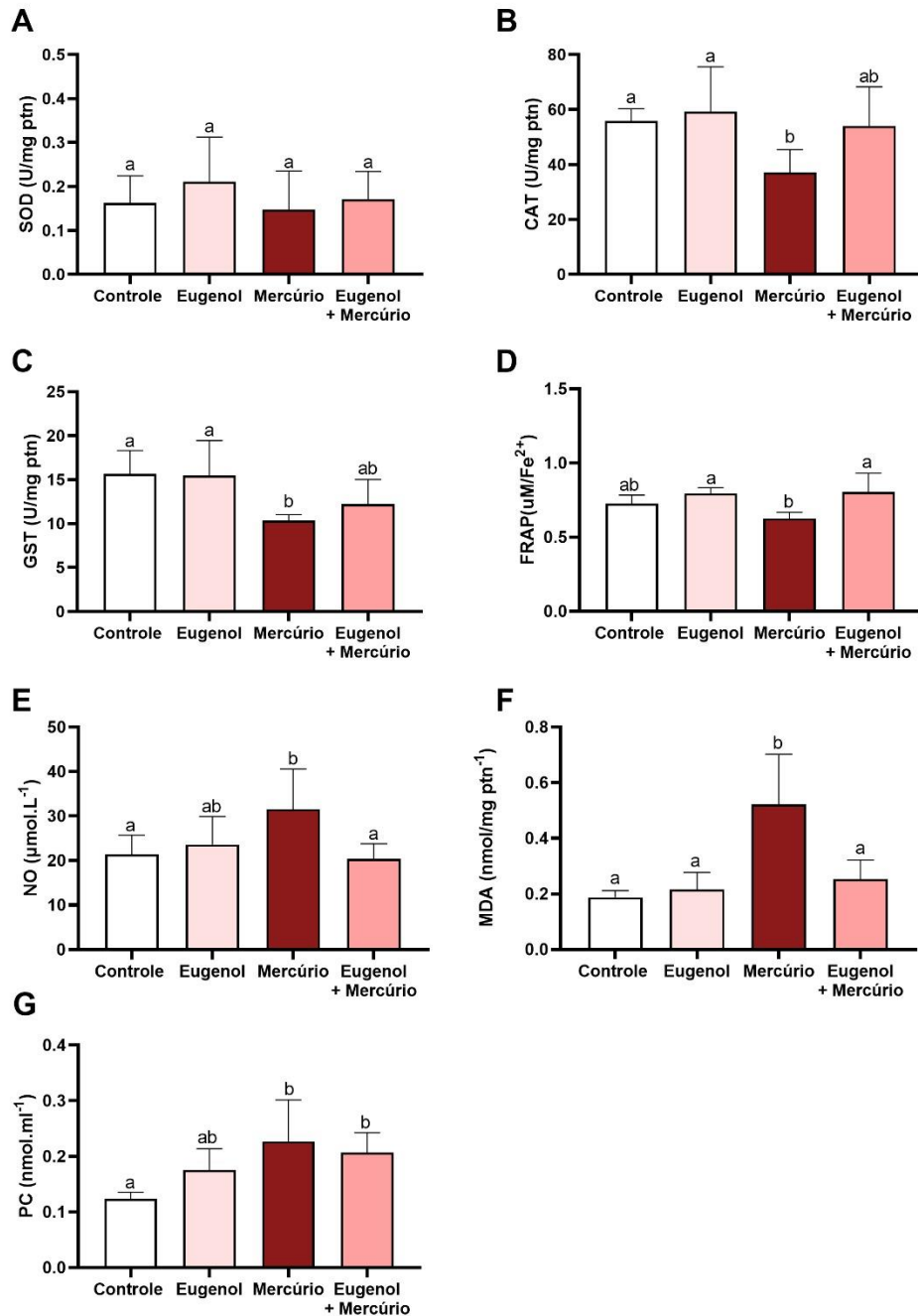


Figura 4: Efeito do eugenol (10 mg Kg⁻¹) e do mercúrio (0,6 mg Kg⁻¹) na atividade de enzimas antioxidantes e nas concentrações de marcadores de estresse oxidativo no fígado de ratos Wistar expostos durante 30 dias. (A) Superóxido dismutase (SOD); (B) Catalase (CAT); (C) Glutaciona S-transferase (GST); (D) Capacidade antioxidante total (FRAP); (E) Óxido nítrico (NO); (F) Malondialdeído (MDA); (G) Proteínas carboniladas (PC). Os dados são apresentados como média ± DP. Diferentes letras sobrescritas na mesma linha (a e b) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$) por ANOVA e teste de Tukey. ($n = 6$ ratos/grupo).

Histopatologia

O fígado de animais do grupo controle apresentou características histológicas normais, com organização em lóbulos hepáticos, cordões de hepatócitos sem sinais de vacuolização ou degeneração, capilares sinusoidais preservados e ausência de infiltrado inflamatório relevante,

congestão, dilatação capilar ou hemorragia, indicando um parênquima hepático saudável (Fig. 5A, B e C; Tab.2). Nos animais expostos ao eugenol, foram observadas apenas alterações leves na histologia do fígado. Houve congestão focal (3/6 ratos) e congestão multifocal moderada (1/6 ratos), além de infiltrado inflamatório focal moderado (3/6 ratos) (Fig. 5D, E e F; Tab.2). Fígados de ratos expostos ao mercúrio apresentaram alterações histológicas em diferentes graus de intensidade, como congestão multifocal moderada (3/6 ratos), infiltrado inflamatório multifocal moderado (4/6 ratos), degeneração hidrópica focal leve (3/6 ratos) e multifocal leve (1/6 ratos), esteatose focal leve (2/6 ratos), além de dilatação capilar e hemorragia focal leve (1/6 ratos) (Fig. 5G, H e I; Tab.2). Ratos expostos simultaneamente ao eugenol e mercúrio apresentaram congestão focal leve (1/6 ratos) e multifocal moderada (5/6 ratos), infiltrado inflamatório multifocal moderado (4/6 ratos), degeneração hidrópica focal (2/6 ratos) e multifocal (1/6 ratos), e dilatação capilar focal leve (2/6 ratos), sem sinais de esteatose ou hemorragia (Fig. 5J, K e L; Tab.2).

Figura 5: Efeito do eugenol (10 mg Kg^{-1}) e do mercúrio ($0,6 \text{ mg Kg}^{-1}$) na histologia hepática de ratos Wistar expostos por 30 dias. A-L; Coloração hematoxilina-eosina, mostrando hepatócitos (setas brancas), capilar sinusoide (setas pretas finas), veia central (estrelas), infiltrado inflamatório (asteriscos), hemorragia (hash), morte celular (seta amarela), esteatose (seta vermelha), dilatação de capilar sinusoide (setas pretas grossas), degeneração hidrópica (pontas de seta). Análise estereológica em M-P; Coloração ácido periódico-Schiff, mostrando a presença de inclusões de glicogênio citoplasmático (setas azuis). Barra de escala: $100 \mu\text{m}$ (A); $50\mu\text{m}$; (B, D, E, F, G, H, I, M, N, O, P); $20\mu\text{m}$ (C). ($n = 6$ animais/grupo).

Tabela 2. Ocorrência e distribuição de patologias em fígado de Wistar expostos ao eugenol e ao mercúrio por 30 dias.

Histopatologia	Distribuição	Controle		Eugenol		Mercúrio		Eugenol + Mercúrio	
		Intensidade: Leve	Moderada	Leve	Moderada	Leve	Moderada	Leve	Moderada
Congestão	<i>Focal</i>	2/6	0/6	3/6	0/6	1/6	0/6	1/6	0/6
	<i>Multifocal</i>	0/6	2/6	1/6	1/6	1/6	3/6	0/6	5/6
Infiltrado inflamatório	<i>Focal</i>	2/6	1/6	0/6	3/6	1/6	0/6	1/6	0/6
	<i>Multifocal</i>	1/6	0/6	0/6	0/6	0/6	4/6	0/6	4/6
Degeneração hidrópica	<i>Focal</i>	0/6	0/6	0/6	0/6	3/6	0/6	2/6	0/6
	<i>Multifocal</i>	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6	0/6	0/6	1/6
Esteatose	<i>Focal</i>	0/6	0/6	0/6	0/6	2/6	0/6	0/6	0/6
	<i>Multifocal</i>	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Dilatação de capilar	<i>Focal</i>	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6	0/6	2/6	0/6
	<i>Multifocal</i>	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Hemorragia	<i>Focal</i>	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6	0/6	0/6	0/6
	<i>Multifocal</i>	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6

Grupo controle: ratos que receberam Tween-20 a 2% (0,5 mL) por gavagem; Grupo eugenol: ratos expostos ao eugenol 10 mg Kg⁻¹ (diluído Tween-20 a 2%; 0,5 mL) por gavagem; Grupo mercúrio: ratos expostos ao mercúrio 0,6 mg Kg⁻¹ (diluído em água destilada; 0,5 mL) por gavagem; Grupo eugenol + mercúrio: ratos expostos a eugenol 10 mg Kg⁻¹ e, 30 minutos depois, ao mercúrio 0,6 mg Kg⁻¹ (0,5 mL) por gavagem.

Histomorfometria e estereologia hepática

O volume de núcleos de hepatócitos não foi alterado nos animais expostos ao mercúrio em relação aos animais controles ($p > 0,05$; Tab. 3), embora tenham apresentado uma diminuição no volume de núcleos quando comparados aos animais do grupo eugenol ($p < 0,05$; Tab. 3). O tratamento com eugenol em animais expostos ao mercúrio resultou em um volume de núcleos de hepatócitos similar à observada nos grupos controle e eugenol ($p > 0,05$; Tab. 3). O volume de citoplasma de hepatócitos não foi afetado nos animais de nenhum dos grupos experimentais, incluindo os grupos expostos apenas ao mercúrio ou expostos ao eugenol ao mercúrio, permanecendo semelhante à do grupo controle ($p > 0,05$; Tab. 3). O volume dos hepatócitos também não apresentou alterações significativas entre os animais dos diferentes grupos, com valores similares observados em todos eles ($p > 0,05$; Tab. 3). Já o volume de capilares sinusoidais aumentou nos animais expostos ao mercúrio em comparação com os controles ($p < 0,05$; Tab. 3). A exposição simultânea ao eugenol e ao mercúrio resultou em uma diminuição nessa proporção, aproximando-se dos valores observados nos ratos do grupo controle ($p > 0,05$; Tab. 3). O volume de vasos sanguíneos não apresentou diferenças estatística entre os ratos dos grupos experimentais, independentemente da exposição ao eugenol ou ao mercúrio ($p > 0,05$; Tab. 3). A proporção de glicogênio foi maior em animais expostos ao eugenol e mercúrio quando comparados aos animais expostos apenas ao metal ($p < 0,05$; Tab. 3; Fig. 5M-P).

Tabela 3. Volume dos componentes do parênquima e proporção de glicogênio hepático de ratos Wistar expostos ao eugenol e ao mercúrio por 30 dias.

Parâmetros	Controle	Eugenol	Mercúrio	Eugenol + Mercúrio
Núcleo hepatócitos (mm ³)	717,60 ± 43,11 ^{ab}	744,40 ± 40,92 ^a	613,40 ± 8,92 ^b	758,10 ± 27,18 ^a
Citoplasma hepatócitos (mm ³)	12859,20 ± 1032,00 ^a	12844,20 ± 910,00 ^a	11392,60 ± 508,10 ^a	12815,50 ± 337,80 ^a
Hepatócitos (mm ³)	13577,70 ± 1073,00 ^a	13589,60 ± 947,70 ^a	12005,00 ± 509,30 ^a	13574,60 ± 358,20 ^a
Capilares sinusoidais (mm ³)	302,60 ± 53,59 ^a	406,30 ± 11,45 ^{ab}	431,80 ± 19,60 ^b	405,40 ± 17,01 ^{ab}
Vasos sanguíneos (mm ³)	81,29 ± 30,91 ^a	111,10 ± 24,73 ^a	147,40 ± 13,71 ^a	130,70 ± 20,47 ^a
Glicogênio (%)	16,67 ± 3,23 ^{ab}	18,48 ± 3,17 ^{ab}	15,83 ± 2,46 ^{ab}	20,77 ± 3,20 ^a

Média ± DP. Grupo controle: ratos que receberam Tween-20 a 2% (0,5 mL) por gavagem; Grupo eugenol: ratos expostos ao eugenol 10 mg Kg⁻¹ (diluído Tween-20 a 2%; 0,5 mL) por gavagem; Grupo mercúrio: ratos expostos ao mercúrio 0,6 mg Kg⁻¹ (diluído em água destilada; 0,5 mL) por gavagem; Grupo eugenol + mercúrio: ratos expostos a eugenol 10 mg Kg⁻¹ e, 30 minutos depois, ao mercúrio 0,6 mg Kg⁻¹ (0,5 mL) por gavagem. Diferentes letras sobrescritas na mesma linha (a e b) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$) por ANOVA e teste de Tukey ($n = 6$ ratos/grupo).

Discussão

Os resultados apresentados forneceram evidências da atividade protetora do eugenol contra efeitos deletérios do mercúrio sobre o fígado de ratos Wistar. Neste estudo, a exposição ao mercúrio, na concentração de $0,6 \text{ mg Kg}^{-1}$ e tempo de exposição de 30 dias, se mostrou danosa para o fígado de ratos, ao causar distúrbios na maioria dos parâmetros bioquímicos, oxidativos e morfológicos avaliados. Esse efeito deletério está de acordo com os achados descritos em estudos anteriores trabalhando com o HgCl_2 (Goudarzi et al., 2017; Shalan, 2022). O eugenol, por sua vez, aumentou apenas a atividade da Na^+/K^+ ATPase no fígado de animais expostos apenas a ele, comprovando uma segurança no seu uso quando administrado na concentração de 10 mg Kg^{-1} . Os resultados mostraram um papel protetor do eugenol contra os efeitos deletérios do mercúrio ao manter a atividade de ATPases e enzimas antioxidantes, bem como as concentrações de marcadores hepáticos séricos e teciduais, semelhante ao observado em animais controle. Esses resultados evidenciam propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias que têm sido associadas a este composto fenólico (Yogalakshmi et al., 2010; Gülçin, 2011; Barboza et al., 2018; Damasceno et al., 2024). No geral, esses resultados reforçam a relevância do composto fenólico como um emergente agente terapêutico para prevenir os efeitos adversos da toxicidade por mercúrio, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias de mitigação da hepatotoxicidade por metais pesados.

A exposição ao mercúrio reduziu o peso absoluto do fígado. Além disso, os achados histopatológicos mostraram alterações no fígado de ratos expostos ao metal, incluindo hemorragia, infiltrado inflamatório e degeneração celular. Metais pesados como o mercúrio aumentam a produção de radicais livres, que danificam os hepatócitos, alterando aspectos morfológicos e funcionas (Uzunhisarcikli et al., 2016; Machado-Neves, 2022). Ainda, sabe-se que a degeneração hepatocelular pode resultar tanto em efeitos locais, como a redução do peso do fígado, quanto em consequências sistêmicas (Uzunhisarcikli et al., 2016; Goudarzi et al., 2017; Oliveira et al., 2017; Elblehi et al., 2019). Dessa forma, a redução observada no peso do fígado pode ser atribuída a processos patológicos, como atrofia e morte celular, consequências do estresse oxidativo, evidenciado neste estudo pelo aumento das concentrações de NO, que atua como indutor de respostas inflamatórias (Rees et al., 1990; Othman et al., 2014; Carvalho et al., 2021; Kumar et al., 2021; Rahayu et al., 2022).

Em relação à proporção de microminerais e bioacumulação de mercúrio, fígado de ratos expostos ao metal apresentaram menor proporção de K, Se e Fe, além de maior proporção de Hg. Esses achados estão alinhados com estudos que documentaram a interferência do mercúrio

na homeostase mineral, ao competir com outros metais por sítio de ligações, comprometendo a síntese de enzimas essenciais e o correto funcionamento celular (Bridges & Zalups, 2005; Yang et al., 2020; Kang et al., 2024). A redução das concentrações de potássio pode impactar o funcionamento das ATPases, que são vitais para a manutenção do potencial elétrico da membrana celular e a regulação do transporte de íons. Isso porque, o potássio contribui para o estabelecimento do potencial de membrana que por sua vez, dita todo o transporte realizado por proteínas através dela (Contreras et al., 2024). Já a diminuição de Fe e Se, por exemplo, pode comprometer a atividade da CAT e GST, essenciais para a defesa antioxidante celular (Flohé et al., 2022; Handy & Loscalzo, 2022; Jomova et al., 2022). No presente estudo, a exposição ao mercúrio resultou em redução da atividade dessas duas enzimas envolvidas no processo de estresse oxidativo. Sabe-se que os íons Fe^{2+} ou Fe^{3+} fazem parte da estrutura da CAT (Jomova et al., 2022) e que a disponibilidade de Se pode influenciar a atividade da GST (Flohé et al., 2022; Hsiao et al., 2024). Nesse sentido, a redução dos microminerais pode ter contribuído para a diminuição da atividade da CAT e GST observadas no estudo. Outro possível fator que pode explicar a redução da atividade da CAT e da GST nos animais expostos ao mercúrio se relaciona com a produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzida por esse metal. Metais pesados estimulam a produção de EROs e a atividade de enzimas antioxidantes pode aumentar para neutralizá-los. Porém, neste processo, enzimas como CAT e GST podem atingir exaustão, o que diminui a capacidade de eliminação de EROs (Machado-Neves, 2022).

No diz respeito às análises de marcadores de dano e metabolismo hepático, foi observado aumento das concentrações séricas de ALT, AST e ALP em animais expostos ao mercúrio. As concentrações séricas de AST e ALT são consideradas marcadores de lesão hepatocelular, enquanto concentrações séricas de ALP indicam diminuição ou interrupção do fluxo de bile (Hussein et al., 2013). A elevação dessas enzimas no soro sugere comprometimento da integridade da membrana celular dos hepatócitos, o que causa a liberação das enzimas na corrente sanguínea (Reichling & Kaplan, 1988; Nabil et al., 2020). Danos na integridade de membranas celulares podem ser consequência do estresse oxidativo (Uzunhisarcikli et al., 2016; Ali et al., 2019). Os resultados deste estudo mostraram aumento das concentrações de MDA, marcador de peroxidação lipídica, que é um processo que compromete a integridade das membranas celulares e está associado a diversas doenças hepáticas (Uzunhisarcikli et al., 2016; Ali et al., 2019). Assim, o aumento da peroxidação lipídica em ratos expostos ao mercúrio pode ter contribuído para o comprometimento da membrana dos hepatócitos, o que levou ao aumento das concentrações séricas das enzimas

hepáticas. Além das análises séricas, as concentrações enzimáticas no fígado são cruciais para avaliar o estado metabólico do órgão (Adeyemi & Akanji, 2011). O aumento nas concentrações hepáticas das enzimas metabólicas ALT e ALP em ratos expostos ao mercúrio, pode ser resultado da liberação dessas enzimas do tecido danificado (Rahayu et al., 2022). Foi demonstrado que, em uma tentativa de compensar o estresse introduzido pela exposição a um agente tóxico como o mercúrio, células podem aumentar a síntese de novas enzimas, na busca pelo reestabelecimento da homeostase (Adeyemi & Akanji, 2011; Rahayu et al., 2022).

Os resultados obtidos com a análise das ATPases revelaram um aumento na atividade total de ATPases e de Na^+/K^+ ATPase, principalmente em ratos expostos ao mercúrio. O aumento da atividade dessas enzimas, em condições de estresse oxidativo, pode indicar uma resposta celular adaptativa para manter o equilíbrio iônico e a homeostase celular (Contreras et al., 2024). As ATPases, são responsáveis pela manutenção do potencial eletroquímico e da homeostase das células, essenciais para diversos processos metabólicos e funcionais nas células do fígado (Hodeify et al., 2021; Contreras et al., 2024). Ainda, outros estudos já mostraram que a Na^+/K^+ ATPase, em ratos, é mais sensível que a Mg^{2+} ATPase e a Ca^{2+} ATPase, o que pode explicar a manutenção das atividades da Mg^{2+} ATPase e da Ca^{2+} ATPase observadas em animais de todos os grupos experimentais neste estudo (Canli et al., 2019; Kalman et al., 2023).

Ademais, a avaliação quantitativa do parênquima hepático, indicou uma diminuição do volume de núcleos de hepatócitos e aumento no volume de capilares sinusoides em ratos expostos ao mercúrio. Esses achados sugerem que a exposição ao mercúrio causou degeneração celular e alterações na organização do fígado, possivelmente associado à inflamação local, o que pode comprometer a função hepática (Goudarzi et al., 2017; Oliveira et al., 2017). Em quadros inflamatórios que estão associados ao aumento da produção de EROs é comum a vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo, extravasamento de fluidos e liberação de mediadores, como citocinas pró-inflamatórias (Sá et al., 2013). O aumento nas concentrações de EROs decorrentes da exposição ao mercúrio pode ser atribuído à ativação de diferentes vias, como a do citocromo CYP450 (Othman et al., 2014), e de vias inflamatórias e apoptóticas (Roshankhah et al., 2020). A ativação do citocromo CYP450 contribui para a formação de radicais livres, levando a danos oxidativos e comprometendo a integridade celular (Moyano et al., 2019; Li et al., 2021). Da mesma forma, a ativação de vias inflamatórias e apoptóticas aumentam a produção de EROs, causando danos à componentes celulares como proteínas, fato observado aqui pelo aumento da concentração de PC em ratos expostos ao mercúrio (Roshankhah et al., 2020).

Diferente do que foi observado em animais que receberam apenas mercúrio, a exposição ao eugenol isoladamente ou simultaneamente com o metal, não alterou o peso do fígado. Este resultado mostra que o composto fenólico pode ter minimizado o efeito adverso causado pelo metal, por meio de suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, que auxiliam na manutenção da integridade hepática (Damasceno et al., 2024). De fato, as análises histopatológicas realizadas no presente estudo, mostraram que fígado de ratos expostos ao eugenol apresentaram morfologia mais preservada quando comparado ao de ratos expostos ao mercúrio, com ausência de regiões hemorrágicas e a redução de infiltrados inflamatórios. A inflamação e o estresse oxidativo são processos interligados. Durante processos inflamatórios ocorre produção exacerbada de EROs no tecido danificado, o que por sua vez estimula ainda mais a produção de mediadores pró-inflamatórios (Biswas & de Faria, 2007; Hussain et al., 2016; García et al., 2017). A atividade anti-inflamatória do eugenol tem sido atribuída a sua capacidade de inibir a expressão de marcadores inflamatórios como interleucina-6 (IL-6) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Kaur & Alam, 2010; Barboza et al., 2018). Estudos anteriores mostraram que compostos fenólicos como o eugenol, podem mitigar danos celulares, promovendo a regeneração hepática e diminuindo a resposta inflamatória (Abd El Motteleb et al., 2014; Barboza et al., 2018). Dessa forma, ao reduzir o processo inflamatório o eugenol também modula o estado redox celular, diminuindo o estresse oxidativo (Barboza et al., 2018).

Além disso, em ratos expostos de forma simultânea ao eugenol e mercúrio, foi observada redução na proporção do metal no fígado. Este resultado reforça a hipótese de que o eugenol pode exercer um efeito quelante, sendo capaz de reduzir o acúmulo do metal pesado no organismo (Fujisawa & Murakami, 2016). A suplementação com eugenol, ao manter as concentrações de microminerais, pode ter contribuído para o aumento da atividade de CAT e GST observadas no presente estudo, protegendo as células hepáticas contra danos oxidativos, bem como aumentando a sua capacidade de detoxificação (Sies et al., 2017). Esse fato corrobora com as evidências da capacidade protetora do eugenol contra os efeitos adversos da toxicidade do mercúrio, promovendo um ambiente propício para a função normal das enzimas (Abd El Motteleb et al., 2014).

Ainda, o eugenol exerceu significativo efeito protetor, evidenciado pela redução nas concentrações de MDA e NO em animais expostos a ele e ao mercúrio. Isso pode ser explicado pelo fato de que o eugenol reduz as concentrações de IL-6 e iNOS, que estão associados à redução de MDA e NO (Yeh et al., 2011; Barboza et al., 2018). O único parâmetro em que o eugenol não conseguiu remediar foi a concentração de PC. Grupos carbonila (CO) são formados

em cadeias laterais de proteínas quando estas são oxidadas e, por serem produtos relativamente estáveis, possivelmente o eugenol não exerceu um efeito importante nesta alteração (Dalle-Donne, 2003). Em suma, os resultados mostram que o eugenol pode aumentar a atividade de enzimas antioxidantes, favorecendo a integridade celular e as características morfológicas e funcionais do fígado (Yogalakshmi et al., 2010; Gülçin, 2011; Abd El Motteleb et al., 2014).

Em relação às concentrações de marcadores de dano e metabolismo hepático, ratos expostos apenas ao eugenol e expostos ao eugenol e ao mercúrio apresentaram concentrações séricas e teciduais próximas às observadas em ratos controle. Por isso, pode-se sugerir que o eugenol, ao reduzir as concentrações de marcadores de estresse oxidativo como o MDA, não só protegeu contra o dano celular, mas também ajudou a manter a função hepática (Yogalakshmi et al., 2010; Abd El Motteleb et al., 2014).

As análises da atividade de ATPases mostraram que o eugenol aumentou apenas a atividade da Na^+/K^+ ATPase no fígado de animais expostos apenas a ele. Como já citado no presente estudo, já foi descrito que Na^+/K^+ ATPase, em ratos, é mais sensível que a Mg^{2+} ATPase e a Ca^{2+} ATPase (Canli et al., 2019; Kalman et al., 2023). Portanto, a maior sensibilidade da enzima pode explicar o fato de que apenas a atividade de Na^+/K^+ ATPase foi alterada com a exposição ao eugenol, composto que tem se mostrado consideravelmente seguro. Somado a isso, como Na^+/K^+ ATPase exerce um papel crucial na manutenção do potencial eletroquímico da célula e, conseqüentemente, no direcionamento do transporte intracelular e extracelular, o aumento observado pode ser uma forma de manutenção da homeostase (Canli et al., 2019; Hodeify et al., 2021; Kalman et al., 2023; Contreras et al., 2024).

Por fim, em concordância com os demais achados, os parâmetros morfométricos e estereológicos mostraram que a administração de eugenol teve um papel protetor nas alterações causadas pelo mercúrio. Tanto em animais expostos apenas ao eugenol, como naqueles que receberam o composto fenólico junto com o mercúrio, o volume de núcleo de hepatócitos e de capilares sinusoides foram similares aos observados em ratos do grupo controle. Com isso, mais uma vez, o eugenol atuou contribuindo para regeneração hepática e protegendo o órgão contra os danos.

Conclusão

Os resultados mostraram que o eugenol é um composto seguro, no tempo e dose administrada, capaz de exercer atividade protetora contra a hepatotoxicidade induzida por mercúrio em ratos Wistar. A exposição ao mercúrio resultou em alterações patológicas, aumento de marcadores de estresse oxidativo e disfunção enzimática, evidenciando o comprometimento

da função hepática. A exposição ao eugenol preservou a função hepática e a capacidade antioxidante de animais expostos ao metal pesado. Esses achados ressaltam o potencial do eugenol como um agente terapêutico promissor na prevenção e tratamento da toxicidade hepática associada a metais pesados, sugerindo novas direções para pesquisas futuras sobre intervenções naturais na toxicologia hepática.

Referências Bibliográficas

- Abd El Motteleb, D. M., Selim, S. A., & Mohamed, A. M. (2014). Differential effects of eugenol against hepatic inflammation and overall damage induced by ischemia/re-perfusion injury. *Journal of immunotoxicology*, *11*(3), 238-245. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2013.832444>
- Adefegha, S. A., Okeke, B. M., & Oboh, G. (2021). Antioxidant properties of eugenol, butylated hydroxyanisole, and butylated hydroxyl toluene with key biomolecules relevant to Alzheimer's diseases—In vitro. *Journal of food biochemistry*, *45*(3), e13276. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13276>
- Adeyemi, O. S., & Akanji, M. A. (2011). Biochemical changes in the kidney and liver of rats following administration of ethanolic extract of *Psidium guajava* leaves. *Human & experimental toxicology*, *30*(9), 1266-1274. <https://doi.org/10.1177/0960327110388534>
- Aebi, H. (1984). Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, *105*(C). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Ali, H., Assiri, M. A., Shearn, C. T., & Fritz, K. S. (2019). Lipid peroxidation derived reactive aldehydes in alcoholic liver disease. *Current opinion in toxicology*, *13*, 110-117. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.10.003>
- Barboza, J. N., da Silva Maia Bezerra Filho, C., Silva, R. O., Medeiros, J. V. R., & de Sousa, D. P. (2018). An overview on the anti-inflammatory potential and antioxidant profile of eugenol. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2018*(1), 3957262. <https://doi.org/10.1155/2018/3957262>
- Basta, P. C. (2024). Impacto do mercúrio em áreas protegidas e povos da floresta na Amazônia: uma abordagem integrada saúde-ambiente-Relatório Técnico.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, *239*(1), 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Biswas, S. K., Lopes De Faria, J. B., Biswas, S. K., & Lopes De Faria, J. B. (2007). Which comes first: renal inflammation or oxidative stress in spontaneously hypertensive rats? *Free radical research*, *41*(2), 216-224. <https://doi.org/10.1080/10715760601059672>
- Bonting, S. L., Caravaggio, L. L., & Hawkins, N. M. (1962). Studies on sodium-potassium-activated adenosinetriphosphatase. IV. Correlation with cation transport sensitive to cardiac glycosides. *Archives of biochemistry and biophysics*, *98*(3), 413-419. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(62\)90206-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(62)90206-0)

- Boujbiha, M. A., Hamden, K., Guermazi, F., Bouslama, A., Omezzine, A., Kammoun, A., & El Feki, A. (2009). Testicular toxicity in mercuric chloride treated rats: association with oxidative stress. *Reproductive toxicology*, 28(1), 81-89. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.03.011>
- Bridges, C. C., & Zalups, R. K. (2005). Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicology and applied pharmacology*, 204(3), 274-308. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.09.007>
- Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52(C). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)
- Brocza, F. M., Rafaj, P., Sander, R., Wagner, F., & Jones, J. M. (2024). Global scenarios of anthropogenic mercury emissions. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 24(12), 7385-7404. <https://doi.org/10.5194/acp-24-7385-2024>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Canli, E. G., Ila, H. B., & Canli, M. (2019). Responses of biomarkers belonging to different metabolic systems of rats following oral administration of aluminium nanoparticle. *Environmental toxicology and pharmacology*, 69, 72-79. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.04.002>
- Carvalho, R. P. R., Ribeiro, F. C. D., Lima, T. I., Ervilha, L. O. G., Oliveira, E. L., Faustino, A. O., Lima, G. D. A., & Machado-Neves, M. (2022). High doses of eugenol cause structural and functional damage to the rat liver. *Life Sciences*, 304, 120696. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120696>
- Chilukoti, S. R., Sahu, C., & Jena, G. (2024). Protective role of eugenol against diabetes-induced oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in rat testes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 38(1), e23593. <https://doi.org/10.1002/jbt.23593>
- Contreras, R. G., Torres-Carrillo, A., Flores-Maldonado, C., Shoshani, L., & Ponce, A. (2024). Na⁺/K⁺-ATPase: More than an Electrogenic Pump. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(11), 6122. <https://doi.org/10.3390/ijms25116122>
- Damasceno, R. O. S., Pinheiro, J. L. S., Rodrigues, L. H. M., Gomes, R. C., Duarte, A. B. S., Emídio, J. J., Diniz, L. R. L., & de Sousa, D. P. (2024). Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of Eugenol: An Update. *Pharmaceuticals*, 17(11), 1505. <https://doi.org/10.3390/ph17111505>
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., & Colombo, R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica chimica acta*, 329(1-2), 23-38. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00003-2](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00003-2)
- Dieterich, S., Bieligg, U., Beulich, K., Hasenfuss, G., & Prestle, J. (2000). Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation*, 101(1), 33-39. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.1.33>
- Durak, D., Kalender, S., Uzun, F. G., & Kalender, Y. (2010). Mercury chloride-induced oxidative stress in human erythrocytes and the effect of vitamins C and E in vitro. *African Journal of Biotechnology*, 9(4).

- Eaton, D. L., & Klaassen, C. D. (2001). Principles of toxicology. *Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons*, 6.
- Elblehi, S. S., Hafez, M. H., & El-Sayed, Y. S. (2019). L- α -Phosphatidylcholine attenuates mercury-induced hepato-renal damage through suppressing oxidative stress and inflammation. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(9), 9333-9342. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04395-9>
- Estrela-Lima, A., Araújo, M. S. S., Costa-Neto, J. M., Teixeira-Carvalho, A., Barrouin-Melo, S. M., Cardoso, S. V., Martins-Filho, O. A., Serakides, R., & Cassali, G. D. (2010). Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. *BMC cancer*, 10, 1-14.
- Evans Jr, D. J. (1969). Membrane adenosine triphosphatase of *Escherichia coli*: activation by calcium ion and inhibition by monovalent cations. *Journal of Bacteriology*, 100(2), 914-922. <https://doi.org/10.1128/jb.100.2.914-922.1969>
- Farina, M., Avila, D. S., Da Rocha, J. B. T., & Aschner, M. (2013). Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury. *Neurochemistry international*, 62(5), 575-594. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2012.12.006>
- Flohé, L., Toppo, S., & Orian, L. (2022). The glutathione peroxidase family: Discoveries and mechanism. *Free Radical Biology and Medicine*, 187, 113-122. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.05.003>
- Fujisawa, S., & Murakami, Y. (2016). Eugenol and its role in chronic diseases. *Drug Discovery from Mother Nature*, 45-66. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41342-6_3
- Fujisawa, S., Atsumi, T., Kadoma, Y., & Sakagami, H. (2002). Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. *Toxicology*, 177(1), 39-54. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00194-4](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00194-4)
- García, N., Zazueta, C., & Aguilera-Aguirre, L. (2017). Oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/5853238>
- Gonçalves, R. V., Novaes, R. D., Leite, J. P., Vilela, E. F., Cupertino, M. C., Nunes, L. G., & Matta, S. L. (2012). Hepatoprotective effect of *B. athysa cuspidata* in a murine model of severe toxic liver injury. *International Journal of Experimental Pathology*, 93(5), 370-376. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2012.00835.x>
- Goudarzi, M., Kalantar, M., & Kalantar, H. (2017). The hepatoprotective effect of gallic acid on mercuric chloride-induced liver damage in rats. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 12(4). <https://doi.org/10.5812/jjnpp.12345>
- Guimarães-Ervilha, L. O., Ladeira, L. C. M., Carvalho, R. P. R., Bento, I. P. da S., Bastos, D. S. S., Souza, A. C. F., Santos, E. C., de Oliveira, L. L., Maldonado, I. R. dos S. C., & Machado-Neves, M. (2021). Green tea infusion ameliorates histological damages in testis and epididymis of diabetic rats. *Microscopy and Microanalysis*, 27(5), 1133-1145. <https://doi.org/10.1017/S1431927621012071>
- Gülçin, İ. (2011). Antioxidant activity of eugenol: A structure–activity relationship study. *Journal of medicinal food*, 14(9), 975-985. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0197>

- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8)
- Handy, D. E., & Loscalzo, J. (2022). The role of glutathione peroxidase-1 in health and disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 188, 146-161. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.06.004>
- Hjertén, S., & Pan, H. (1983). Purification and characterization of two forms of a low-affinity Ca²⁺-ATPase from erythrocyte membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 728(2), 281-288. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(83\)90480-7](https://doi.org/10.1016/0005-2736(83)90480-7)
- Hodeify, R., Chakkour, M., Rida, R., & Kreydiyyeh, S. (2021). PGE₂ upregulates the Na⁺/K⁺ ATPase in HepG2 cells via EP4 receptors and intracellular calcium. *Plos one*, 16(1), e0245400. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245400>
- Hsiao, Y. F., Huang, S. C., Cheng, S. B., Hsu, C. C., & Huang, Y. C. (2024). Glutathione and Selenium Supplementation Attenuates Liver Injury in Diethylnitrosamine-Induced Hepatocarcinogenic Mice by Enhancing Glutathione-Related Antioxidant Capacities. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(21), 11339. <https://doi.org/10.3390/ijms252111339>
- Huang, W. C., Shu, L. H., Kuo, Y. J., Lai, K. S. L., Hsia, C. W., Yen, T. L., ... & Sheu, J. R. (2024). Eugenol Suppresses Platelet Activation and Mitigates Pulmonary Thromboembolism in Humans and Murine Models. *International journal of molecular sciences*, 25(4), 2098. <https://doi.org/10.3390/ijms25042098>
- Hussein, R. R., Soliman, R. H., Ali, A. M. A., Tawfeik, M. H., & Abdelrahim, M. E. (2013). Effect of antiepileptic drugs on liver enzymes. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 2(1), 14-19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjbas.2013.09.002>
- Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M. C., & Rahu, N. (2016). Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us? *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016(1), 7432797. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7432797>
- Ito, M., Murakami, K., & Yoshino, M. (2005). Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. *Food and chemical toxicology*, 43(3), 461-466. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.11.019>
- Jahan, S., Azad, T., Ayub, A., Ullah, A., Afsar, T., Almajwal, A., & Razak, S. (2019). Ameliorating potency of *Chenopodium album* Linn. and vitamin C against mercuric chloride-induced oxidative stress in testes of Sprague Dawley rats. *Environmental health and preventive medicine*, 24, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12199-019-0820-x>
- Jomova, K., Makova, M., Alomar, S. Y., Alwasel, S. H., Nepovimova, E., Kuca, K., ... & Valko, M. (2022). Essential metals in health and disease. *Chemico-biological interactions*, 367, 110173. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.110173>
- Kalman, J., Connolly, M., Abdolahpur-Monikh, F., Fernández-Saavedra, R., Cardona-García, A. I., Conde-Vilda, E., Martínez-Morcillo, S., Peijnenburg, W. J. G. M., Rucandio, I., & Fernández-Cruz, M. L. (2023). Bioaccumulation of CuO nanomaterials in rainbow trout: Influence of exposure route and particle shape. *Chemosphere*, 310, 136894. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136894>

- Kang, B., Wang, J., Guo, S., & Yang, L. (2024). Mercury-induced toxicity: Mechanisms, molecular pathways, and gene regulation. *Science of The Total Environment*, 173577. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.173577>
- Kaur, G., Athar, M., & Alam, M. S. (2010). Eugenol precludes cutaneous chemical carcinogenesis in mouse by preventing oxidative stress and inflammation and by inducing apoptosis. *Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center*, 49(3), 290-301. <https://doi.org/10.1002/mc.20601>
- Kim, K. H., Kabir, E., & Jahan, S. A. (2016). A review on the distribution of Hg in the environment and its human health impacts. *Journal of hazardous materials*, 306, 376-385. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.11.031>
- Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. P., & Shacter, E. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *In Methods in enzymology*, 233, 346-357. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33040-9)
- Li, S., Wang, X., Xiao, Y., Wang, Y., Wan, Y., Li, X., Li, Q., Tang, X., Cai, D., Ran, B., & Wu, C. (2021). Curcumin ameliorates mercuric chloride-induced liver injury via modulating cytochrome P450 signaling and Nrf2/HO-1 pathway. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111426. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111426>
- Li, S., Han, B., Wu, P., Yang, Q., Wang, X., Li, J., Liao, Y., Deng, N., Jiang, H., & Zhang, Z. (2022). Effect of inorganic mercury exposure on reproductive system of male mice: Immunosuppression and fibrosis in testis. *Environmental Toxicology*, 37(1), 69-78. <https://doi.org/10.1002/tox.23378>
- Machado-Neves, M. (2022). Effect of heavy metals on epididymal morphology and function: An integrative review. *Chemosphere*, 291, 133020. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133020>
- Mandarim-de-Lacerda, C. A. (2003). Stereological tools in biomedical research. *Anais da Academia brasileira de Ciências*, 75, 469-486. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652003000400006>
- Martinez, C. S., Torres, J. G. D., Peçanha, F. M., Anselmo-Franci, J. A., Vassallo, D. V., Salaices, M., Alonso, M. J., & Wiggers, G. A. (2014). 60-Day chronic exposure to low concentrations of HgCl₂ impairs sperm quality: hormonal imbalance and oxidative stress as potential routes for reproductive dysfunction in rats. *PLoS One*, 9(11), e111202. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111202>
- Moyano, P., Ruiz, M., García, J. M., Frejo, M. T., Baselga, M. J. A., Lobo, M., ... & Del Pino, J. (2019). Oxidative stress and cell death induction by amitraz and its metabolite BTS-27271 mediated through cytochrome P450 and NRF2 pathway alteration in primary hippocampal cell. *Food and Chemical Toxicology*, 129, 87-96. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.042>
- Nabil, A., Elshemy, M. M., Asem, M., & Gomaa, H. F. (2020). Protective effect of DPPD on mercury chloride-induced hepatorenal toxicity in rats. *Journal of Toxicology*, 2020(1), 4127284. <https://doi.org/10.1155/2020/4127284>
- Naderi, N., Darmishonnejad, Z., Tavalae, M., & Nasr-Esfahani, M. H. (2023). The effect of alpha-lipoic acid on sperm functions in rodent models for male infertility: A systematic review. *Life Sciences*, 323, 121383. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.121383>

- Nagababu, E., Rifkind, J. M., Boindala, S., & Nakka, L. (2010). Assessment of antioxidant activity of eugenol in vitro and in vivo. *Free radicals and antioxidant protocols*, 165-180. doi:10.1007/978-1-60327-029-8_10.
- Novaes, R. D., Gonçalves, R. V., Marques, D. C. S., Cupertino, M. D. C., Peluzio, M. D. C. G., Leite, J. P. V., & Maldonado, I. R. D. S. C. (2012). Effect of bark extract of *Bathysa cuspidata* on hepatic oxidative damage and blood glucose kinetics in rats exposed to paraquat. *Toxicologic Pathology*, 40(1), 62-70. https://doi.org/10.1177/0192623311425059
- Ohnishi, T., Suzuki, T., Suzuki, Y., & Ozawa, K. (1982). A comparative study of plasma membrane Mg²⁺-ATPase activities in normal, regenerating and malignant cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 684(1), 67-74. https://doi.org/10.1016/0005-2736(82)90050-5
- Othman, M. S., Safwat, G., Aboulkhair, M., & Moneim, A. E. A. (2014). The potential effect of berberine in mercury-induced hepatorenal toxicity in albino rats. *Food and Chemical Toxicology*, 69, 175-181. http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.04.012
- Oliveira, V. A., Favero, G., Stacchiotti, A., Giugno, L., Buffoli, B., de Oliveira, C. S., Lavazza, A., Albanese, M., Rodella, L. F., Pereira, M. E., & Rezzani, R. (2017). Acute mercury exposition of virgin, pregnant, and lactating rats: Histopathological kidney and liver evaluations. *Environmental toxicology*, 32(5), 1500-1512. https://doi.org/10.1002/tox.22370
- Rahayu, S. Y. S., Aminingsih, T., & Fudholi, A. (2022). The protective effect of nano calcium produced from freshwater clam shells on the histopathological overview of the liver and kidneys of mice exposed to mercury toxins. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 71, 126963. https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2022.126963
- Reichling, J. J., & Kaplan, M. M. (1988). Clinical use of serum enzymes in liver disease. *Digestive diseases and sciences*, 33, 1601-1614.
- Roshankhah, S., Abdolmaleki, A., & Salahshoor, M. R. (2020). Anti-inflammatory, anti-apoptotic, and antioxidant actions of Middle Eastern Phoenix dactylifera extract on mercury-induced hepatotoxicity in vivo. *Molecular biology reports*, 47(8), 6053-6065. https://doi.org/10.1007/s11033-020-05680-4
- Sá, R.C.S, Andrade, L. N., & de Sousa, D. P. (2013). A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules*, 18(1), 1227-1254. doi:10.3390/molecules18011227
- Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative stress. *Annual review of biochemistry*, 86(1), 715-748. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037
- SaravanaKumar, S., Felicia, C., & Sundarapandian, S. (2014). Effect of Smilaxchina on Mercuric Chloride induced histopathological alterations in testis of male albino rats. *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research*, 6(4), 97-101.
- Shalan, M. G. (2022). Amelioration of mercuric chloride-induced physiologic and histopathologic alterations in rats using vitamin E and zinc chloride supplement. *Heliyon*, 8(12). https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12036
- Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative stress. *Annual review of biochemistry*, 86(1), 715-748. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037
- Souza, A. C. F., Bastos, D. S. S., Santos, F. C., Sertorio, M. N., Guimarães-Ervilha, L. O., Gonçalves, R. V., de Oliveira, L. L., & Machado-Neves, M. (2018). Arsenic aggravates

- oxidative stress causing hepatic alterations and inflammation in diabetic rats. *Life sciences*, 209, 472-480. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.08.054>
- Su, L., Wang, M., Yin, S. T., Wang, H. L., Chen, L., Sun, L. G., & Ruan, D. Y. (2008). The interaction of selenium and mercury in the accumulations and oxidative stress of rat tissues. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70(3), 483-489. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.05.018>
- Tsikakos, D. (2007). Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of Chromatography B*, 851(1-2), 51-70. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.054>
- Uzunhisarcikli, M., Aslanturk, A., Kalender, S., Apaydin, F. G., & Bas, H. (2016). Mercuric chloride induced hepatotoxic and hematologic changes in rats: The protective effects of sodium selenite and vitamin E. *Toxicology and industrial health*, 32(9), 1651-1662. <https://doi.org/10.1177/0748233715572561>
- World Health Organization. (2017). *Guidelines for drinking-water quality*. World Health Organization.
- Yang, L., Zhang, Y., Wang, F., Luo, Z., Guo, S., & Strähle, U. (2020). Toxicity of mercury: Molecular evidence. *Chemosphere*, 245, 125586. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125586>
- Yeh, J. L., Hsu, J. H., Hong, Y. S., Wu, J. R., Liang, J. C., Wu, B. N., Chen, I. J., & Liou, S. F. (2011). Eugenol and glyceryl-isoegenol suppress LPS-induced iNOS expression by down-regulating NF- κ B AND AP-1 through inhibition of MAPKS and AKT/I κ B α signaling pathways in macrophages. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 24(2), 345-356. <https://doi.org/10.1177/039463201102400208>
- Yogalakshmi, B., Viswanathan, P., & Anuradha, C. V. (2010). Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. *Toxicology*, 268(3), 204-212. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.12.018>
- Zhao, M., Li, Y., & Wang, Z. (2022). Mercury and mercury-containing preparations: history of use, clinical applications, pharmacology, toxicology, and pharmacokinetics in traditional Chinese medicine. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 807807. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.807807>

4. CAPÍTULO 2: Eugenol atenua os danos reprodutivos induzidos pelo mercúrio em ratos Wistar machos: evidências antioxidantes, histológicas e funcionais

Resumo

A exposição ao mercúrio representa uma preocupação relevante devido aos seus danos à saúde reprodutiva masculina, tornando-se essencial a busca por compostos capazes de atenuar os efeitos adversos causados pelo metal. Entre esses compostos, o eugenol se destaca como uma opção promissora, demonstrando proteção em diversos órgãos contra a toxicidade de metais pesados, embora faltem estudos sobre sua eficácia contra toxicidade reprodutiva induzida por mercúrio. Com isso, este estudo investigou o papel protetor do eugenol, um composto fenólico natural com propriedades antioxidantes conhecidas, contra a toxicidade reprodutiva induzida por mercúrio em ratos Wistar machos. Quarenta ratos adultos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: controle, eugenol (10 mg Kg^{-1}), mercúrio ($0,6 \text{ mg Kg}^{-1}$) e eugenol + mercúrio. Os tratamentos foram administrados diariamente por gavagem por 30 dias. Após o período experimental, os testículos, epidídimos e amostras de espermatozoides foram recuperados e análises bioquímicas, histológicas e enzimáticas foram realizadas para avaliar o impacto da exposição ao mercúrio e a potencial ação protetora do eugenol. A exposição ao mercúrio reduziu as atividades das enzimas antioxidantes, aumentou os marcadores de danos oxidativos, causou alterações na histologia testicular e epididimária, evidenciadas pela presença de vacúolo, e diminuiu a motilidade espermática. Notavelmente, o tratamento com eugenol manteve a atividade das enzimas antioxidantes, mitigou os danos oxidativos e preservou a integridade histológica. Além disso, o eugenol melhorou a motilidade e a produção diária de espermatozoides, neutralizando os danos induzidos pelo mercúrio. Essas descobertas sugerem que o eugenol é um agente eficaz na proteção contra toxicidade reprodutiva induzida por mercúrio, enfatizando sua relevância para o desenvolvimento de estratégias para proteger a saúde reprodutiva masculina contra poluentes ambientais.

Palavras-chave: Testículo; Epidídimo; Espermatozoides; Fenólico.

Introdução

O mercúrio é um metal tóxico que se encontra entre os dez principais produtos químicos de maior preocupação para a saúde pública de acordo com Organização Mundial da Saúde (OMS) (World Health Organization (WHO), 2021; Brocza et al., 2024). Além das emissões provenientes de fontes naturais, como a evaporação da superfície terrestre e erupções vulcânicas, a presença de mercúrio no ambiente é intensificada por atividades antropogênicas, identificadas como responsáveis por aproximadamente 80% das emissões anuais desse metal (Yang et al., 2020). O mercúrio pode ser encontrado de três formas distintas, inorgânica, orgânica e elementar, todas com diferentes propriedades toxicológicas, o que torna os estudos toxicológicos de compostos de mercúrio importantes para o melhor entendimento de mecanismos de ação e suas consequências para o organismo (Albasher et al., 2020; Yang et al., 2020; Kang et al., 2024). Dentre os compostos de mercúrio, o cloreto de mercúrio (HgCl_2) destaca-se como uma das formas mais tóxicas, devido à sua capacidade de formar complexos organomercúrios com proteínas celulares, contribuindo para a disfunção celular e lesões teciduais (Boujbiha et al. 2009). No contexto toxicológico, o mercúrio é classificado como um metal pesado, por apresentar densidade relativamente alta ($> 5 \text{ g cm}^{-3}$) e alta toxicidade mesmo em baixas concentrações (Machado-Neves, 2022; Witczak et al., 2024).

A exposição a concentrações elevadas de mercúrio recebe atenção considerável devido à sua capacidade de causar neurodegeneração. No contexto da reprodução animal, estudos publicados trazem o aparelho reprodutor masculino como um alvo crítico da toxicidade desse metal (Boujbiha et al. 2009; Yang et al., 2020; Rahayu et al., 2022; Akarsu et al., 2024). Em estudos com modelos murinos, a exposição ao mercúrio foi relacionada a desintegração do epitélio seminífero e redução na quantidade de espermatozoides no lúmen testicular e epididimário (Boujbiha et al. 2009; Rizzetti et al., 2017). Alterações espermáticas, como redução na contagem e motilidade dos espermatozoides, assim como aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e nas concentrações de marcadores de dano oxidativo, como o malondialdeído, apontam o mercúrio como indutor de infertilidade masculina (Rao & Sharma, 2001; Martínez et al., 2014; Rizzetti et al., 2017). Em humanos, assim como relatado em animais, os compostos de mercúrio perturbam funções espermatogênicas e diminuem a porcentagem de espermatozoides móveis (Zahir et al., 2005; Boujbiha et al., 2009).

Dentre os principais mecanismos envolvidos nos danos provocados pelo mercúrio, destacam-se o aumento da geração de EROS e interferência na atividade de diferentes enzimas, incluindo enzimas da defesa antioxidante e que contêm o grupo tiol (-SH) (Martínez et al.,

2014). Em sua forma inorgânica, o mercúrio tem grande afinidade por grupos -SH de biomoléculas, como glutathiona (GSH) e proteínas sulfidrilas, o que pode contribuir para sua toxicidade (Clarkson & Magos, 2006). Assim como outros metais, como ferro e manganês, o mercúrio recebe atenção considerável devido à sua capacidade de induzir danos oxidativos (Clarkson & Magos, 2006; Farina et al., 2013; Martinez et al., 2014).

Diante dos impactos negativos do mercúrio à saúde reprodutiva masculina e considerando o estresse oxidativo como um dos principais mecanismos pelos quais o mercúrio induz danos ao aparelho reprodutor masculino, estudos experimentais tornam-se cruciais para investigar a eficácia de agentes antioxidantes em prevenir, mitigar ou reverter esses danos. Neste contexto, o eugenol, composto fenólico encontrado em óleos essenciais e extratos de plantas como o cravo (*Syzygium aromaticum*), tem se apresentado como um agente terapêutico promissor no combate à toxicidade por metais pesados, devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Ito et al., 2005; Adefegha et al., 2021; Chilukoti et al., 2024). O eugenol é reconhecido como um composto seguro, aprovado pela *Food and Drug Administration* para uso como aditivo alimentar, com menor risco de efeitos colaterais quando comparado a compostos fenólicos sintéticos (Kumar et al., 2021). Estudos mostram que o eugenol exerce um efeito positivo na atividade de enzimas antioxidantes e na redução da produção de óxido nítrico (NO), que em altas concentrações atua como indutor de respostas inflamatórias (Rees et al., 1990; Carvalho et al., 2021; Kumar et al., 2021). Ainda, no que diz respeito ao aparelho reprodutor foi demonstrado que o eugenol na concentração de 10 mg Kg⁻¹ não altera a biometria, histologia e histomorfometria dos testículos e epidídimos, assim como a produção e o número de espermatozoides em ratos saudáveis (Carvalho et al., 2022a).

Dados os mecanismos de ação envolvidos na toxicidade do mercúrio e as promissoras funções antioxidantes do eugenol, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos tóxicos do mercúrio em testículo, epidídimo e espermatozoides, bem como verificar a eficácia do eugenol como um agente protetor. Para isso, foram avaliados parâmetros morfológicos e funcionais desses órgãos e gametas oriundos de ratos Wistar adultos.

Materiais e métodos

Animais e declaração de ética

Quarenta ratos Wistar machos (~100 dias de idade; ± 300g) foram fornecidos pelo Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os animais foram alojados em gaiolas individuais de polipropileno e mantidos

sob condições controladas de temperatura (21 °C) e fotoperíodo (ciclo claro/escuro de 12 h). Os animais tiveram acesso à ração comercial (Nuvilab CR-1; Quimtia S.A; Paraná, Brazil) e água filtrada *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa, Brasil (CEUA nº 06/2024). Este estudo seguiu rigorosamente as práticas e cuidados na manipulação dos animais seguiu as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Desenho experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: grupo controle, grupo eugenol, grupo mercúrio e grupo eugenol + mercúrio ($n = 10/\text{grupo}$). O HgCl_2 foi dissolvido em água destilada, enquanto o eugenol foi diluído em solução de Tween-20 a 2% (veículo) que, de acordo com estudos prévios, não causa alterações teciduais (Carvalho et al., 2022). Portanto, os ratos receberam por gavagem, respectivamente, 0,5 mL de Tween-20 a 2% (veículo), 0,5 mL de eugenol (Sigma Chemical Co. [St. Louis, MO, USA]) na concentração de 10 mg Kg^{-1} , 0,5 mL de mercúrio (HgCl_2 ; Sigma Chemical Co. [St. Louis, MO, USA]) na concentração de $0,6 \text{ mg Kg}^{-1}$, e os dois compostos (igual volume) e nas suas respectivas concentrações. A exposição aos dois agentes aconteceu via gavagem respeitando um intervalo de 30 minutos entre a ingestão de 0,5 mL de eugenol (10 mg Kg^{-1}) e mercúrio ($0,6 \text{ mg Kg}^{-1}$). Todos os tratamentos foram realizados diariamente durante 30 dias, caracterizando uma exposição subaguda (Eaton & Gilbert, 2013). A concentração de mercúrio corresponde a 100x a dose diária de mercúrio inorgânico permitida na água (WHO, 2017). Já a concentração de eugenol corresponde a uma dose segura para utilização no tratamento de ratos a longo prazo (Carvalho et al., 2022).

Eutanásia, coleta de órgãos e biometria

Após 30 dias de experimentação, os animais foram pesados, sedados e anestesiados com superdosagens de xilazina (30 mg Kg^{-1} intraperitoneal) e cloridrato de quetamina (300 mg Kg^{-1} intraperitoneal), seguido por punção cardíaca. Em seguida, os testículos e epidídimos foram removidos, dissecados, pesados e conservados em fixador ou congelados em nitrogênio. O peso corporal final e o peso absoluto dos órgãos reprodutivos foram utilizados para obter o peso relativo dos órgãos masculinos normalizando seus pesos com o peso corporal (peso absoluto dos órgãos/ peso corporal X 100).

Atividades das ATPases totais, Ca²⁺, Na⁺/K⁺ e Mg²⁺

Fragmentos de testículo e epidídimo congelados (100 mg; $n = 6$ /grupo) foram processados em tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 7,4) e submetidos à centrifugação a $1500 \times g$ por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para analisar a atividade das ATPases total (Evans, 1969), Ca²⁺ (Hjertén & Pan, 1983), Na⁺/K⁺ (Bonting et al., 1962) e Mg²⁺ ATPases (Onishi et al., 1982). Uma solução de ATP (0,01 M) foi utilizada como substrato para gerar fosfato livre pela atividade de ATPases. A reação foi interrompida usando 500 µL de TCA 10% e os tubos foram centrifugados a 1.500 xg por 10 min. Posteriormente, o sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de fósforo com auxílio de um kit bioquímico (Laboratórios Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método descrito por Bradford (Bradford, 1976). Os resultados da atividade de ATPases foram expressos em microgramas de fósforo liberados por minuto por miligrama de proteína (Carvalho et al., 2022).

Análise de enzimas antioxidantes marcadores de estresse oxidativo

Amostras de testículo e epidídimo congelados ($n = 6$ /grupo) foram homogeneizadas em tampão fosfato (1 mL/100 mg; pH 7,4) e centrifugadas a 10.000 xg por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi separado para análises da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST). A atividade da SOD foi comprovada pelo método de autooxidação de pirogalol, que avalia a conversão do ânion superóxido (O₂⁻) em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e oxigênio, conforme descrito por Dieterich et al. (2000). A atividade da CAT foi mensurada pela taxa de decomposição de H₂O₂ (Aebi, 1984). A atividade da GST foi avaliada pela formação do conjugado entre 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com glutathione (Habig et al., 1974). Todas as análises foram normalizadas com base na concentração de proteína total, medida pelo método de Bradford (1976). A atividade dessas enzimas foi expressa como unidade (U) por miligrama de proteína. A capacidade antioxidante total foi medida pelo método do Poder antioxidante redutor de férrico (FRAP) (Benzie & Strain, 1996).

A peroxidação lipídica foi avaliada nos órgãos pela análise das concentrações teciduais de malonaldeído (MDA). Para isso, o sobrenadante foi adicionado à solução de TBARS (15% de ácido tricloroacético, 0,375% de ácido tiobarbitúrico, 0,25 N de HCl) por 15 min. A formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi monitorada a 535 nm (Buege & Aust, 1978). A produção de óxido nítrico (NO) foi medida pela reação de Griess (Tsikas 2007). Nesse

método, 50 µL das amostras foram incubadas com reagente de Griess (1:1) (1% sulfanilamida, 0,1% N-(1-naftil) etilenodiamina e 2,5% de ácido fosfórico). A leitura da absorbância foi a 570 nm. A oxidação de proteínas foi quantificada por meio da detecção de proteínas carboniladas (PC) nos pellets dos órgãos homogeneizados, usando o método do 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) (Levine et al.,1994). As análises foram realizadas utilizando leitor de microplaca ELISA (Multiskan SkyHigh, Thermo Scientific).

Processamento histológico

Testículos e epidídimos ($n = 6/\text{grupo}$) foram imersos em solução fixadora de Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2) por 24 horas (Karnovsky, 1965). Após o período de fixação, os epidídimos foram segmentados em quatro regiões (segmento inicial, cabeça, corpo e cauda). Os fragmentos dessas regiões e de testículos foram desidratados em séries crescentes de etanol (70, 80, 90% e absoluto) e incluídos em 2-hidroxietil metacrilato (Historesin[®], Leica Microsystems, Nussloch, Alemanha). Cortes semi-seriados de 3 µm de espessura foram obtidos utilizando um micrótomo rotativo (RM 2255, Leica, Nussloch, Alemanha), utilizando um a cada 13 cortes para o testículo e um a cada oito cortes para o epidídimo, de modo a evitar análises repetidas da mesma área histológica. Lâminas contendo os cortes histológicos foram coradas com azul de toluidina + borato de sódio (1%), montadas com Entellan (Merck, Alemanha) e analisadas em microscópio óptico (Olympus CX40, Tóquio, Japão) (Guimarães-Ervilha et al., 2021).

Histopatologia

A avaliação histopatológica do testículo e epidídimo ($n = 6/\text{grupo}$) foi realizada em ensaios cegos. No testículo, foram analisados 200 túbulos seminíferos por animal, considerando os componentes dos túbulos seminíferos (lúmen e epitélio seminífero contendo células germinativas e Sertoli), bem como os componentes do interstício (células de Leydig, tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos). Túbulos seminíferos com morfologia normal, epitélio seminífero íntegro e formado por células dispostas em camadas, sem presença de vacúolos, descamação ou células germinativas no lúmen foram classificados como normais. Já os túbulos que apresentaram qualquer alteração na estrutura, como vacuolização celular, descamação, deslocamento e presença de detritos celulares na luz, foram classificados como anormais. Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem (Guimarães-Ervilha et al., 2021; Souza et al., 2023). A análise histológica do epidídimo foi realizada qualitativamente de

acordo com a integridade da estrutura do ducto, incluindo a morfologia epitelial e o conteúdo luminal. A ocorrência de alterações, como células germinativas no lúmen, alteração cribriforme no epitélio, infiltrados inflamatórios no interstício, vacuolização epitelial, hipertrofia de células claras, quantidade e aspecto dos espermatozoides no lúmen foram registradas (Kempinas & Klinefelter, 2014).

Morfometria e estereologia testicular

Para as análises morfométricas, foram obtidas imagens digitais do testículo ($n = 6/\text{grupo}$) por meio de um Fotomicroscópio (Olympus BX53, Tóquio, Japão) e analisadas usando Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). Para estimar a proporção volumétrica dos componentes do parênquima testicular, utilizamos uma grade com 266 interseções em 10 imagens digitais aleatórias do parênquima testicular de cada animal, totalizando 2.660 pontos por animal. Os pontos correspondentes foram registrados no compartimento tubular, diferenciando os pontos no lúmen, no epitélio seminífero, na túnica própria e no intertúbulo. A proporção volumétrica desses componentes (PV_x) foi determinada pela fórmula: $PV_x (\%) = (NT / NTT) * 100$, onde x = componente em questão, NT = número de pontos sobre o componente específico e NTT é o número de pontos totais (2.660 por animal) (Guimarães-Ervilha et al., 2023). O volume de cada componente testicular, expresso em mililitros (mL), foi estimado pela multiplicação da proporção volumétrica de cada componente pelo volume testicular, dividido por 100. Como a densidade do testículo de mamíferos é em torno de 1g mL^{-1} , então a massa do testículo, em gramas, foi considerada igual ao seu volume em mL (Tae et al., 2005). Para calcular a proporção volumétrica dos componentes intertubulares, 1.000 pontos por animal foram contados no compartimento intertubular. Foram contados pontos em células de Leydig, diferenciando pontos correspondentes ao citoplasma e pontos correspondentes ao núcleo das células de Leydig, macrófagos, vasos sanguíneos, tecido conjuntivo e espaço linfático. Assim como para o cálculo dos componentes do parênquima testicular, a fórmula: $PV_x (\%) = (NT / NTT) * 100$, foi utilizada para calcular a proporção volumétrica dos componentes intertubulares.

O diâmetro nuclear das células de Leydig (μm) foi determinado pela média de 30 núcleos de células de Leydig por animal (Guimarães-Ervilha et al., 2023). O diâmetro dos túbulos seminíferos (μm) foi obtido pela média de medições realizadas em 30 cortes transversais de túbulos seminíferos, por animal, sendo medidos os túbulos que apresentavam o contorno o mais circular possível. O diâmetro foi definido como uma linha reta entre os dois

polos do túbulo, começando na túnica própria de uma extremidade, passando pelo centro do túbulo, e terminando na túnica própria da outra extremidade. Utilizando os mesmos cortes transversais dos túbulos seminíferos, foi medida a altura do epitélio seminífero (μm). Uma linha reta foi traçada no centro da secção, partindo da túnica própria até o lúmen do túbulo. O valor obtido correspondeu à média de duas medições diametralmente opostas. A partir do diâmetro tubular e da altura do epitélio seminífero, foi possível calcular o diâmetro do lúmen dos túbulos seminíferos (μm), subtraindo-se do diâmetro do túbulo o dobro da altura do epitélio (Souza et al., 2016; Couto-Santos et al., 2020).

Produção diária de espermatozoides, número de espermatozoides e tempo de trânsito epididimário

Espermátides testiculares resistentes à homogeneização (estágio 19 da espermatogênese), bem como espermatozoides na cabeça/corpo e cauda do epidídimo foram contados (Robb et al., 1978 modificado). O testículo foi descapsulado, pesado e homogeneizado em 5mL de NaCl 0,9% contendo Triton X-100 0,05%. Após diluição de 10 vezes, a amostra foi transferida para câmaras de Neubauer (quatro campos por animal), e o número de espermátides maduras foi contado. Para calcular a produção diária de espermatozoides (DSP), o número de espermátides por testículo foi dividido por 6,1, que é o número de dias em que as espermátides estão presentes no epitélio seminífero. Da mesma forma, as porções da cabeça/corpo e da cauda do epidídimo foram cortadas em pequenos fragmentos com tesoura e homogeneizadas, e os espermatozoides foram contados conforme descrito para o testículo. O tempo de trânsito do esperma através do epidídimo foi determinado por dividindo o número de espermatozoides em cada porção do epidídimo pelo DSP (Lima et al., 2018; Guimarães-Ervilha et al., 2021).

Motilidade, viabilidade e morfologia dos espermatozoides

Fragmentos da cauda do epidídimo foram colocados em uma placa de Petri contendo 500 μL de BWW a 37 °C, para permitir a liberação dos espermatozoides. Para analisar a motilidade total, 10 μL do fluido epididimário foi colocado entre lâmina e lamínula, previamente aquecidos a 37°C, e avaliados sob aumento de 400x, em microscópio óptico. As células foram classificadas em móveis ou imóveis (Morakinyo et al., 2010) e a motilidade foi expressa em porcentagem (0-100) (CBRA, 1998). Para análise de viabilidade espermática, uma gota da solução de espermatozoides foi misturada com 1% de eosina e 10% de nigrosina. A mistura de espermatozoides-eosina-nigrosina foi colocada em uma lâmina de vidro, e um

esfregaço foi preparado. Após a secagem, 200 espermatozoides foram classificados como viáveis (não corados) ou inviáveis (corados) por meio de microscopia de luz (Eliasson et al., 1977). Para a análise da morfologia espermática, 50µl de fluido fixado da cauda epididimária foi fixado em 100µl de formaldeído 4% tamponado. Esta preparação foi examinada em microscópio de luz com aumento de 1000x, sendo avaliadas 200 células. Foram contabilizados espermatozoides com morfologia normal e anormal (defeitos da cabeça e cauda), sendo os resultados expressos em porcentagem (Filler, 1993).

Análise estatística

Os resultados foram submetidos a avaliação de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Posteriormente, os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA) unidirecional, seguida do *teste post hoc* de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. A análise estatística e os gráficos foram gerados utilizando o software estatístico GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (média \pm DP).

Resultados

Biometria

O peso corporal, pesos absoluto e relativo testiculares e peso relativo epididimário não apresentaram diferenças entre ratos dos grupos experimentais ($p > 0,05$; Tab. 1). O peso absoluto do epidídimo foi menor em ratos expostos ao mercúrio quando comparado ao peso observado no epidídimo de ratos controle e expostos ao eugenol ($p < 0,05$; Tab. 1).

Tabela 1. Parâmetros biométricos de ratos expostos ao eugenol e ao mercúrio por 30 dias.

Parâmetros	Controle	Eugenol	Mercúrio	Eugenol + Mercúrio
Peso corporal (g)	386,60 \pm 34,29 ^a	391,20 \pm 18,35 ^a	363,00 \pm 16,26 ^a	377,50 \pm 17,01 ^a
Testículo (g)	1,75 \pm 0,20 ^a	1,58 \pm 0,17 ^a	1,61 \pm 0,17 ^a	1,74 \pm 0,16 ^a
Testículo (g/100g)	0,46 \pm 0,06 ^a	0,41 \pm 0,02 ^a	0,45 \pm 0,07 ^a	0,46 \pm 0,05 ^a
Epidídimo (mg)	0,69 \pm 0,40 ^a	0,62 \pm 0,04 ^a	0,60 \pm 0,06 ^b	0,68 \pm 0,05 ^{ab}
Epidídimo (mg/100g)	0,18 \pm 0,01 ^a	0,16 \pm 0,01 ^a	0,17 \pm 0,02 ^a	0,18 \pm 0,01 ^a

Média \pm DP. Grupo controle: ratos que receberam Tween-20 a 2% (0,5 mL) por gavagem; Grupo eugenol: ratos expostos ao eugenol 10 mg Kg⁻¹ (diluído Tween-20 a 2%; 0,5 mL) por gavagem; Grupo mercúrio: ratos expostos ao mercúrio 0,6 mg Kg⁻¹ (diluído em água destilada; 0,5 mL) por gavagem; Grupo eugenol + mercúrio: ratos expostos a eugenol 10 mg Kg⁻¹ e, 30 minutos depois, ao mercúrio 0,6 mg Kg⁻¹ (0,5 mL) por gavagem. Diferentes letras sobrescritas na mesma linha (a e b) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$) por ANOVA e teste de Tukey. (n = 6 ratos/grupo).

Atividades das ATPases totais, Ca²⁺, Na⁺/K⁺ e Mg²⁺

No testículo, a atividade das ATPases totais e Na⁺/K⁺ não diferiu entre os grupos experimentais ($p > 0,05$; Fig. 1A e B). Já a atividade de Ca²⁺ ATPase foi maior em testículos de ratos expostos ao mercúrio comparados com o mesmo órgão de animais expostos ao eugenol e expostos a eugenol e mercúrio simultaneamente ($p < 0,05$; Fig. 1C). A exposição ao mercúrio também aumentou a atividade testicular de Mg²⁺ ATPase em relação aos animais controle ($p < 0,05$; Fig. 1D). No epidídimo, não foram observadas diferenças na atividade de ATPases totais, Ca²⁺, Na⁺/K⁺ e Mg²⁺ entre os ratos dos grupos experimentais ($p > 0,05$; Fig. 2 A - D).

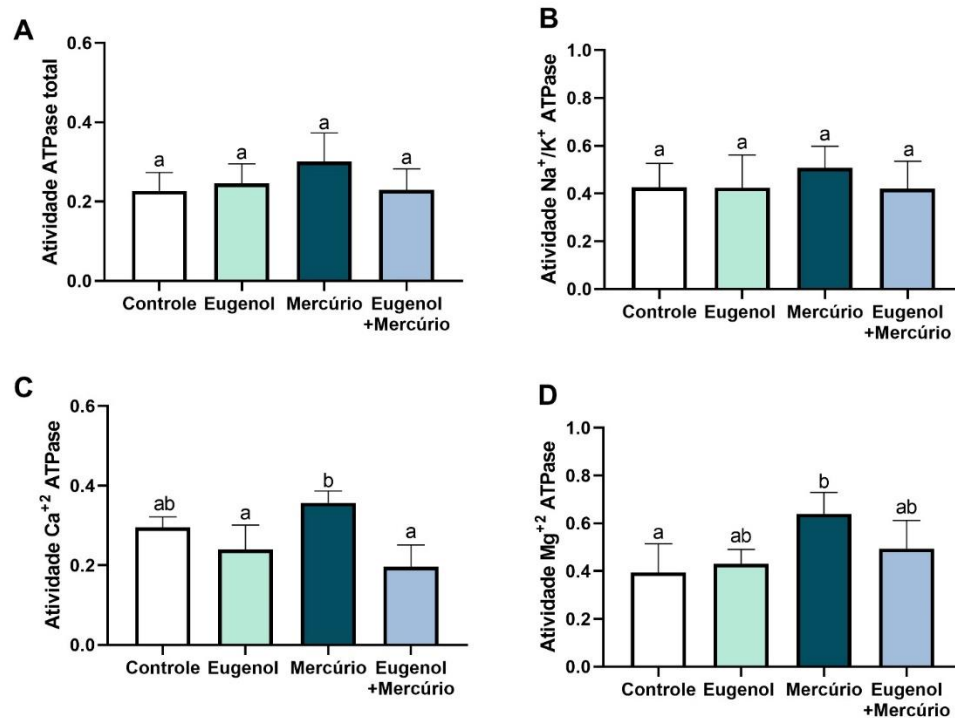


Figura 1: Efeito do eugenol (10 mg Kg⁻¹) e do mercúrio (0,6 mg Kg⁻¹) na atividade de ATPase no testículo de ratos Wistar adultos. (A) Atividade total da ATPase, (B) Na⁺/K⁺ ATPase, (C) Ca²⁺ ATPase e (D) Mg²⁺ ATPase. Os dados são apresentados como média ± DP. Diferentes letras sobrescritas na mesma linha (a e b) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$) por ANOVA e teste de Tukey. ($n = 6$ ratos/grupo).

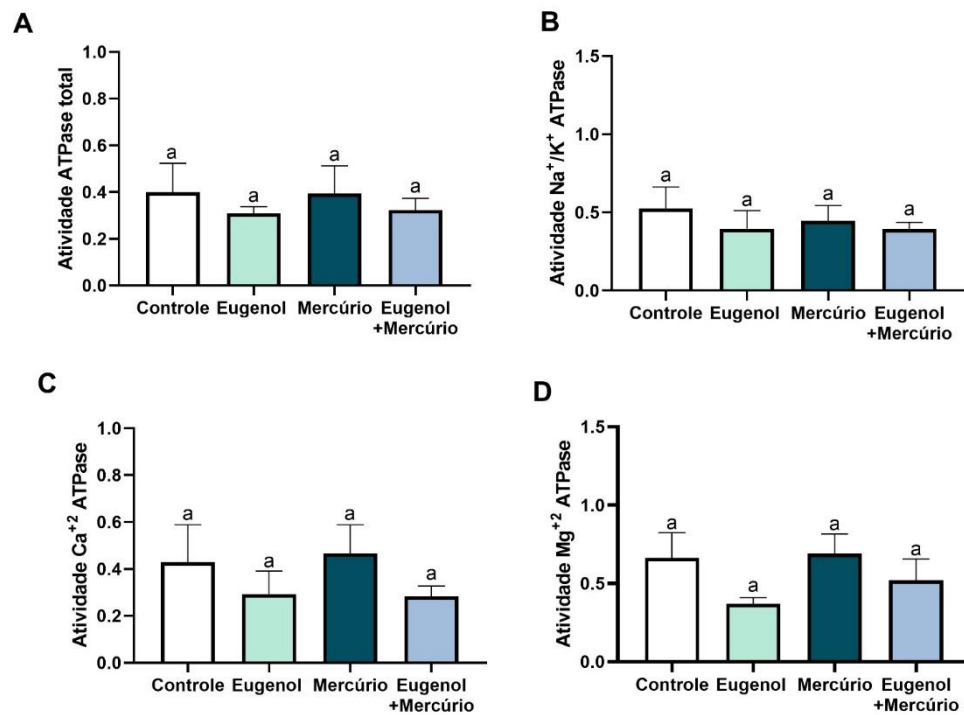


Figura 2: Efeito do eugenol (10 mg Kg⁻¹) e do mercúrio (0,6 mg Kg⁻¹) na atividade de ATPase no epidídimo de ratos Wistar adultos. (A) Atividade total da ATPase, (B) Na⁺/K⁺ ATPase, (C) Ca²⁺ ATPase e (D) Mg²⁺ ATPase. Os dados são apresentados como média ± DP. Diferentes letras sobrescritas na mesma linha (a e b) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$) por ANOVA e teste de Tukey. ($n = 6$ ratos/grupo).

Análise de enzimas antioxidantes e metabólitos oxidativos

A atividade de SOD foi menor nos testículos de animais expostos ao mercúrio que em ratos controle ($p < 0,05$; Fig. 3A). A atividade de CAT não diferiu entre os ratos dos grupos experimentais ($p > 0,05$; Fig. 3B). Já a atividade de GST foi maior no testículo de animais expostos ao mercúrio que em ratos controle e expostos ao eugenol ($p < 0,05$; Fig. 3C). Os valores de FRAP e MDA não foram alterados com a exposição ao eugenol e mercúrio, de forma isolada ou simultânea ($p > 0,05$; Fig. 3D e F). Porém, a concentração de NO e PC foi maior em ratos expostos ao mercúrio que ratos controle ou expostos somente ao eugenol ($p < 0,05$; Fig. 3E e G).

Em relação ao epidídimo, a atividade de SOD foi menor em animais expostos ao mercúrio que animais dos demais grupos experimentais ($p < 0,05$; Fig. 4A). A atividade de CAT e as concentrações de FRAP e MDA não diferiram entre os grupos experimentais ($p > 0,05$; Fig. 4B, D e F). Ratos expostos ao mercúrio apresentaram maior atividade de GST em relação aos ratos controles ($p < 0,05$; Fig. 4C). A exposição ao mercúrio aumentou as concentrações de NO em comparação com ratos de todos os outros grupos experimentais ($p < 0,05$; Fig. 4E). Já

a concentração de PC foi maior no epidídimo de ratos expostos ao mercúrio que em ratos controle e aqueles expostos simultaneamente ao eugenol e mercúrio ($p > 0,05$; Fig. 4G).

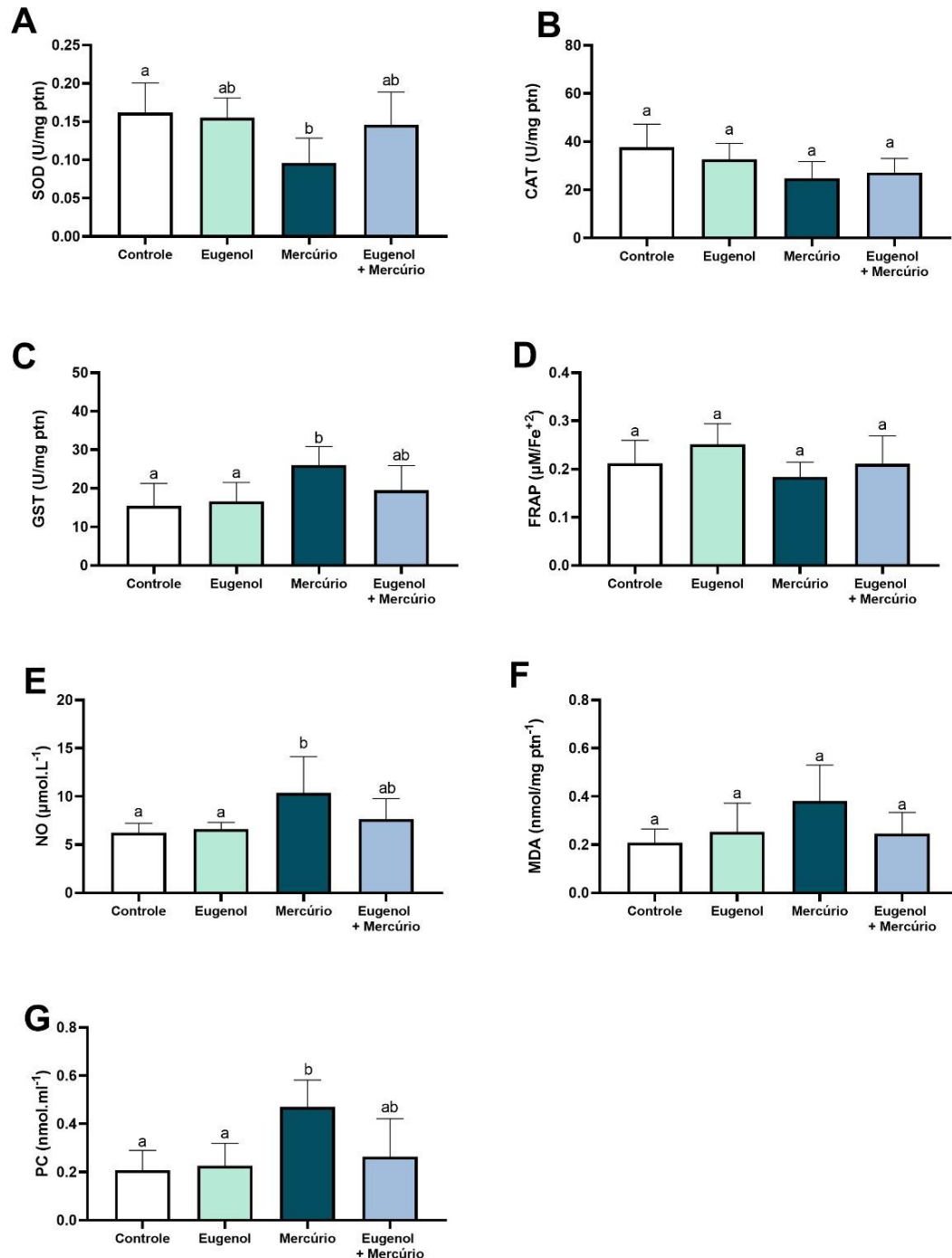


Figura 3: Efeito do eugenol (10 mg Kg^{-1}) e do mercúrio ($0,6 \text{ mg Kg}^{-1}$) na atividade de enzimas antioxidantes e nas concentrações de marcadores de estresse oxidativo no testículo de ratos Wistar expostos durante 30 dias. (A) Superóxido dismutase (SOD); (B) catalase (CAT); (C) glutatona S-transferase (GST); (D) Capacidade antioxidante total (FRAP); (E) Óxido nítrico (NO); (F) Malondialdeído (MDA); e (G) Proteínas carboniladas (PC). Os dados são apresentados como média \pm DP. Diferentes letras sobrescritas na mesma linha (a e b) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$) por ANOVA e teste de Tukey. ($n = 6$ ratos/grupo).

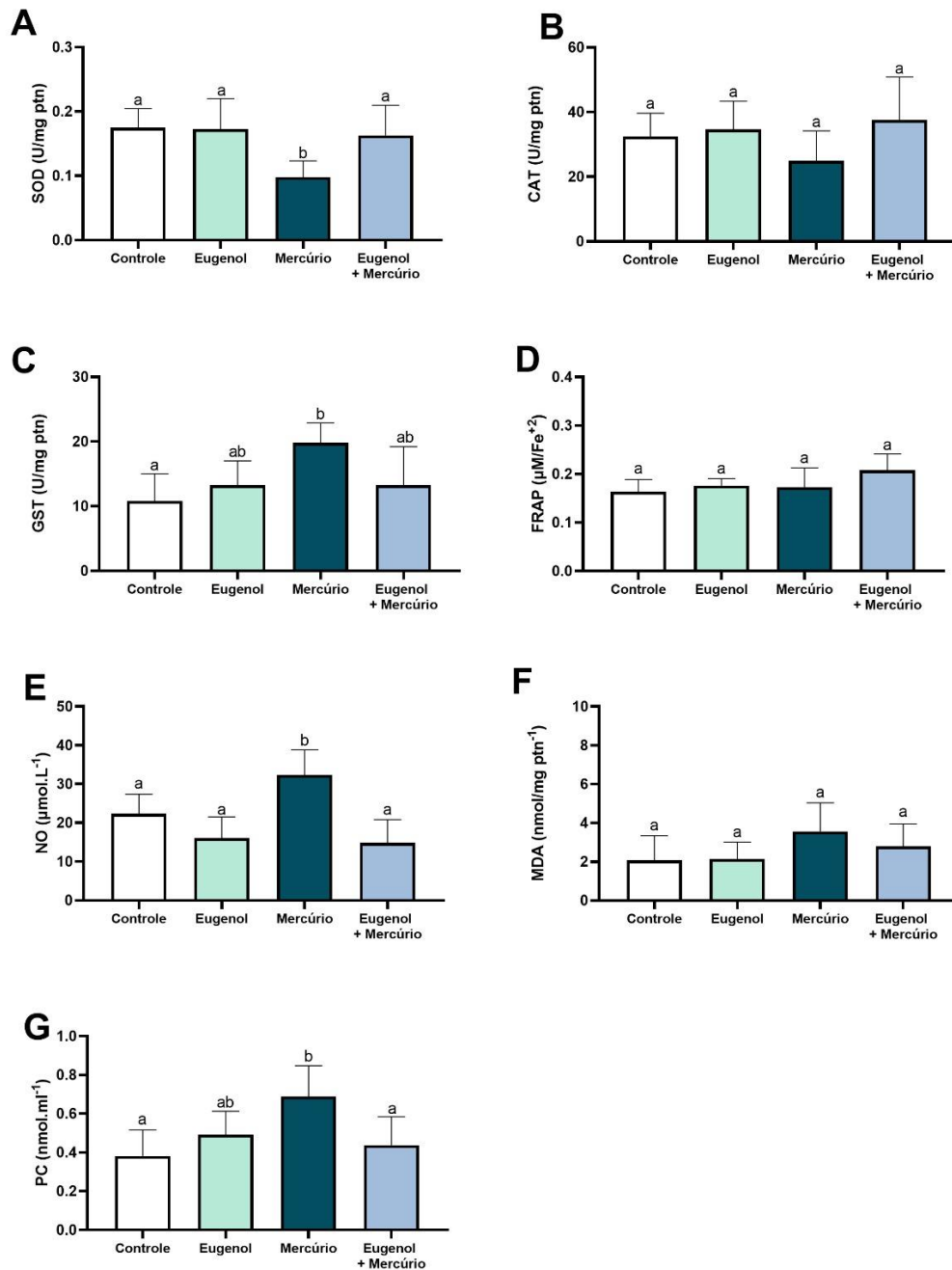


Figura 4: Efeito do eugenol (10 mg Kg^{-1}) e do mercúrio ($0,6 \text{ mg Kg}^{-1}$) na atividade de enzimas antioxidantes e nas concentrações de marcadores de estresse oxidativo no epidídimo de ratos Wistar expostos durante 30 dias. (A) Superóxido dismutase (SOD); (B) catalase (CAT); (C) glutationa S-transferase (GST); (D) Capacidade antioxidante total (FRAP); (E) Óxido nítrico (NO); (F) Malondialdeído (MDA); e (G) Proteínas carboniladas (PC). Os dados são apresentados como média \pm DP. Diferentes letras sobrescritas na mesma linha (a e b) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$) por ANOVA e teste de Tukey. ($n = 6$ ratos/grupo).

Histopatologia

Houve diminuição da proporção de túbulos seminíferos classificados como normais em ratos expostos apenas ao mercúrio, quando comparados a animais controle e expostos apenas ao eugenol ($p < 0,05$; Tab. 2). Os testículos de ratos controles e expostos apenas ao eugenol

apresentaram, no geral, túbulos seminíferos com estrutura normal, exibindo epitélio íntegro, com camadas regulares, distribuição normal de células germinativas e células de Sertoli e com espermatozoides no lúmen tubular (Fig. 5A, E, B e F). O intertúbulo apresentou histologia normal com células de Leydig características (Fig. 5I e J). Por outro lado, ratos expostos apenas ao mercúrio apresentaram maior incidência de patologias nos túbulos seminíferos, exemplificadas principalmente pela presença de vacúolos no epitélio seminífero (Fig. 5C). Ratos do grupo exposto simultaneamente ao eugenol e ao mercúrio apresentaram, no geral, uma arquitetura normal do parênquima testicular (Fig. 5D, H e L).

Com relação à histopatologia epididimária, em geral, a arquitetura tecidual foi regular, com epitélio, lúmen e interstício sem alterações significativas nas regiões de segmento inicial, cabeça e corpo para animais dos quatro grupos experimentais (Fig. 6A-P). Entretanto, alguns vacúolos foram observados com maior incidência no epitélio da cabeça do epidídimo de ratos expostos apenas ao mercúrio (Fig. 6G). Na cauda epididimária de ratos expostos ao mercúrio, de forma isolada ou com co-exposição ao eugenol, foi observado aumento considerável no tamanho das células claras, quando comparados aos animais controle e expostos apenas com eugenol (Fig. 6O e P).

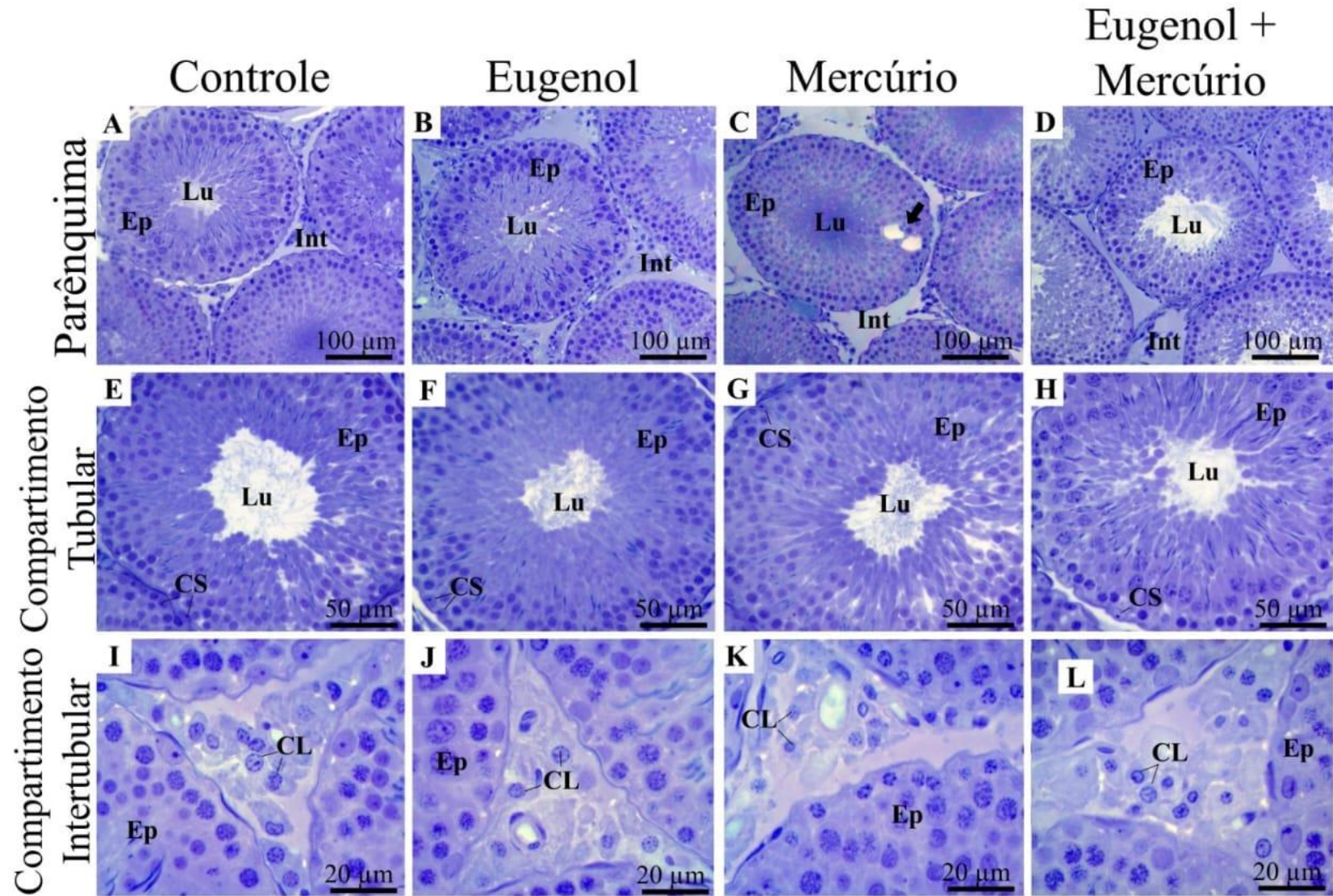


Figura 5: Efeito do eugenol (10 mg Kg^{-1}) e do mercúrio ($0,6 \text{ mg Kg}^{-1}$) na histologia testicular de ratos Wistar expostos por 30 dias. Coloração azul de toluidina, mostrando o parênquima testicular. Grupo controle (A, E, I); Grupo eugenol (B, F, J); Grupo mercúrio (C, G, K); Grupo eugenol + mercúrio (D, H, L). Ep: epitélio seminífero; Lu: lúmen; Int.: compartimento intertubular; CS: célula de Sertoli; CL: célula de Leydig; Seta: vacúolo. Barra de escala: (A-D): $100\mu\text{m}$; (E-H): $50 \mu\text{m}$; (I-L): $20\mu\text{m}$. ($n = 6$ animais/grupo).

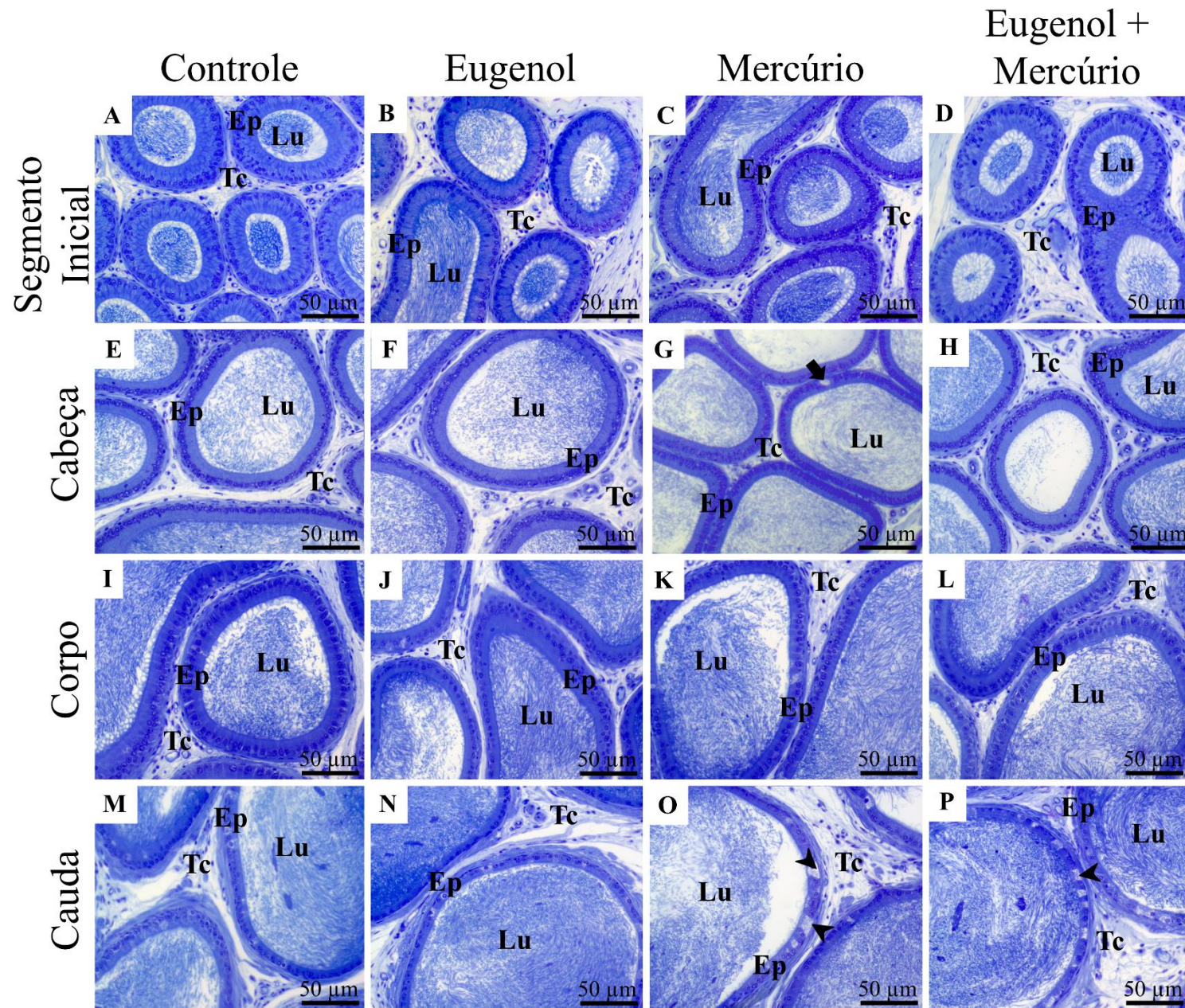


Figura 6: Efeito do eugenol (10 mg Kg⁻¹) e do mercúrio (0,6 mg Kg⁻¹) na histologia epididimária de ratos Wistar expostos por 30 dias. Coloração azul de toluidina, mostrando as quatro regiões do epidídimo. A saber, segmento inicial (A-D), cabeça (E-H), corpo (I-L) e cauda (M-P). Grupo controle (A, E, I, M); Grupo eugenol (B, F, J, N); Grupo mercúrio (C, G, K, O); Grupo eugenol + mercúrio (D, H, L, O). Ep.: epitélio epididimário; Lu.: lúmen; Tc.: tecido conjuntivo; Cabeça de seta: célula clara. Barra de escala: (A-P): 50 µm. (*n* = 6 animais/grupo).

Morfometria e estereologia testicular

Ratos expostos ao mercúrio apresentaram menor altura do epitélio seminífero quando comparados com ratos do grupo controle ($p < 0,05$; Tab. 2). O diâmetro tubular e o diâmetro do lúmen não diferiram entre ratos dos quatro grupos experimentais ($p > 0,05$; Tab. 2). A proporção volumétrica dos compartimentos tubular e intertubular não foi alterada entre ratos expostos ao mercúrio e do grupo controle ($p > 0,05$; Tab. 2), embora a proporção do compartimento tubular tenha aumentado e do compartimento intertubular tenha diminuído nos testículos de ratos expostos apenas ao mercúrio, quando comparados com ratos expostos ao eugenol ($p < 0,05$; Tab. 2). A proporção de epitélio seminífero foi menor em ratos expostos apenas ao mercúrio que em ratos controle e aqueles expostos ao eugenol ($p < 0,05$; Tab. 2). Além disso, a proporção do lúmen foi maior em testículos de ratos expostos ao mercúrio que de ratos controle e aqueles expostos apenas ao eugenol e ao eugenol e mercúrio ($p < 0,05$; Tab. 2).

Tabela 2. Histopatologia, histomorfometria e estereologia testicular em ratos expostos oralmente ao eugenol e mercúrio por 30 dias.

Parâmetros	Controle	Eugenol	Mercúrio	Eugenol + Mercúrio
<i>Patologia testicular</i>				
Túbulos seminíferos normais (%)	93,67 ± 2,50 ^a	93,17 ± 2,04 ^a	89,17 ± 2,48 ^b	91,67 ± 2,16 ^{ab}
Túbulos seminíferos anormais (%)	6,33 ± 2,50 ^a	6,83 ± 2,04 ^a	10,83 ± 2,48 ^b	8,33 ± 2,16 ^{ab}
<i>Morfometria testicular</i>				
Diâmetro tubular (µm)	355,60 ± 14,59 ^a	355,90 ± 6,61 ^a	346,10 ± 4,97 ^a	354,60 ± 6,46 ^a
Altura do epitélio (µm)	105,20 ± 3,84 ^a	104,60 ± 5,05 ^{ab}	99,12 ± 1,88 ^b	103,00 ± 3,68 ^{ab}
Diâmetro do lúmen (µm)	145,20 ± 16,79 ^a	146,70 ± 11,64 ^a	147,80 ± 5,44 ^a	148,70 ± 6,13 ^a
<i>Proporção volumétrica</i>				
Compartimento tubular (%)	84,07 ± 0,91 ^{ab}	83,28 ± 1,63 ^a	85,43 ± 0,58 ^b	83,77 ± 0,88 ^{ab}
Compartimento intertubular (%)	15,93 ± 0,91 ^{ab}	16,72 ± 1,63 ^a	14,57 ± 0,58 ^b	16,23 ± 0,88 ^{ab}
Epitélio seminífero (%)	54,20 ± 1,27 ^a	54,15 ± 2,05 ^a	51,89 ± 0,60 ^b	53,40 ± 1,18 ^{ab}
Túnica própria (%)	13,78 ± 0,93 ^a	13,00 ± 0,70 ^a	13,88 ± 0,94 ^a	12,92 ± 1,19 ^a
Lúmen (%)	16,09 ± 1,19 ^a	16,12 ± 0,80 ^a	19,66 ± 0,96 ^b	17,45 ± 0,76 ^a

Média ± DP. Grupo controle: ratos que receberam Tween-20 a 2% (0,5 mL) por gavagem; Grupo eugenol: ratos expostos ao eugenol 10 mg Kg⁻¹ (diluído Tween-20 a 2%; 0,5 mL) por gavagem; Grupo mercúrio: ratos expostos ao mercúrio 0,6 mg Kg⁻¹ (diluído em água destilada; 0,5 mL) por gavagem; Grupo eugenol + mercúrio: ratos expostos a eugenol 10 mg Kg⁻¹ e, 30 minutos depois, ao mercúrio 0,6 mg Kg⁻¹ (0,5 mL) por gavagem. Diferentes letras sobrescritas na mesma linha (a e b) indicam diferenças significativas entre os grupos (p < 0,05) por ANOVA e teste de Tukey. (n = 6 ratos/grupo).

No compartimento intertubular, ratos expostos ao mercúrio apresentaram maior proporção volumétrica e volume de vasos sanguíneos que ratos controle e expostos ao eugenol (p < 0,05; Tab. 3). A ingestão simultânea de eugenol e mercúrio reduziu o percentual de vasos sanguíneos testiculares que animais expostos ao mercúrio somente (p < 0,05; Tab. 3). A proporção volumétrica e o volume de células de Leydig foram menores em ratos expostos ao mercúrio que em ratos controle e aqueles expostos ao eugenol (p < 0,05; Tab. 3). A ingestão simultânea de eugenol e mercúrio não alterou o volume de células de Leydig em relação ao observado em ratos controle e aqueles expostos ao eugenol (p > 0,05; Tab. 3). A proporção volumétrica de tecido conjuntivo, espaço linfático e macrófagos, assim como seus respectivos volumes não diferiram entre os grupos experimentais (p > 0,05; Tab. 3).

Tabela 3. Histomorfometria e estereologia do compartimento intertubular dos testículos de ratos expostos ao eugenol e ao mercúrio por 30 dias.

Parâmetros	Controle	Eugenol	Mercúrio	Eugenol + Mercúrio
<i>Proporção volumétrica</i>				
Tecido conjuntivo (%)	4,08 ± 0,77 ^a	3,80 ± 0,66 ^a	3,78 ± 0,20 ^a	4,66 ± 0,73 ^a
Espaço linfático (%)	0,60 ± 0,15 ^a	0,59 ± 0,10 ^a	0,53 ± 0,10 ^a	0,51 ± 0,09 ^a
Vaso sanguíneo (%)	1,12 ± 0,19 ^a	1,28 ± 0,19 ^a	1,90 ± 0,40 ^b	1,38 ± 0,24 ^a
Macrófagos (%)	0,22 ± 0,12 ^a	0,22 ± 0,15 ^a	0,24 ± 0,09 ^a	0,31 ± 0,15 ^a
Célula de Leydig (%)	9,91 ± 0,48 ^a	10,83 ± 1,30 ^a	8,10 ± 0,34 ^b	9,38 ± 1,11 ^{ab}
<i>Volume</i>				
Tecido conjuntivo (mL)	0,14 ± 0,03 ^a	0,12 ± 0,03 ^a	0,12 ± 0,02 ^a	0,16 ± 0,03 ^a
Espaço linfático (mL)	0,02 ± 0,004 ^a	0,02 ± 0,005 ^a	0,02 ± 0,003 ^a	0,02 ± 0,003 ^a
Vaso sanguíneo (mL)	0,03 ± 0,01 ^a	0,03 ± 0,01 ^a	0,05 ± 0,01 ^b	0,04 ± 0,01 ^{ab}
Macrófagos (mL)	0,01 ± 0,003 ^a	0,01 ± 0,003 ^a	0,01 ± 0,002 ^a	0,01 ± 0,004 ^a
Célula de Leydig (mL)	0,33 ± 0,05 ^a	0,32 ± 0,03 ^a	0,25 ± 0,02 ^b	0,31 ± 0,03 ^a

Média ± DP. Grupo controle: ratos que receberam Tween-20 a 2% (0,5 mL) por gavagem; Grupo eugenol: ratos expostos ao eugenol 10 mg Kg⁻¹ (diluído Tween-20 a 2%; 0,5 mL) por gavagem; Grupo mercúrio: ratos expostos ao mercúrio 0,6 mg Kg⁻¹ (diluído em água destilada; 0,5 mL) por gavagem; Grupo eugenol + mercúrio: ratos expostos a eugenol 10 mg Kg⁻¹ e, 30 minutos depois, ao mercúrio 0,6 mg Kg⁻¹ (0,5 mL) por gavagem. Diferentes letras sobrescritas na mesma linha (a e b) indicam diferenças significativas entre os grupos (p < 0,05) por ANOVA e teste de Tukey. (n = 6 ratos/grupo).

O diâmetro nuclear das células de Leydig foi significativamente menor em ratos expostos ao mercúrio quando comparados com ratos do grupo controle (p < 0,05; Tab. 4). A porcentagem de núcleos de células de Leydig não foi alterada nos ratos expostos ao mercúrio em relação com animais controle (p > 0,05; Tab. 4), embora tenha apresentado redução quando comparados com animais do grupo eugenol e do grupo exposto ao eugenol e ao mercúrio (p < 0,05; Tab. 4). A porcentagem de citoplasma, assim como o volume nuclear, o volume citoplasmático e o número de células de Leydig por testículo não diferiram entre os animais dos quatro grupos experimentais (p > 0,05; Tab. 4).

Tabela 4. Histomorfometria e estereologia das células de Leydig em testículos de ratos expostos ao eugenol e mercúrio por gavagem durante 30 dias.

Parâmetros	Controle	Eugenol	Mercúrio	Eugenol + Mercúrio
Diâmetro nuclear (μm)	7,48 \pm 0,25 ^a	7,15 \pm 0,12 ^{ab}	6,96 \pm 0,33 ^b	6,97 \pm 0,21 ^b
Porcentagem nuclear (%)	2,55 \pm 0,76 ^{ab}	3,00 \pm 0,43 ^a	1,80 \pm 0,42 ^b	1,95 \pm 0,40 ^b
Porcentagem de citoplasma (%)	7,36 \pm 0,69 ^a	7,83 \pm 1,38 ^a	6,29 \pm 0,23 ^a	7,43 \pm 1,28 ^a
Volume nuclear (μm^3)	220,10 \pm 21,91 ^a	193,80 \pm 34,55 ^a	191,50 \pm 9,65 ^a	194,30 \pm 30,66 ^a
Volume citoplasmático (μm^3)	708,80 \pm 307,10 ^a	647,10 \pm 182,40 ^a	516,90 \pm 164,00 ^a	707,00 \pm 211,50 ^a
Volume celular (μm^3)	928,90 \pm 316,00 ^a	840,80 \pm 197,10 ^a	708,40 \pm 170,00 ^a	901,30 \pm 217,30 ^a
Número de células/testículo ($\times 10^6$)	397,10 \pm 160,20 ^a	443,60 \pm 88,59 ^a	310,30 \pm 60,55 ^a	371,70 \pm 102,00 ^a

Média \pm DP. Grupo controle: ratos que receberam Tween-20 a 2% (0,5 mL); Grupo eugenol: ratos expostos ao eugenol 10 mg Kg⁻¹ (diluído Tween-20 a 2%; 0,5 mL); Grupo mercúrio: ratos expostos ao mercúrio 0,6 mg Kg⁻¹ (diluído em água destilada; 0,5 mL); Grupo eugenol + mercúrio: ratos expostos a eugenol 10 mg Kg⁻¹ e, 30 minutos depois, ao mercúrio 0,6 mg Kg⁻¹ (0,5 mL). Diferentes letras sobrescritas na mesma linha (a e b) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$) por ANOVA e teste de Tukey. ($n = 6$ ratos/grupo).

Produção espermática testicular diária, número de espermatozoides e tempo de trânsito no epidídimo

O número de espermátides no testículo e DSP foram menores nos ratos expostos ao mercúrio do que em ratos controle e expostos apenas ao eugenol e expostos simultaneamente aos dois compostos ($p < 0,05$; Tab. 5). O tempo de trânsito do esperma nas regiões cabeça/corpo do epidídimo não diferiu em nenhum dos grupos experimentais ($p > 0,05$; Tab. 5), diferentemente do observado na cauda do epidídimo, onde o tempo de trânsito foi maior para ratos expostos ao mercúrio quando comparados com ratos expostos apenas com eugenol ($p < 0,05$; Tab. 5)

Tabela 5. Contagem de espermatozoides no testículo e epidídimo e tempo de trânsito no epidídimo de ratos expostos ao eugenol e mercúrio por 30 dias

Parâmetros	Controle	Eugenol	Mercúrio	Eugenol + Mercúrio
Número de espermátides ($\times 10^6$ /testículo)	187,90 \pm 26,52 ^a	161,90 \pm 9,00 ^a	130,20 \pm 4,80 ^b	156,40 \pm 11,75 ^a
Número de espermátides ($\times 10^6$ /g testículo)	118,80 \pm 13,59 ^a	129,80 \pm 5,15 ^a	109,10 \pm 17,26 ^a	109,00 \pm 10,06 ^a
Produção diária de espermatozoides ($\times 10^6$ /órgão)	30,81 \pm 4,35 ^a	26,54 \pm 1,48 ^a	21,34 \pm 0,79 ^b	25,64 \pm 1,93 ^a
Número de espermatozoides da cabeça/corpo epidídimo ($\times 10^6$ /órgão)	139,00 \pm 9,67 ^a	110,00 \pm 20,13 ^a	106,50 \pm 28,92 ^a	132,10 \pm 17,20 ^a
Número de espermatozoides da cabeça/corpo epidídimo ($\times 10^6$ /g órgão)	87,94 \pm 7,94 ^a	78,56 \pm 14,38 ^a	78,85 \pm 15,47 ^a	84,63 \pm 11,54 ^a
Tempo de trânsito de espermatozoides na cabeça/corpo (dias)	4,60 \pm 0,77 ^a	4,16 \pm 0,80 ^a	5,01 \pm 1,46 ^a	5,14 \pm 0,25 ^a
Número de espermatozoides da cauda do epidídimo ($\times 10^6$ /órgão)	224,20 \pm 14,65 ^a	187,90 \pm 41,70 ^a	211,10 \pm 32,91 ^a	217,50 \pm 19,08 ^a
Número de espermatozoides da cauda do epidídimo ($\times 10^6$ /g órgão)	105,60 \pm 5,36 ^a	97,94 \pm 16,85 ^a	96,25 \pm 6,70 ^a	105,80 \pm 11,78 ^a
Tempo de trânsito de espermatozoides na cauda do epidídimo (dias)	7,42 \pm 1,38 ^{ab}	7,03 \pm 1,17 ^a	9,88 \pm 1,39 ^b	8,55 \pm 1,27 ^{ab}

Média \pm DP. Grupo controle: ratos que receberam Tween-20 a 2% (0,5 mL) por gavagem; Grupo eugenol: ratos expostos ao eugenol 10 mg Kg⁻¹ (diluído Tween-20 a 2%; 0,5 mL) por gavagem; Grupo mercúrio: ratos expostos ao mercúrio 0,6 mg Kg⁻¹ (diluído em água destilada; 0,5 mL) por gavagem; Grupo eugenol + mercúrio: ratos expostos a eugenol 10 mg Kg⁻¹ e, 30 minutos depois, ao mercúrio 0,6 mg Kg⁻¹ (0,5 mL) por gavagem. Diferentes letras sobrescritas na mesma linha (a e b) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$) por ANOVA e teste de Tukey. ($n = 6$ ratos/grupo).

Motilidade, viabilidade e morfologia espermática

A motilidade espermática em ratos expostos apenas ao mercúrio foi a menor observada em relação aos demais grupos experimentais ($p < 0,05$; Fig. 7A). Não houve diferença entre os grupos experimentais quanto as médias obtidas para viabilidade espermática ($p > 0,05$; Fig. 7B). A proporção de espermatozoides com morfologia normal foi menor em ratos expostos ao mercúrio que o observado em ratos controle e aqueles expostos ao eugenol ($p < 0,05$; Fig. 7C).

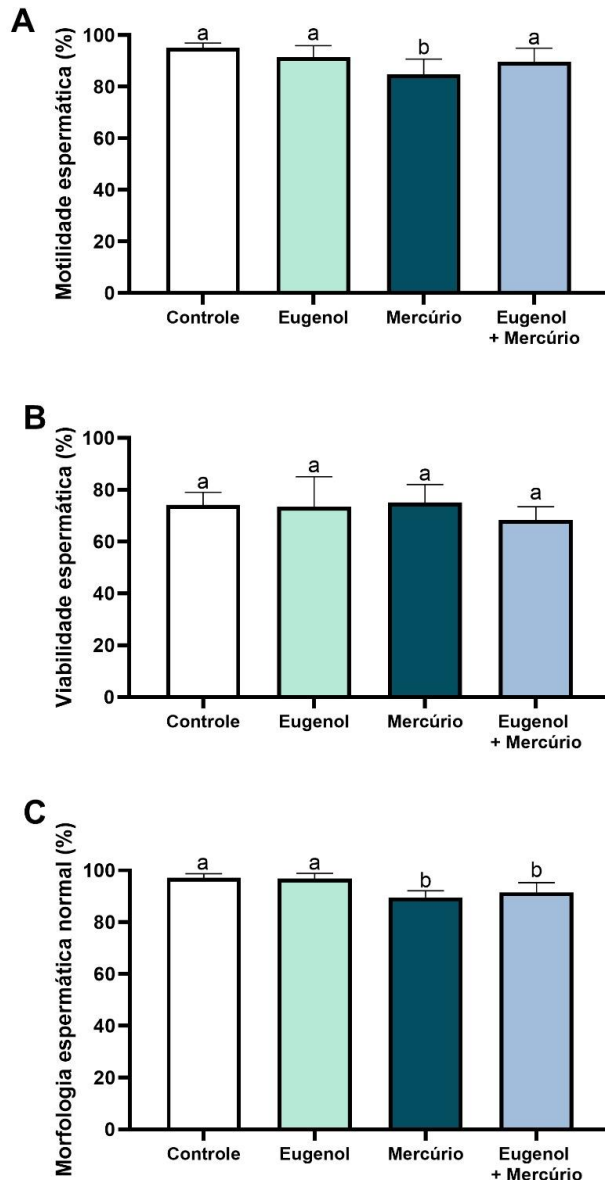


Figura 7: Efeito do tratamento com 10 mg Kg^{-1} de eugenol nos parâmetros espermáticos de ratos Wistar expostos a $0,6 \text{ mg Kg}^{-1}$ de mercúrio por 30 dias. Motilidade espermática (A), espermatozoides viáveis (B), espermatozoides com morfologia normal (C) nos grupos controle, eugenol, mercúrio e eugenol + mercúrio. Os dados são apresentados como média \pm DP. Diferentes letras sobrescritas na mesma linha (a e b) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$) por ANOVA e teste de Tukey. ($n = 6$ ratos/grupo).

Discussão

O eugenol na concentração de 10 mg Kg⁻¹ mostrou ser um composto seguro para os órgãos reprodutores e gametas masculinos, preservando os parâmetros avaliados em ratos saudáveis. Por outro lado, o mercúrio administrado na concentração de 0,6 mg Kg⁻¹ resultou em alterações morfológicas e funcionais testiculares, epididimárias e espermáticas. A presença de vacúolos no epitélio dos dois órgãos, redução na atividade de enzimas antioxidantes, aumento nos níveis de marcadores de dano oxidativo e diminuição na motilidade espermática também já foram descritos em estudos anteriores que verificaram os efeitos deletérios do mercúrio no aparelho reprodutor masculino (Boujbiha et al., 2011; Martinez et al., 2014; Kang et al., 2024). A exposição ao eugenol promoveu a manutenção da atividade de enzimas antioxidantes e preservou características morfológicas e funcionais do testículo, epidídimo e espermatozoides. O eugenol atuou como um agente protetor, atenuando os danos causados pelo mercúrio e preservando parâmetros reprodutivos de ratos Wistar. Esses resultados são apoiados pelo conhecimento sobre o potencial antioxidante do eugenol, inclusive no contexto da intoxicação por metais pesados (Kumar et al., 2021). Portanto, o presente estudo evidencia a relevância do eugenol como um agente terapêutico emergente a ser utilizado no desenvolvimento de estratégias que visam mitigar os danos reprodutivos causados por metais pesados.

Embora os pesos absolutos e relativos do testículo e o peso relativo do epidídimo não tenham diferido entre ratos dos quatro grupos experimentais, observou-se uma redução do peso absoluto do epidídimo naqueles expostos ao mercúrio. Além disso, as análises morfométricas e estereológicas testiculares mostraram que as células de Leydig também foram afetadas pela exposição ao metal, apresentando redução no diâmetro e na porcentagem nuclear. Metais pesados como cádmio, chumbo e mercúrio aumentam a produção de radicais livres, que danificam as células de Leydig, alterando a sua morfologia e número com conseqüente redução na produção de testosterona (Machado-Neves, 2022). Disfunções persistentes nessas células comprometem a espermatogênese, uma vez que baixas concentrações de testosterona podem levar à disfunção das células de Sertoli (Boujbiha et al., 2011; Machado-Neves, 2022). Dessa forma, sugere-se que os danos causados pelo mercúrio às células de Leydig e ao processo da espermatogênese podem ter influenciado na redução do peso absoluto do epidídimo observado no presente estudo. Além disso, Rao & Sharma (2001) observaram nos animais expostos ao mercúrio uma diminuição nas concentrações de proteínas epididimárias e de componentes

essenciais à maturação espermática, como o ácido siálico, mostrando que esse metal pesado pode afetar a fisiologia e o peso do órgão.

Em relação às atividades das ATPases, a exposição ao mercúrio alterou a atividade de algumas ATPases no testículo, mas não no epidídimo. Especificamente, houve um aumento significativo nas atividades de Ca^{2+} ATPase e Mg^{2+} ATPase em testículos de ratos expostos ao mercúrio. A Ca^{2+} ATPase é crucial nos testículos para a homeostase do cálcio, um íon essencial para a sinalização celular (Qi et al., 2007). O aumento na atividade da Ca^{2+} ATPase, portanto, pode ser uma tentativa compensatória das células testiculares para manter a homeostase do cálcio frente ao estresse induzido pelo mercúrio (Qi et al., 2007; Mohammadi et al., 2018). Em células de mexilhão, foi observado que os íons de mercúrio, como Hg^{2+} , podem atuar ativando vias celulares que controlam a expressão do gene de Ca^{2+} ATPase, como a via de sinalização da tirosina quinase, contribuindo assim para o aumento na atividade da enzima (Marchi et al., 2000; Burlando et al., 2004). A maior atividade de Mg^{2+} ATPase que também foi observada, pode ter implicações semelhantes, já que o magnésio é essencial para regulação de processos metabólicos e a manutenção da integridade da membrana celular (Hodeify et al., 2021). A ativação de Mg^{2+} ATPase pode ser uma resposta adaptativa a um aumento na concentração de metais pesados no organismo, que pode interferir no transporte iônico normal, afetando a função das células testiculares (Ballatori, 2002; Hodeify et al., 2021; Contreras et al., 2024). Portanto, o papel dos canais iônicos e das ATPases no transporte de metais pesados, através de mimetismo iônico, pode explicar o aumento na atividade de ambas ATPases (Ballatori, 2002).

Ademais, os resultados do presente estudo mostraram que a exposição ao mercúrio diminuiu a atividade de SOD testicular e epididimária, acompanhada por um aumento nas concentrações dos marcadores oxidativos NO e PC. A SOD é uma enzima que faz parte da primeira frente de defesa antioxidante, extremamente importante na manutenção da integridade dos órgãos como os testículos e epidídimos contra os danos oxidativos (Sies et al., 2017). Esses resultados reforçam a hipótese de que, em testículos e epidídimos, o estresse oxidativo decorrente da produção excessiva de EROs e da redução na atividade de enzimas antioxidantes, é uma das principais consequências da exposição a tóxicos como o mercúrio (Milaeva et al., 2004; Balali-Mood et al., 2021; Machado-Neves, 2022; Naderi et al., 2023). O estresse oxidativo em animais expostos ao mercúrio pode ser atribuído à ativação de vias inflamatórias e apoptóticas induzidas pelo metal (Roshankhah et al., 2020). Além disso, a superprodução de NO em resposta à exposição a tóxicos, é amplamente conhecida por comprometer o estado antioxidante de sistemas biológicos (Rees et al., 1990). Por outro lado, a atividade de GST, tanto no testículo quanto no epidídimo, foi maior em animais expostos ao mercúrio. Os

componentes celulares essenciais para a defesa contra o estresse oxidativo incluem enzimas de desintoxicação, como GST, que desempenham papel vital na sobrevivência das células germinativas masculinas e dos espermatozoides (Rao & Shaha, 2000; Martinez et al., 2017). Já foi descrito que a inibição específica da GST resulta em aumento de apoptose das células germinativas (Rao & Shaha, 2000). Portanto, o aumento da atividade da GST observado no presente estudo pode estar relacionado a um mecanismo compensatório de desintoxicação, semelhante ao observado em outros estudos que relataram aumento na atividade de GST na próstata de ratos Wistar expostos ao HgCl₂ (Rao & Shaha, 2000; Martinez et al., 2017).

No diz respeito à análise histopatológica, os resultados revelaram danos moderados nos túbulos seminíferos de ratos expostos ao mercúrio, caracterizados principalmente por vacuolização epitelial, um achado consistente com relatos anteriores (Albasher et al., 2020; Almeer et al., 2020). A vacuolização do epitélio seminífero pode ser atribuída a diferentes alterações degenerativas, como o acúmulo de fluidos e lipídios intracelulares, assim como danos às células de Sertoli, que desempenham papel crucial no suporte estrutural e funcional das células germinativas (Creasy et al., 2012). De fato, danos às células de Sertoli associados à exposição ao mercúrio já foram descritos e reforçam sua vulnerabilidade frente à toxicidade de metais pesados (SaravanaKumar et al., 2014). No epidídimo, observou-se que o mercúrio induziu vacuolizações epiteliais, particularmente na região de cabeça. Essas alterações podem comprometer processos essenciais como a maturação, transporte e armazenamento de espermatozoides, impactando diretamente a fertilidade masculina, uma vez que a vacuolização do epitélio do epidídimo pode resultar de uma série de alterações, incluindo acúmulo de fluidos e glicoproteínas (Creasy et al., 2012).

Em concordância com a análise histopatológica, a morfometria e a estereologia mostraram alterações significativas na arquitetura testicular de animais expostos ao mercúrio, que indicam um comprometimento estrutural e funcional. A redução do epitélio seminífero, é típica da toxicidade causada por metais pesados, refletindo uma desorganização do microambiente necessário à espermatogênese (Massanyi et al., 2007). No compartimento intertubular, observou-se um aumento na proporção volumétrica de vasos sanguíneos em resposta ao mercúrio, possivelmente associado à inflamação local (Roshankhah et al, 2020). Em quadros inflamatórios, sejam agudos ou crônicos, é comum a vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo, extravasamento de fluidos e liberação de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas (Sá et al., 2013).

Ademais, o mercúrio ingerido isoladamente alterou a motilidade e a morfologia dos espermatozoides. A exposição ao mercúrio está associada a alterações na expressão de genes

críticos para processos como a espermatogênese e a motilidade espermática, o que pode comprometer a fertilidade masculina (Qi et al., 2007; Zhang et al., 2016). Mohammadi et al. (2018) relataram que a administração de HgCl_2 em camundongos, resultou em uma redução na contagem e no percentual de espermatozoides morfolologicamente normais, corroborando os resultados deste estudo. Além disso, já foi observado que a exposição ao HgCl_2 afeta negativamente a expressão de genes relacionados ao transporte de cálcio em espermatozoides, como *CatSper1* e *CatSper2*, que desempenham papéis fundamentais na regulação da entrada de cálcio na cauda dos espermatozoides, um processo essencial para a capacitação espermática e a capacidade de penetração na zona pelúcida do ovócito (Qi et al., 2007). Além das alterações genéticas, os danos espermáticos induzidos pelo mercúrio podem ser atribuídos à produção exacerbada de EROs (Ko et al., 2014). Embora níveis fisiológicos de EROs sejam necessários para eventos relacionados à capacitação espermática, a exposição a concentrações elevadas conduz os espermatozoides a um estado de estresse oxidativo, apontado como uma das principais causas de falhas reprodutivas masculinas (Lavranos et al., 2012; Ko et al., 2014; Aitken, 2017). Sob condições de estresse oxidativo, ocorre peroxidação lipídica nos ácidos graxos insaturados da membrana plasmática do espermatozoide, o que prejudica funções essenciais, como motilidade e capacidade de penetração no ovócito (Aitken, 2017). Além disso, o estresse oxidativo também está associado a danos à integridade do DNA espermático, tendo graves implicações como redução na fertilidade, aumento das taxas de aborto espontâneo e maior risco de doenças na descendência (Aitken & Curry, 2011). A produção diária de espermatozoides foi reduzida em ratos expostos ao mercúrio, como relatado em outros trabalhos que associaram exposição ao mercúrio à redução na produção diária de espermatozoides (Martinez et al., 2014^b; Jahan et al., 2019). Essa redução pode ser associada a alterações histológicas como a diminuição da altura e da proporção de epitélio nos túbulos seminíferos, observadas nas análises morfométricas. Por fim, o tempo de trânsito epididimário, particularmente na região da cauda, foi afetado pelo mercúrio, o que pode comprometer a maturação espermática. Durante o trânsito através do epidídimo, os espermatozoides sofrem maturação e adquirem motilidade progressiva e capacidade de fertilizar o ovócito (Fernandez et al., 2007; da Silva et al., 2011).

Diferente do que foi observado em animais expostos ao mercúrio, a exposição ao eugenol, não causou alteração no peso do epidídimo, corroborando com resultados anteriores de Carvalho et al. (2022), onde a exposição ao eugenol em diferentes concentrações, incluindo de a 10 mg Kg^{-1} , não alterou o peso absoluto e relativo dos testículos nem dos epidídimos. Outros trabalhos mostraram que fontes de eugenol, como o extrato de cravo, em concentrações

de até 15 mg Kg⁻¹ estimularam as atividades secretoras do epidídimo, incluindo a secreção de ácido siálico, o que contrasta com a exposição ao mercúrio, na qual a atividade secretora do órgão foi reduzida (Rao & Sharma, 2001; Mishra & Singh, 2013).

A exposição ao eugenol isoladamente ou simultaneamente com o mercúrio, não modificou a atividade de ATPases testiculares e epididimárias, reforçando a hipótese de que o eugenol pode exercer um efeito quelante, capaz de mitigar a bioacumulação de metais pesados e assim promover um ambiente propício para o funcionamento normal das enzimas (Abd El Motteleb et al., 2014; Fujisawa & Murakami, 2016; Kang et al., 2024).

As análises de enzimas antioxidantes e metabólitos oxidativos mostraram que a atividade da SOD, após a exposição simultânea ao eugenol e mercúrio, se manteve próxima da observada em animais controle. No epidídimo, foi observado um aumento da atividade de SOD em ratos expostos ao eugenol, quando comparado com ratos expostos ao mercúrio. Esse aumento pode estar associado a capacidade do eugenol de interagir com enzimas antioxidantes, como a SOD, melhorando sua atividade antioxidante (Carvalho et al., 2021). Além disso, o aumento na atividade da enzima reforça a capacidade do eugenol de interagir rapidamente com EROS, como os radicais hidroxila (OH•) e ânion superóxido (O²⁻), para proteger estruturas celulares contra danos causados por esses radicais, contribuindo para a redução nas concentrações de marcadores de danos oxidativos como NO e PC (Fujisawa et al., 2002; Nagababu et al., 2010). Outros estudos já mostraram que a exposição ao eugenol inibe a expressão de marcadores inflamatórios como óxido nítrico sintase induzível (iNOS), causando consequente redução nas concentrações de NO (Kaur & Alam, 2010; Barboza et al., 2018). Em ratos expostos ao eugenol e em co-tratados, a atividade da GST foi semelhante à observada em ratos controle, indicando que o eugenol atua tanto na prevenção da formação de EROS quanto na promoção de mecanismos de detoxificação (Carvalho et al., 2022). Embora não tenham sido observadas alterações significativas nas concentrações de MDA e na atividade de CAT, os resultados gerais sugerem um impacto positivo do eugenol sobre o sistema antioxidante.

A análise histopatológica mostrou que a ingestão de eugenol foi capaz de prevenir danos induzidos pelo mercúrio. Observou-se um aumento na proporção de túbulos seminíferos normais e preservação da organização celular, em conformidade com achados prévios (Carvalho et al., 2022). Esses resultados destacam o potencial protetor do eugenol contra a toxicidade reprodutiva, reforçando sua eficácia como agente terapêutico antioxidante e anti-inflamatório. Ainda, os dados morfométricos e estereológicos, mostram que o eugenol atenuou os danos causados pela exposição ao mercúrio, resultando em melhorias na integridade do epitélio seminífero. Notavelmente, o eugenol contribuiu com redução na proporção de vasos

sanguíneos e preservou a arquitetura do microambiente testicular. O impacto anti-inflamatório do eugenol pode estar relacionado à inibição da via de sinalização do fator nuclear kappa B (NF- κ B), um regulador central de processos inflamatórios. Essa via é crucial na transcrição de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6) (Barboza et al., 2018). Evidências sugerem que o eugenol inibe a via do NF- κ B, reforçando sua eficácia anti-inflamatória (Islam et al., 2017). A exposição ao eugenol não afetou parâmetros relacionados às células de Leydig, evidenciando sua capacidade de proteger e regular a produção hormonal (Mishra & Sing, 2008; Mishra & Singh, 2013). Em particular, fontes naturais de eugenol, como o extrato de cravo, têm sido associadas ao estímulo da produção de testosterona por meio da ativação de enzimas esteroidogênicas, como a 3- β e a 17- β -hidroxiesteroide desidrogenase, em concentrações de até 15 mg Kg⁻¹ (Mishra & Sing, 2008; Mishra & Singh, 2013; Carvalho et al., 2022). As análises morfométricas e estereológicas forneceram uma base quantitativa essencial para avaliar os impactos do mercúrio e os potenciais efeitos protetores do eugenol. Esses resultados destacam a relevância do uso de parâmetros quantitativos na compreensão das alterações histológicas e na avaliação da eficácia de intervenções antioxidantes.

Por fim, com relação aos gametas masculinos, a exposição ao eugenol manteve a motilidade espermática a uma proporção próxima à observada em ratos controle, embora as alterações morfológicas não tenham sido completamente evitadas. Nesse contexto, o efeito protetor do eugenol na motilidade espermática pode ser atribuído à sua capacidade antioxidante, que reduz o estresse oxidativo e protege contra a degradação de proteínas essenciais para a funcionalidade espermática (Abd El Motteleb et al., 2014). A exposição ao eugenol promoveu melhorias tanto nos parâmetros histológicos quanto na produção espermática, sugerindo que a preservação da integridade estrutural dos túbulos seminíferos desempenha um papel essencial na recuperação funcional dos testículos. Além disso, o eugenol foi capaz de restaurar o tempo de trânsito e a dinâmica do transporte espermático, o que resultou em melhorias na qualidade dos gametas masculinos.

Conclusão

Os resultados deste estudo evidenciaram que a exposição ao mercúrio comprometeu parâmetros reprodutivos masculinos, promovendo alterações morfológicas, funcionais e bioquímicas em testículo, epidídimo e espermatozoides, tais como presença de vacúolos no testículo e epidídimo, aumento nas concentrações de marcadores de estresse oxidativo, alterações na atividade enzimática antioxidante e redução na motilidade espermática. Por outro

lado, o eugenol demonstrou significativa atividade protetora, preservando a integridade histológica, reduzindo o estresse oxidativo e mantendo a qualidade espermática. Esses achados reforçam o potencial do eugenol como um agente terapêutico eficaz contra a toxicidade reprodutiva induzida pelo mercúrio, destacando sua relevância para o desenvolvimento de estratégias protetoras em contextos de exposições ambientais a metais pesados.

Referências bibliográficas

- Abd El Motteleb, D. M., Selim, S. A., & Mohamed, A. M. (2014). Differential effects of eugenol against hepatic inflammation and overall damage induced by ischemia/re-perfusion injury. *Journal of immunotoxicology*, *11*(3), 238-245. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2013.832444>
- Adefegha, S. A., Okeke, B. M., & Oboh, G. (2021). Antioxidant properties of eugenol, butylated hydroxylanisole, and butylated hydroxyl toluene with key biomolecules relevant to Alzheimer's diseases—In vitro. *Journal of food biochemistry*, *45*(3), e13276. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13276>
- Aebi, H. (1984). Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, *105*(C). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Albasher, G., Alkahtani, S., & Alarifi, S. (2020). Berberine mitigates oxidative damage associated with testicular impairment following mercury chloride intoxication. *Journal of Food Biochemistry*, *44*(9), e13385. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13385>
- Aitken, R. J. (2017). Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Molecular reproduction and development*, *84*(10), 1039-1052.
- Aitken, R. J., & Curry, B. J. (2011). Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxidants & redox signaling*, *14*(3), 367-381.
- Akarsu, S. A., Gür, C., Küçükler, S., Akaras, N., İleritürk, M., & Kandemir, F. M. (2024). Protective effects of syringic acid against oxidative damage, apoptosis, autophagy, inflammation, testicular histopathologic disorders, and impaired sperm quality in the testicular tissue of rats induced by mercuric chloride. *Environmental Toxicology*, *39*(10), 4803-4814. <https://doi.org/10.1002/tox.24395>
- Almeer, R. S., Albasher, G., Kassab, R. B., Ibrahim, S. R., Alotibi, F., Alarifi, S., Ali, D., Alkahtani, S., & Abdel Moneim, A. E. (2020). Ziziphus spina-christi leaf extract attenuates mercury chloride-induced testicular dysfunction in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, *27*, 3401-3412. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07237-w>
- Balali-Mood, M., Naseri, K., Tahergorabi, Z., Khazdair, M. R., & Sadeghi, M. (2021). Toxic mechanisms of five heavy metals: mercury, lead, chromium, cadmium, and arsenic. *Frontiers in pharmacology*, *12*, 643972. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.643972>
- Ballatori, N. (2002). Transport of toxic metals by molecular mimicry. *Environmental health perspectives*, *110*(5), 689-694. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110s5689>

- Barboza, J. N., da Silva Maia Bezerra Filho, C., Silva, R. O., Medeiros, J. V. R., & de Sousa, D. P. (2018). An overview on the anti-inflammatory potential and antioxidant profile of eugenol. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018(1), 3957262. <https://doi.org/10.1155/2018/3957262>
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bonting, S. L., Caravaggio, L. L., & Hawkins, N. M. (1962). Studies on sodium-potassium-activated adenosinetriphosphatase. IV. Correlation with cation transport sensitive to cardiac glycosides. *Archives of biochemistry and biophysics*, 98(3), 413-419. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(62\)90206-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(62)90206-0)
- Boujbiha, M. A., Hamden, K., Guermazi, F., Bouslama, A., Omezzine, A., Kammoun, A., & El Feki, A. (2009). Testicular toxicity in mercuric chloride treated rats: association with oxidative stress. *Reproductive toxicology*, 28(1), 81-89. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.03.011>
- Boujbiha, M. A. M., Hamden, K., Guermazi, F., Bouslama, A., Omezzine, A., & El Feki, A. (2011). Impairment of spermatogenesis in rats by mercuric chloride: Involvement of low 17 β -estradiol level in induction of acute oxidative stress. *Biological trace element research*, 142, 598-610.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brocza, F. M., Rafaj, P., Sander, R., Wagner, F., & Jones, J. M. (2024). Global scenarios of anthropogenic mercury emissions. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 24(12), 7385-7404. <https://doi.org/10.5194/acp-24-7385-2024>
- Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52(C). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)
- Burlando, B., Bonomo, M., Capri, F., Mancinelli, G., Pons, G., & Viarengo, A. (2004). Different effects of Hg²⁺ and Cu²⁺ on mussel (*Mytilus galloprovincialis*) plasma membrane Ca²⁺-ATPase: Hg²⁺ induction of protein expression. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 139(4), 201-207. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.11.001>
- Carvalho, R. P. R., de Almeida Lima, G. D., & Machado-Neves, M. (2021). Effect of eugenol treatment in hyperglycemic murine models: A meta-analysis. *Pharmacological Research*, 165, 105315. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105315>
- Carvalho, R. P. R., de Almeida Lima, G. D., Ribeiro, F. C. D., Ervilha, L. O. G., Oliveira, E. L., Viana, A. G. A., & Machado-Neves, M. (2022a). Eugenol reduces serum testosterone levels and sperm viability in adult Wistar rats. *Reproductive Toxicology*, 113, 110-119.
- Carvalho, R. P. R., Ribeiro, F. C. D., Lima, T. I., Ervilha, L. O. G., Oliveira, E. L., Faustino, A. O., Lima, G. D. A., & Machado-Neves, M. (2022). High doses of eugenol cause structural and functional damage to the rat liver. *Life Sciences*, 304, 120696. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120696>

- Chilukoti, S. R., Sahu, C., & Jena, G. (2024). Protective role of eugenol against diabetes-induced oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in rat testes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 38(1), e23593. <https://doi.org/10.1002/jbt.23593>
- Clarkson, T. W., & Magos, L. (2006). The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Critical reviews in toxicology*, 36(8), 609-662. <https://doi.org/10.1080/10408440600845619>
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA (1998). Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2 ed. Belo Horizonte.
- Contreras, R. G., Torres-Carrillo, A., Flores-Maldonado, C., Shoshani, L., & Ponce, A. (2024). Na⁺/K⁺-ATPase: More than an Electrogenic Pump. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(11), 6122. <https://doi.org/10.3390/ijms25116122>
- Couto-Santos, F., Souza, A. C. F., Bastos, D. S. S., Ervilha, L. O. G., Ribeiro, F. C. D., Araújo, L. S., Guimarães, S. E. F., Oliveira, L. L., & Machado-Neves, M. (2020). Prepubertal exposure to arsenic alters male reproductive parameters in pubertal and adult rats. *Toxicology and applied pharmacology*, 409, 115304. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115304>
- Creasy, D., Bube, A., Rijk, E. D., Kandori, H., Kuwahara, M., Masson, R., ... & Whitney, K. (2012). Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse male reproductive system. *Toxicologic pathology*, 40(6), 40S-121S.
- da Silva, D. A. F., Teixeira, C. T., Scarano, W. R., Favareto, A. P. A., Fernandez, C. D. B., Grotto, D., Barbosa Jr, F., & Kempinas, W. D. G. (2011). Effects of methylmercury on male reproductive functions in Wistar rats. *Reproductive Toxicology*, 31(4), 431-439. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.01.002>
- Dieterich, S., Bieligg, U., Beulich, K., Hasenfuss, G., & Prestle, J. (2000). Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation*, 101(1), 33-39. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.1.33>
- Eaton, D. L., & Klaassen, C. D. (2001). Principles of toxicology. *Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons*, 6.
- Eliasson, R. (1977). Supravital staining of human spermatozoa. *Fertility and sterility*, 28(11), 1257. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)42927-4](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)42927-4)
- Evans Jr, D. J. (1969). Membrane adenosine triphosphatase of Escherichia coli: activation by calcium ion and inhibition by monovalent cations. *Journal of Bacteriology*, 100(2), 914-922. <https://doi.org/10.1128/jb.100.2.914-922.1969>
- Farina, M., Avila, D. S., Da Rocha, J. B. T., & Aschner, M. (2013). Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury. *Neurochemistry international*, 62(5), 575-594. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2012.12.006>
- Fernandez, C. D. B., Porto, E. M., Arena, A. C., & Kempinas, W. D. G. (2007). Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality. *International journal of andrology*, 31(4), 427-437. doi:10.1111/j.1365-2605.2007.00788.x
- Filler, R. (1993). Methods for evaluation of rat epididymal sperm morphology. *Methods in Toxicology*, 3, 334-343. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-461207-5.50025-0>

- Fujisawa, S., & Murakami, Y. (2016). Eugenol and its role in chronic diseases. *Drug Discovery from Mother Nature*, 45-66. DOI 10.1007/978-3-319-41342-6_3
- Guimarães-Ervilha, L. O., Ladeira, L. C. M., Carvalho, R. P. R., Bento, I. P. da S., Bastos, D. S. S., Souza, A. C. F., Santos, E. C., de Oliveira, L. L., Maldonado, I. R. dos S. C., & Machado-Neves, M. (2021). Green tea infusion ameliorates histological damages in testis and epididymis of diabetic rats. *Microscopy and Microanalysis*, 27(5), 1133-1145. <https://doi.org/10.1017/S1431927621012071>
- Guimarães-Ervilha, L. O., Soares, L. L., Bento, I. D. S. P., Carvalho, R. P. R., Lima, T. I., Dias, F. C. R., Bastos, D. S. S., Cossolin, J. F. S., Souza, A. C. F., Reis, E. C. C., Serrão, J. E., Natali, A. J., & Machado-Neves, M. (2023). Effect of Induced Pulmonary Arterial Hypertension on Testicular Parameters of Wistar Rats Subjected to Resistance Exercise Training. *Microscopy and Microanalysis*, 29(2), 635-648. <https://doi.org/10.1093/micmic/ozac037>
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8)
- Hjertén, S., & Pan, H. (1983). Purification and characterization of two forms of a low-affinity Ca²⁺-ATPase from erythrocyte membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 728(2), 281-288. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(83\)90480-7](https://doi.org/10.1016/0005-2736(83)90480-7)
- Hodeify, R., Chakkour, M., Rida, R., & Kreydiyyeh, S. (2021). PGE₂ upregulates the Na⁺/K⁺ ATPase in HepG2 cells via EP4 receptors and intracellular calcium. *Plos one*, 16(1), e0245400. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245400>
- Ito, M., Murakami, K., & Yoshino, M. (2005). Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. *Food and chemical toxicology*, 43(3), 461-466. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.11.019>
- Islam, S. S., Al-Sharif, I., Sultan, A., Al-Mazrou, A., Remmal, A., & Aboussekhra, A. (2017). Eugenol potentiates cisplatin anti-cancer activity through inhibition of ALDH-positive breast cancer stem cells and the NF-κB signaling pathway. *Molecular carcinogenesis*, 57(3), 333-346. DOI: 10.1002/mc.22758
- Jahan, S., Azad, T., Ayub, A., Ullah, A., Afsar, T., Almajwal, A., & Razak, S. (2019). Ameliorating potency of *Chenopodium album* Linn. and vitamin C against mercuric chloride-induced oxidative stress in testes of Sprague Dawley rats. *Environmental health and preventive medicine*, 24, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12199-019-0820-x>
- Kang, B., Wang, J., Guo, S., & Yang, L. (2024). Mercury-induced toxicity: Mechanisms, molecular pathways, and gene regulation. *Science of The Total Environment*, 173577. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.173577>
- Kumar, A., Siddiqi, N. J., Alrashood, S. T., Khan, H. A., Dubey, A., & Sharma, B. (2021). Protective effect of eugenol on hepatic inflammation and oxidative stress induced by cadmium in male rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 139, 111588. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111588>
- Kempinas, W.G., & Klinefelter, G. R. (2014). Interpreting histopathology in the epididymis. *Spermatogenesis*, 4(2), e979114. <https://doi.org/10.4161/21565562.2014.979114>

- Ko, E. Y., Sabanegh Jr, E. S., & Agarwal, A. (2014). Male infertility testing: reactive oxygen species and antioxidant capacity. *Fertility and sterility*, *102*(6), 1518-1527. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.10.020>
- Lavranos, G., Balla, M., Tzortzopoulou, A., Syriou, V., & Angelopoulou, R. (2012). Investigating ROS sources in male infertility: a common end for numerous pathways. *Reproductive Toxicology*, *34*(3), 298-307. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.06.007>
- Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. P., & Shacter, E. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *In Methods in enzymology*, *233*, 346-357. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33040-9)
- Lima, T. I., Sertorio, M. N., Ervilha, L. O. G., Bastos, D. S. S., Souza, A. C. F., Bento, I. P. S., Carvalho, R. P. R., Ladeira, L. C. M., Santos, E. C., Oliveira, L. L., Maldonado, I. R. S. C., & Machado-Neves, M. (2018). Fertility in male rats: disentangling adverse effects of arsenic compounds. *Reproductive Toxicology*, *78*, 130-140. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.04.015>
- Machado-Neves, M. (2022). Effect of heavy metals on epididymal morphology and function: An integrative review. *Chemosphere*, *291*, 133020. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133020>
- Marchi, B., Burlando, B., Panfoli, I., & Viarengo, A. (2000). Interference of heavy metal cations with fluorescent Ca²⁺ probes does not affect Ca²⁺ measurements in living cells. *Cell calcium*, *28*(4), 225-231. <https://doi.org/10.1054/ceca.2000.0155>
- Martinez, C. S., Torres, J. G. D., Peçanha, F. M., Anselmo-Franci, J. A., Vassallo, D. V., Salaices, M., Alonso, M. J., & Wiggers, G. A. (2014a). 60-Day chronic exposure to low concentrations of HgCl₂ impairs sperm quality: hormonal imbalance and oxidative stress as potential routes for reproductive dysfunction in rats. *PLoS One*, *9*(11), e111202. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111202>
- Martinez, C. S., Escobar, A. G., Torres, J. G. D., Brum, D. S., Santos, F. W., Alonso, M. J., Salaices, M., Vassallo, D. V., Peçanha, F. M., Leivas, F. G., & Wiggers, G. A. (2014b). Chronic exposure to low doses of mercury impairs sperm quality and induces oxidative stress in rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, *77*(1-3), 143-154. <https://doi.org/10.1080/15287394.2014.867202>
- Martinez, C. S., Peçanha, F. M., Brum, D. S., Santos, F. W., Franco, J. L., Zemolin, A. P. P., Anselmo-Franci, J. A., Junior, F. B., Alonso, M. J., Salaices, M., Vassallo, D. V., Leivas, F. G., & Wiggers, G. A. (2017). Reproductive dysfunction after mercury exposure at low levels: evidence for a role of glutathione peroxidase (GPx) 1 and GPx4 in male rats. *Reproduction, Fertility and Development*, *29*(9), 1803-1812. <http://dx.doi.org/10.1071/RD16310>
- Massányi, P., Lukáč, N., Slivková, J., Kováčik, J., Makarevich, A. V., Chrenek, P., Toman, R., Forgács, Z., Somosy, Z., Stawarz, R., & Formicki, G. (2007). Mercury-induced alterations in rat kidneys and testes in vivo. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, *42*(7), 865-870. <https://doi.org/10.1080/10934520701370410>
- Milaeva, E., Petrosyan, V., Berberova, N., Pimenov, Y., & Pellerito, L. (2004). Organic derivatives of mercury and tin as promoters of membrane lipid peroxidation. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, *2*(1-2), 69-91.

- Mishra, R. K., & Singh, S. K. (2008). Safety assessment of *Syzygium aromaticum* flower bud (clove) extract with respect to testicular function in mice. *Food and Chemical Toxicology*, *46*(10), 3333-3338. doi: 10.1016/j.fct.2008.08.006
- Mishra, R. K., & Singh, S. K. (2013). Reproductive effects of lipid soluble components of *Syzygium aromaticum* flower bud in male mice. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, *4*(2), 94. <https://doi.org/10.4103/0975-9476.113870>
- Mohammadi, S., Gholamin, M., Mohammadi, M., Mansouri, A., Mahmoodian, R., Attari, S., Kebriaei, S. M., Zibaei, B., Roshanaei, M., Daneshvar, F., Khandehro, M., Khodadadegan, M. A., Delshad, A., Mohammadzadeh, F., Peyvandi, M., Ghayour-Mobarhan, M., Tavallaie, S., Boroumand-Noughabi, S., & Ferns, G. (2018). Down-regulation of CatSper 1 and CatSper 2 genes by lead and mercury. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *59*, 82-86. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.03.007>
- Morakinyo, A. O., Achema, P. U., & Adegoke, O. A. (2010). Effect of *Zingiber officinale* (Ginger) on sodium arsenite-induced reproductive toxicity in male rats. *African Journal of Biomedical Research*, *13*(1), 39-45.
- Morris, J. K. (1965). A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. cell Biol*, *27*, 1A-149A.
- Naderi, N., Darmishonnejad, Z., Tavalae, M., & Nasr-Esfahani, M. H. (2023). The effect of alpha-lipoic acid on sperm functions in rodent models for male infertility: A systematic review. *Life Sciences*, *323*, 121383. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.121383>
- Nagababu, E., Rifkind, J. M., Boindala, S., & Nakka, L. (2010). Assessment of antioxidant activity of eugenol in vitro and in vivo. *Free radicals and antioxidant protocols*, 165-180. doi:10.1007/978-1-60327-029-8_10
- Ohnishi, T., Suzuki, T., Suzuki, Y., & Ozawa, K. (1982). A comparative study of plasma membrane Mg²⁺-ATPase activities in normal, regenerating and malignant cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *684*(1), 67-74. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(82\)90050-5](https://doi.org/10.1016/0005-2736(82)90050-5)
- Qi, H., Moran, M. M., Navarro, B., Chong, J. A., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Kirichok, Y., Ramsey, I. S., Quill, T. A., & Clapham, D. E. (2007). All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(4), 1219-1223. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610286104>
- Rahayu, S. Y. S., Aminingsih, T., & Fudholi, A. (2022). The protective effect of nano calcium produced from freshwater clam shells on the histopathological overview of the liver and kidneys of mice exposed to mercury toxins. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, *71*, 126963. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2022.126963>
- Rao, A. K., & Shaha, C. (2000). Role of glutathione S-transferases in oxidative stress-induced male germ cell apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, *29*(10), 1015-1027. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00408-1](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00408-1)
- Rao, M. V., & Sharma, P. S. N. (2001). Protective effect of vitamin E against mercuric chloride reproductive toxicity in male mice. *Reproductive Toxicology*, *15*(6), 705-712. [https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(01\)00183-6](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(01)00183-6)

- Rees, D. D., Palmer, R. M., Schulz, R., Hodson, H. F., & Moncada, S. (1990). Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *British journal of pharmacology*, *101*(3), 746.
- Rizzetti, D. A., Martinez, C. S., Escobar, A. G., da Silva, T. M., Uranga-Ocio, J. A., Peçanha, F. M., Vassallo, D. V., Castro, M. M., & Wiggers, G. A. (2017). Egg white-derived peptides prevent male reproductive dysfunction induced by mercury in rats. *Food and Chemical Toxicology*, *100*, 253-264. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2016.12.038>
- Robb, G. W., Amann, R. P., & Killian, G. J. (1978). Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *Reproduction*, *54*(1), 103-107. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0540103>
- Roshankhah, S., Abdolmaleki, A., & Salahshoor, M. R. (2020). Anti-inflammatory, anti-apoptotic, and antioxidant actions of Middle Eastern Phoenix dactylifera extract on mercury-induced hepatotoxicity in vivo. *Molecular biology reports*, *47*(8), 6053-6065. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05680-4>
- SaravanaKumar, S., Felicia, C., & Sundarapandian, S. (2014). Effect of Smilaxchina on Mercuric Chloride induced histopathological alterations in testis of male albino rats. *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research*, *6*(4), 97-101.
- Sá, R.C.S, Andrade, L. N., & de Sousa, D. P. (2013). A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules*, *18*(1), 1227-1254. doi:10.3390/molecules18011227
- Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative stress. *Annual review of biochemistry*, *86*(1), 715-748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>
- Souza, A. C. F., Bastos, D. S. S., Couto-Santos, F., Guimarães-Ervilha, L. O., Araújo, L. S., Souza, P. H. C. A., Coimbra, J. L. P., Oliveira, L. L., Guimarães, S. E. F., & Machado-Neves, M. (2023). Long-term reproductive effects in male rats prenatally exposed to sodium arsenite. *Environmental Toxicology*, *38*(5), 1162-1173. <https://doi.org/10.1002/tox.23756>
- Souza, A. C. F., Marchesi, S. C., Domingues de Almeida Lima, G., Ferraz, R. P., Santos, F. C., da Matta, S. L. P., & Machado-Neves, M. (2016). Effects of sodium arsenite and arsenate in testicular histomorphometry and antioxidant enzymes activities in rats. *Biological trace element research*, *171*, 354-362.
- Suantawee, T., Wesarachanon, K., Anantsuphasak, K., Daenphetpoy, T., Thien-Ngern, S., Thilavech, T., Pasukamonset, P., Ngamukote, S., & Adisakwattana, S. (2015). Protein glycation inhibitory activity and antioxidant capacity of clove extract. *Journal of food science and technology*, *52*, 3843-3850. DOI 10.1007/s13197-014-1452-1
- Tae, H. J., Jang, B. G., Ahn, D. C., Choi, E. Y., Kang, H. S., Kim, N. S., Lee, J. H., Park, S. Y., Yang, H. H., & Kim, I. S. (2005). Morphometric studies on the testis of Korean ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus karpowi*) during the breeding and non-breeding seasons. *Veterinary Research Communications*, *29*(7). <https://doi.org/10.1007/s11259-005-3080-8>
- Tsikas, D. (2007). Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of Chromatography B*, *851*(1-2), 51-70. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.054>

- Witczak, A., Rajkowska-Myśliwiec, M., Pokorska-Niewiada, K., & Navarro, C. B. (2024). Health risks associated with mercury intake from rice and rice products. *Food and Chemical Toxicology*, *191*, 114905. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2024.114905>
- World Health Organization. (2017). *Guidelines for drinking-water quality*. World Health Organization.
- World Health Organization. (2021). *Compendium of WHO and other UN guidance on health and environment*. World Health Organization.
- Yang, L., Zhang, Y., Wang, F., Luo, Z., Guo, S., & Strähle, U. (2020). Toxicity of mercury: Molecular evidence. *Chemosphere*, *245*, 125586. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125586>
- Zahir, F., Rizwi, S. J., Haq, S. K., & Khan, R. H. (2005). Low dose mercury toxicity and human health. *Environmental toxicology and pharmacology*, *20*(2), 351-360. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2005.03.007>
- Zhang, Q. F., Li, Y. W., Liu, Z. H., & Chen, Q. L. (2016). Reproductive toxicity of inorganic mercury exposure in adult zebrafish: Histological damage, oxidative stress, and alterations of sex hormone and gene expression in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Aquatic Toxicology*, *177*, 417-424. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.06.01>

5. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos neste estudo evidenciaram de forma consistente a atividade protetora do eugenol contra os danos hepáticos e reprodutivos induzidos pela exposição ao mercúrio em ratos Wistar machos. Embora o eugenol não tenha sido capaz de atenuar o aumento da concentração de proteínas carboniladas no fígado provocada pelo mercúrio, sua ação antioxidante se mostrou eficaz na prevenção dos demais danos hepáticos e reprodutivos causados pelo metal. A administração do eugenol reduziu a bioacumulação do mercúrio no fígado e o estresse oxidativo, preservando a integridade funcional e estrutural do órgão. No aparelho reprodutor masculino, o composto mostrou efeito protetor ao manter a atividade antioxidante e preservar as características morfológicas e funcionais testiculares, epididimárias e espermáticas, reforçando seu potencial efeito protetor. Dessa forma, o presente estudo reforça o papel do eugenol como um agente terapêutico, com potencial aplicação na prevenção dos efeitos adversos da toxicidade por metais pesados. Além disso, os achados desta pesquisa fornecem bases para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e estratégias de prevenção contra danos induzidos por poluentes ambientais.