

AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO ÓLEO DA LINHAÇA NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR METOTREXATO EM CAMUNDONGOS

F. L. Moura¹ e E. A. M. Costa²

¹ Graduanda em Nutrição pela UNI-RN

² Mestre em Ciências Farmacêuticas pela UFRN. Docente do Curso de nutrição da UNI-RN

moniqueitej@hotmail.com - erikamelonutri@gmail.com

RESUMO

O uso de Drogas para tratamento anticâncer, como o Metotrexato (MTX), por exemplo, pode prejudicar severamente a função intestinal, podendo causar diversos efeitos colaterais, dentre eles o mais grave que é a mucosite, pois pode causar a redução ou interrupção do tratamento do câncer. Substâncias naturais extraída de vegetais podem apresentar importante ação anti-inflamatória. Os ácidos graxos oleico e ômega 3 (ácidos graxos alfa-linolênicos) possuem importante papel anti-inflamatório, e, portanto, podem ser útil no tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes, sendo considerado um alimento funcional ou nutracêutico. A linhaça é a fonte vegetal mais rica em ômega 3, podendo o seu óleo ser utilizado como um agente anti-inflamatório na prevenção da inflamação intestinal. Os objetivos desse estudo foi avaliar a evolução ponderal e o efeito do óleo da linhaça na mucosa intestinal de camundongos com mucosite intestinal induzida pelo MTX. Para tanto foram realizados quatro grupos experimentais com camundongos, sendo eles: grupo 1, controle; grupo 2, mucosite (presença de 2,5mg/kg/dia MTX); grupo 3, óleo de linhaça (0,25ml do óleo de linhaça por gavagem); grupo 4, linhaça-mucosite (presença da suplementação com óleo de linhaça + MTX). Observou-se que animais apresentaram crescimento linear e na presença do MTX, ocorreu uma redução da massa corporal no grupo tratado. O fármaco causou danos nas vilosidades e criptas intestinais. A suplementação do óleo de linhaça nos animais com mucosite não preveniu os danos nas vilosidades intestinais, causado pelo MTX. A suplementação do óleo de linhaça nos animais com mucosite não preveniu os danos causados pelo MTX. Porém o pré-tratamento com o óleo de linhaça promoveu a restauração das vilosidades e criptas do intestino delgado.

PALAVRAS-CHAVE: Criptas intestinais, vilosidades intestinais, mucosite, evolução ponderal, quimioterapia.

EVALUATION OF PROTECTIVE EFFECT OF OIL IN FLAXSEED MUCOSITIS INDUCED INTESTINAL METHOTREXATE IN MICE

ABSTRACT

The use of drugs for anticancer treatment such as methotrexate (MTX), for example, can severely impair intestinal function, causing many, including the most serious side effects are mucositis, as it may cause a reduction or discontinuation of treatment cancer. Natural substances extracted from plants may have important anti-inflammatory action. Oleic fatty acids, and omega-3 (alpha-linolenic fatty acids) possess important anti-inflammatory role and therefore may be useful in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases, and is considered a functional food or nutraceutical. The flax plant is the richest source of omega 3, this oil may be used as an anti-inflammatory agent for the prevention of intestinal inflammation. The objectives of this study was to evaluate the effect of weight gain and flaxseed oil in the intestinal mucosa of mice with intestinal mucositis induced by MTX. For both four experimental groups of mice were performed, as follows: group 1, control, group 2, mucositis (presence of 2,5 mg/kg/day MTX), group 3, flaxseed oil (0,25 ml of flaxseed oil gavage), group 4, flaxseed-mucositis (presence of supplementation with flaxseed oil + MTX). It has been observed that animals showed a linear growth in the presence of MTX, a reduction in body weight in the treated group occurred. The drug caused damage to the intestinal villi and crypts. The supplementation of linseed oil in animals with mucositis did not prevent the damage in the intestinal villi caused by MTX. The supplementation of linseed oil in animals with mucositis did not prevent the damage caused by MTX. However, pretreatment with linseed oil promoted the restoration of villi and crypts of the small intestine.

KEY-WORDS: intestinal crypts, intestinal villi, mucositis, weight gain, chemotherapy.

INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta do organismo para ficar livre dos tecidos danificados ou necróticos e invasores estranhos, tais como os microrganismos sendo essencial para a sobrevivência. Esta resposta é fundamentalmente protetora, à infecção, cirurgia e trauma. Sem a inflamação, as infecções poderiam passar despercebidas, ferimentos poderiam nunca cicatrizar e os tecidos injuriados poderiam ficar com permanentes feridas infecciosas (KUMAR et al., 2010).

A inflamação da mucosa é conhecida como mucosite e essa provoca lesões que podem ocorrer no aparelho digestivo (oral ou intestinal). Mucosite é um termo que descreve uma síndrome caracterizada por ulcerações e sintomas gastrointestinais. As manifestações orais e intestinais constituem um aspecto importante proveniente da toxicidade de agentes neoplásicos, afetando tanto a habilidade de tolerar a quimioterapia quanto o custo geral do tratamento. A forma intestinal pode provocar também lesões orais como vômitos, anorexia e, principalmente, diarreia (LIMA, 2008).

Agentes quimioterápicos também podem provocar o desenvolvimento da mucosite, o tratamento com esse fármaco é dada como uma terapia sistêmica que afeta o corpo todo. O alvo de ação dos agentes quimioterápicos não é limitado ao tecido maligno; ela afeta também as células normais que se dividem rapidamente como as da medula óssea, folículos pilosos e a mucosa do trato digestório que são tipicamente as mais afetadas (VOLPATO et al., 2007 e VARDI et al., 2008).

Os sintomas provocados por fármacos como metotrexato (MTX) mais comuns são anorexia, náusea, vômito, fadiga, diarreia, mucosite. O Metotrexato é o quimioterápico mais utilizado devido sua eficácia contra os tumores, baixo custo financeiro e comodidade posológica (ÇETIN et al., 2008).

Estudos mostram que determinados componentes da dieta poderiam afetar a resposta dos organismos à inflamação, isso incentiva à procura de substâncias naturais, extraída de vegetais, com atividades antioxidantes, uma vez que essas substâncias podem apresentar importante ação anti-inflamatória, controlando a síntese de prostaglandinas e modulando a liberação de citocinas e óxido nítrico (METCALF et al., 2007; FAINTUCH et al., 2011).

O estudo e o interesse pelos ácidos graxos poliinsaturados iniciaram-se, após ter sido observado a correlação entre a ingestão de ácidos graxos saturados, com a ocorrência de algumas enfermidades, particularmente as cardiovasculares e algumas formas de câncer (ANDRADE, 2006). Trabalhos clínicos em humanos e experimentais em animais descrevem o uso oral do óleo de linhaça (*Linum usitatissimum*) com potencial benéfico em diversas áreas da medicina (PINHEIRO, 2007).

A linhaça (*Linum Usitatissimum* L.) é a semente do linho, planta pertencente à família das Lináceas (GALVÃO et al., 2008). É uma oleaginosa (monocotiledônea) de coloração que vai do marrom ao dourado, ambos possuem a mesma composição, porém, a marrom é cultivada em regiões de clima quente e úmido com utilização de agrotóxico, a dourada é cultivada em regiões frias sem o uso de agrotóxico (LIMA, 2008). Quando mantida a temperatura ambiente de 20°C, a semente crua é composta por aproximadamente, 46% de ácidos graxos 1-ácido linolênico (ALA ou ômega-3), 15% de ácido eicosapentaenoico (EPA ou ômega-6), 24% de ácido graxo monoinsaturado e 15% de saturados (ALMEIDA et al., 2009).

O Omega-3 é um tipo de gordura poli-insaturada encontrado em peixes marinhos de água fria e em algumas sementes de plantas. Ele permite a formação de dois importantes ácidos graxos de cadeia longa: os ácidos EPA (eicosapentaenoico) e DHA

(docosaenoico). O EPA relaciona-se principalmente com a proteção da saúde cardiovascular (MARTINS et al., 2008).

Estudos experimentais com suplementação oral com ácido graxo ômega-3 relataram melhora do padrão histológico, manutenção da permeabilidade intestinal e redução tecidual de mediadores derivados do ácido araquidônico (CAMPOS et al., 2002).

Uma alternativa para amenizar os efeitos do tratamento quimioterápico seria a ingestão do precursor do ácido eicosapentaenoico (EPA), denominado l-ácido linolênico (ALA), pois o EPA leva a produção de citocinas menos reativas no local da inflamação. Dessa forma, o óleo de linhaça que tem em sua composição o ALA como o principal representante ômega 3, poderia atuar como agente anti-inflamatório (REHEN et al., 2010).

O ALA corresponde à forma vegetal dos ácidos graxos ômega 3 sendo os óleos de soja e canola as principais fontes dietéticas, todavia a linhaça destaca-se como sendo a fonte vegetal mais rica nesse ácido graxo (MOLENA-FERNANDES et al., 2010).

O consumo numa proporção adequada de ácidos graxos ômega-6 e ômega-3 levam a uma melhor regulação da resposta imune em indivíduos saudáveis. Nesse contexto, estratégias terapêuticas para diminuir a resposta inflamatória aguda acentuada, sejam elas medicamentosas ou nutricionais, devem ser exploradas (GARÓFOLO e PETRILLI, 2006).

Sendo assim, considerando os sintomas provocados por agentes quimioterápicos e tendo em vista que a linhaça é a fonte vegetal mais rica em ômega 3, podendo o seu óleo ser utilizado como um agente anti-inflamatório na prevenção da inflamação intestinal provocado pelo tratamento quimioterápico com MTX. Percebe-se a relevância da investigação desses fatores na prevenção e controle da inflamação tornando importante o estudo do óleo da linhaça, para verificar sua intervenção na mucosite intestinal.

METODOLOGIA

O presente estudo é do tipo experimental, foram utilizados camundongos machos da linhagem *Swiss*, provenientes do biotério do Centro Universitário do Rio Grande do Norte (UNI-RN). Os animais apresentaram idade mínima de 02 meses (camundongos jovens), com peso médio entre 30-40g, mantidos em gaiolas apropriadas, em ambiente, temperatura controlada de $25^{\circ} \pm 2^{\circ}$ e num ciclo claro/escuro de 12 horas. Todos os animais tiveram livre acesso à ração e água, exceto no dia anterior ao sacrifício (jejum de ração por 24h).

Para a suplementação dos animais foi utilizado o Óleo da Linhaça da marca Performance Nutrition®, cada *softgel* do óleo com 1000mg contém uma mistura natural de Ácido Alfa-Linoleico (ALA), Ácido Linoleico e Ácido Oleico. O grupo de suplementação com óleo de linhaça receberam por gavagem 0,25mL do referido óleo.

Os camundongos foram divididos aleatoriamente em 04 grupos (n=6/grupo) e submetidos a 04 semanas de experimentação.

Grupo 1 – Grupo controle: os animais receberam ração comercial e água *ad libitum* durante as 04 semanas de pesquisa.

Grupo 2 – Grupo mucosite: além da água e ração foi submetido à indução de injúria da mucosite intestinal através do medicamento metotrexato (2,5 mg/kg/dia) por via subcutânea (sc) uma vez ao dia durante os últimos 3 dias consecutivos do experimento (CARNEIRO-FILHO et al., 2004).

Grupo 3 – Grupo óleo de linhaça: administrou-se por gavagem 0,25mL/dia do óleo de linhaça durante as 04 semanas de experimento.

Grupo 4 – Grupo linhaça + mucosite, os animais deste grupo receberam 0,25mL da suplementação por gavagem com óleo de linhaça durante as 04 semanas do tratamento. A ração comercial e a oferta de água foram *ad libitum*. Este grupo foi submetido à indução da mucosite intestinal de acordo com o protocolo de mucosite nos 03 últimos dias do experimento.

A seguir a representação dos grupos no desenho amostral do estudo (Figura 1).

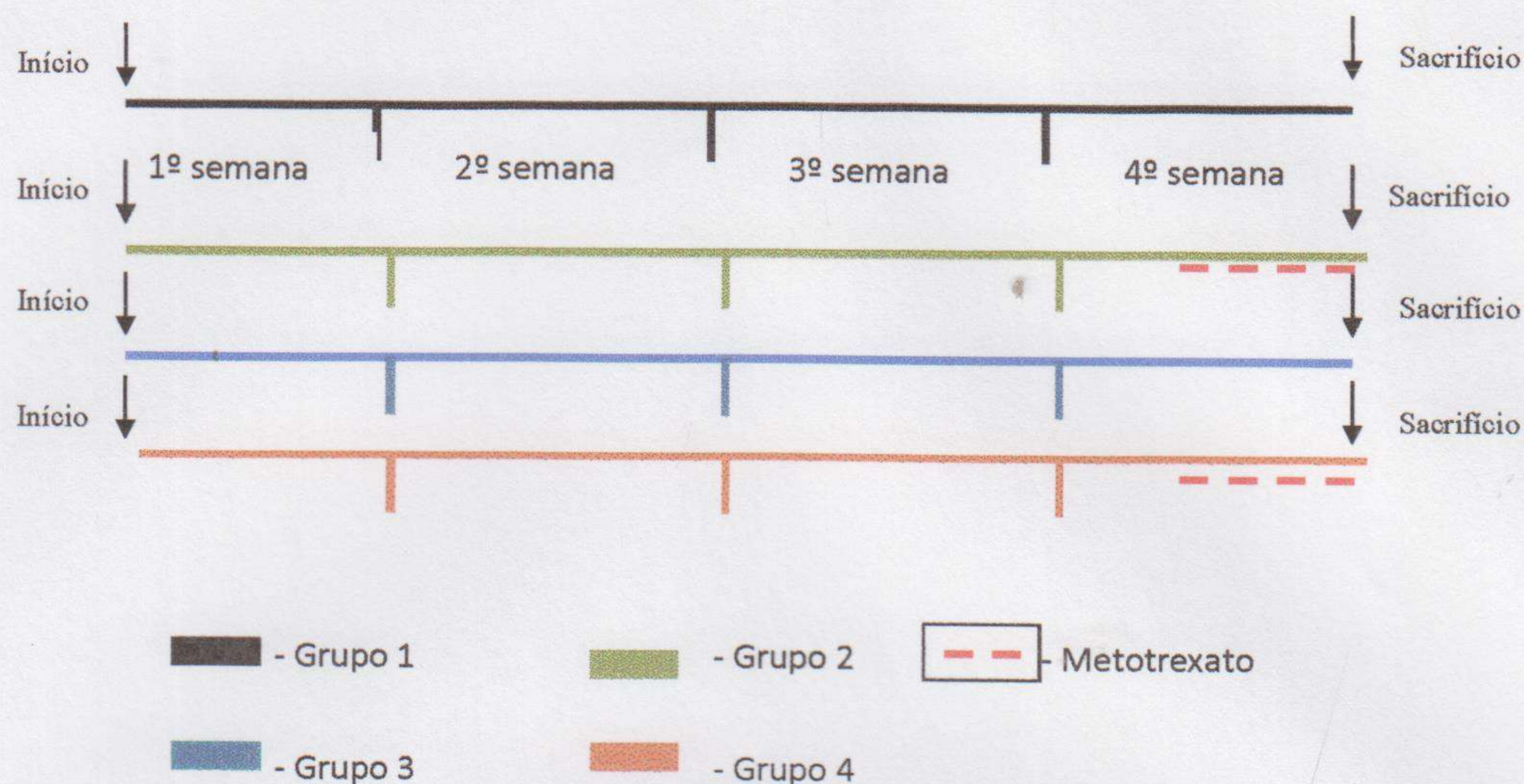


Figura 1: Desenho amostral do estudo.

Figura 1: ilustração dos protocolos de tratamento dos diferentes grupos. Grupo 1 é o grupo controle (não fez uso de suplemento e de fármaco). Grupo 2 recebeu 2,5mg/kg de Metotrexato nos 03 últimos dias do experimento por dose subcutânea e serviu como controle positivo. O grupo 3 recebeu por gavagem 0,25mL do óleo de linhaça nas 04 semanas do estudo. Grupo 4 recebeu por gavagem 0,25mL do óleo de linhaça nas 04 semanas do estudo e 2,5mg/kg de Metotrexato nos 03 últimos dias consecutivos do experimento por dose subcutânea. Todos os animais foram sacrificados 24 horas após o término da suplementação do óleo de linhaça e/ou do recebimento do metotrexato.

Para a mensuração da massa corpórea dos animais e observar a evolução ponderal, foi utilizada uma balança digital de marca Toledo, modelo 9094C/4, Brasil, 03 vezes por semana.

Ao final da 4ª semana de experimento, os animais foram sacrificados para a análise do estudo. O sacrifício foi realizado por deslocamento cervical estando os animais, previamente anestesiados, com de ketamina (130mg/Kg) e xilazina (0,3mg/Kg). Após o sacrifício dos animais para a análise histomorfométrica foram coletados 3 cm do duodeno, jejuno e íleo intestinal (CARNEIRO-FILHO, 2004; KONING et al., 2007) os mesmos foram fixados em formol a 10%. Os fragmentos foram retirados do formol e colocados em álcool 70% e posteriormente parafinizados. As lâminas foram preparadas com o material intestinal no Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. A seguir, foram realizados cortes histológicos de 5µm de espessura e foram fixados a lâminas de vidro e pré-coradas com hematoxilina e eosina. As lâminas

Grupo 3 – Grupo óleo de linhaça: administrou-se por gavagem 0,25mL/dia do óleo de linhaça durante as 04 semanas de experimento.

Grupo 4 – Grupo linhaça + mucosite, os animais deste grupo receberam 0,25mL da suplementação por gavagem com óleo de linhaça durante as 04 semanas do tratamento. A ração comercial e a oferta de água foram *ad libitum*. Este grupo foi submetido à indução da mucosite intestinal de acordo com o protocolo de mucosite nos 03 últimos dias do experimento.

A seguir a representação dos grupos no desenho amostral do estudo (Figura 1).

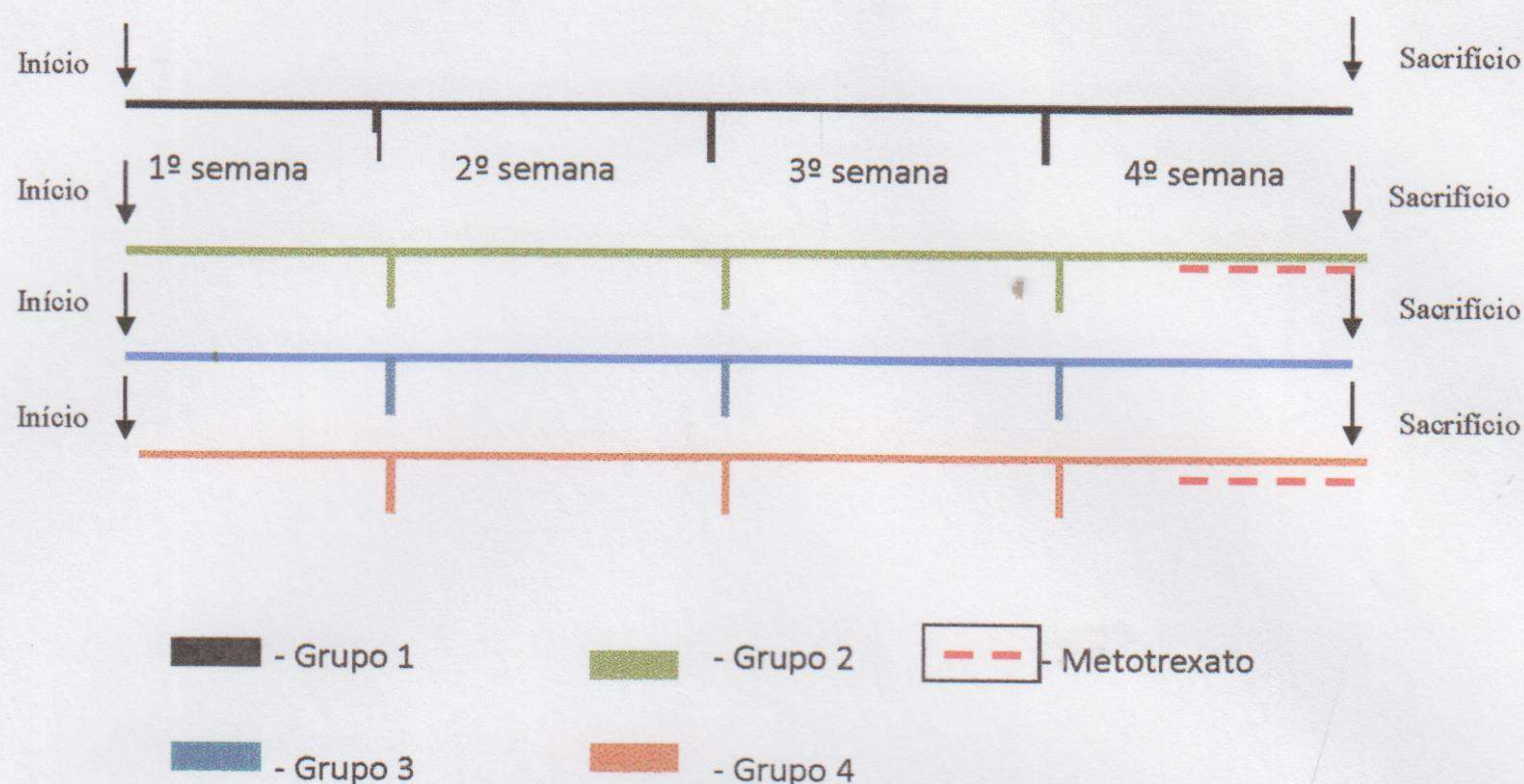


Figura 1: Desenho amostral do estudo.

Figura 1: ilustração dos protocolos de tratamento dos diferentes grupos. Grupo 1 é o grupo controle (não fez uso de suplemento e de fármaco). Grupo 2 recebeu 2,5mg/kg de Metotrexato nos 03 últimos dias do experimento por dose subcutânea e serviu como controle positivo. O grupo 3 recebeu por gavagem 0,25mL do óleo de linhaça nas 04 semanas do estudo. Grupo 4 recebeu por gavagem 0,25mL do óleo de linhaça nas 04 semanas do estudo e 2,5mg/kg de Metotrexato nos 03 últimos dias consecutivos do experimento por dose subcutânea. Todos os animais foram sacrificados 24 horas após o término da suplementação do óleo de linhaça e/ou do recebimento do metotrexato.

Para a mensuração da massa corpórea dos animais e observar a evolução ponderal, foi utilizada uma balança digital de marca Toledo, modelo 9094C/4, Brasil, 03 vezes por semana.

Ao final da 4ª semana de experimento, os animais foram sacrificados para a análise do estudo. O sacrifício foi realizado por deslocamento cervical estando os animais, previamente anestesiados, com de ketamina (130mg/Kg) e xilazina (0,3mg/Kg). Após o sacrifício dos animais para a análise histomorfométrica foram coletados 3 cm do duodeno, jejuno e íleo intestinal (CARNEIRO-FILHO, 2004; KONING et al., 2007) os mesmos foram fixados em formol a 10%. Os fragmentos foram retirados do formol e colocados em álcool 70% e posteriormente parafinizados. As lâminas foram preparadas com o material intestinal no Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. A seguir, foram realizados cortes histológicos de 5µm de espessura e foram fixados a lâminas de vidro e pré-coradas com hematoxilina e eosina. As lâminas

foram codificadas e enumeradas de acordo com os grupos em tratamento. As leituras de todas as lâminas foram realizadas em microscópio óptico com objetiva milimétrica da marca Olympus, no Departamento de Morfologia/UFRN.

As medidas da altura das vilosidades foram verificadas considerando desde o ponto de encontro entre duas vilosidades até a região apical da vilosidade mensurada (altura do vilo), e as criptas intestinais foram definidas como o ponto de encontro entre dois vilos medidos até o início da camada submucosa (FIGURA 2) (BELARMINO FILHO, 2010). Uma média dos vilos e criptas foram calculadas posteriormente através do software Excel versão 2011.

Para a padronização da leitura das lâminas, 10 vilosidades e 10 criptas adjacentes às vilosidades foram visualizadas para a sua quantificação em comprimento e profundidade respectivamente, através de uma ocular milimetrada com aproximação de 20x (MOTA, 2004).

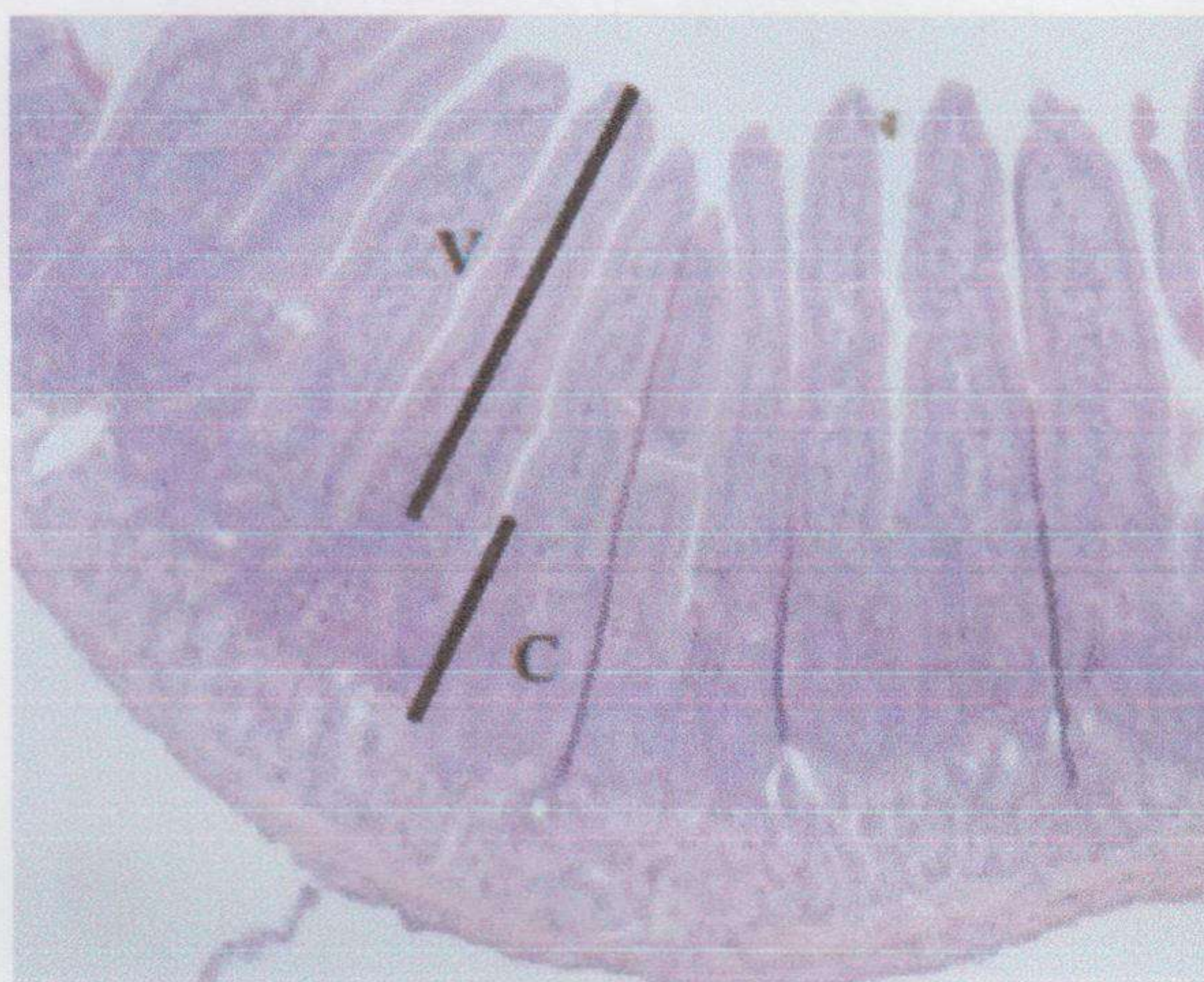


FIGURA 2: Demonstração de como é feita a medida das vilosidades e criptas intestinais (V: Vilosidades e C: Criptas).

O referido estudo foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, obedecendo-se às recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sendo aprovado de acordo com o Protocolo nº 046/2009.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado que todos os grupos apresentaram um crescimento linear da massa corporal durante as 4 semanas do experimento. O grupo controle foi o grupo que apresentou o crescimento mais elevado dentre os grupos. O grupo linhaça quando comparado ao grupo controle, não apresentou um crescimento tão elevado da massa corporal, suspeita-se a introdução do óleo de linhaça na dieta podendo ter causado uma redução no consumo de ração. O grupo mucosite nos três últimos dias de experimento, manteve o aumento de peso, já o grupo linhaça + mucosite houve uma redução peso corpóreo no período de indução da mucosite. Essa redução da massa corpórea pode estar relacionada com a dose utilizada neste experimento. A literatura mostra que algumas doses de metotrexato utilizadas para indução de mucosite intestinal não são eficazes para reduzir a massa corpórea dos animais. Estudos como o de Tran et al., (2009) utilizando dosagens de 500mg/kg de MTX como dose única e Sugiyama et al., (2010) com

dose de 1,25mg/kg/dia durante quatro dias subsequentes não promoveram alteração de peso corpóreo nos animais. (FIGURA 3).

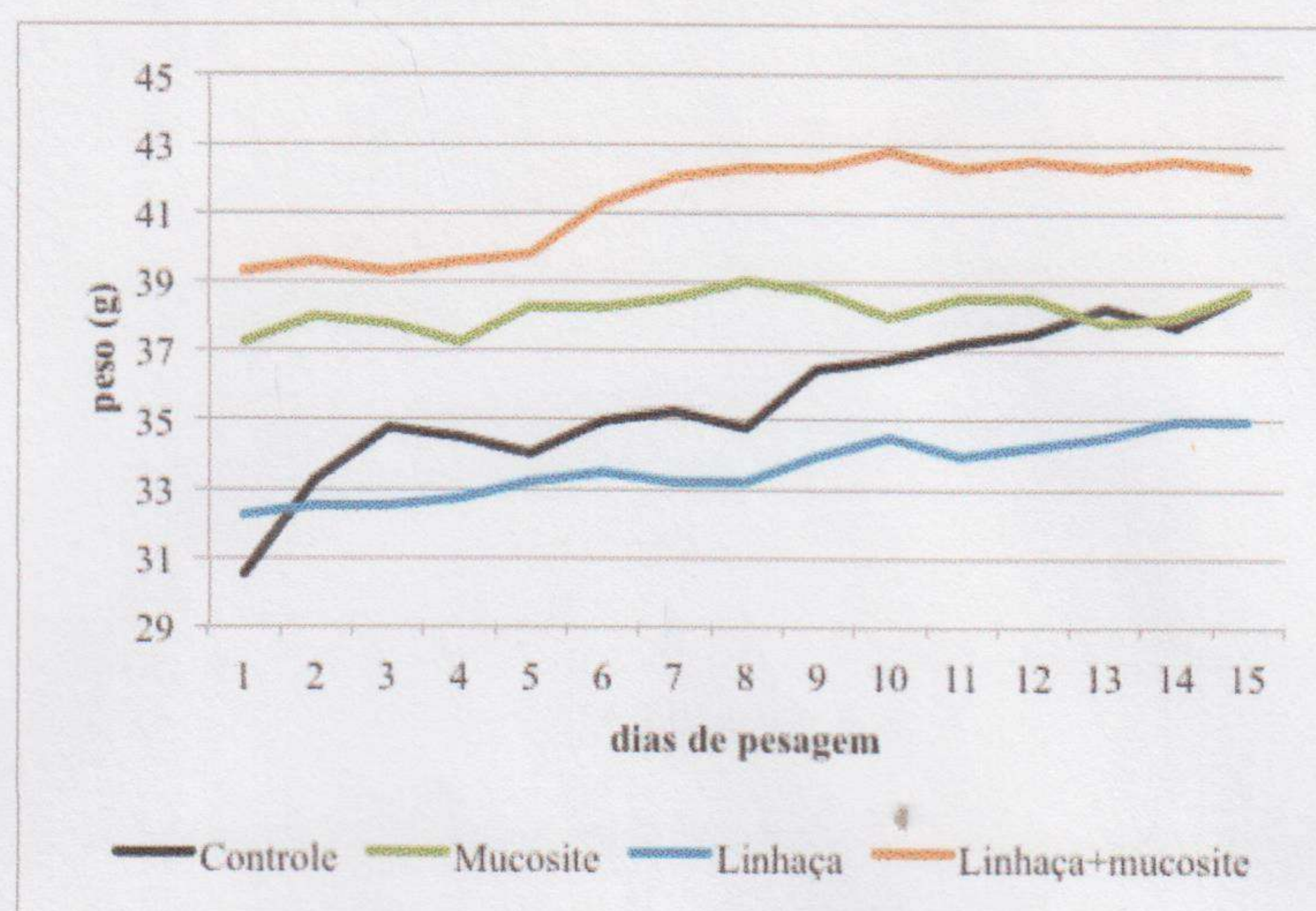


Figura 3: Comportamento do Peso de Camundongos segundo o Tratamento.

Figura 3: Efeito do tratamento com óleo de linhaça e/ou do MTX sobre a evolução da massa corporal de camundongos machos.

Com base nos resultados do grupo 1 pode-se verificar as alterações das vilosidades intestinais dos demais grupos. Foi visto que os grupos 2 e 4 os quais foram submetidos ao uso do quimioterápico sofreram atrofia de vilosidades nos seguimentos duodeno, jejuno e íleo, revelando resultados com diferentes quando comparadas ao grupo controle. O grupo 3 apresentou resultados semelhantes ao grupo 1 para todos os seguimentos. Em relação ao grupo linhaça + mucosite, observou-se que linhaça não foi capaz de prevenir os danos causados pelo fármaco. (Figura 4). Resultados semelhantes com a diminuição das vilosidades intestinais dos animais submetidos a mucosite através do MTX foram relatados por Dadhania et al (2010).

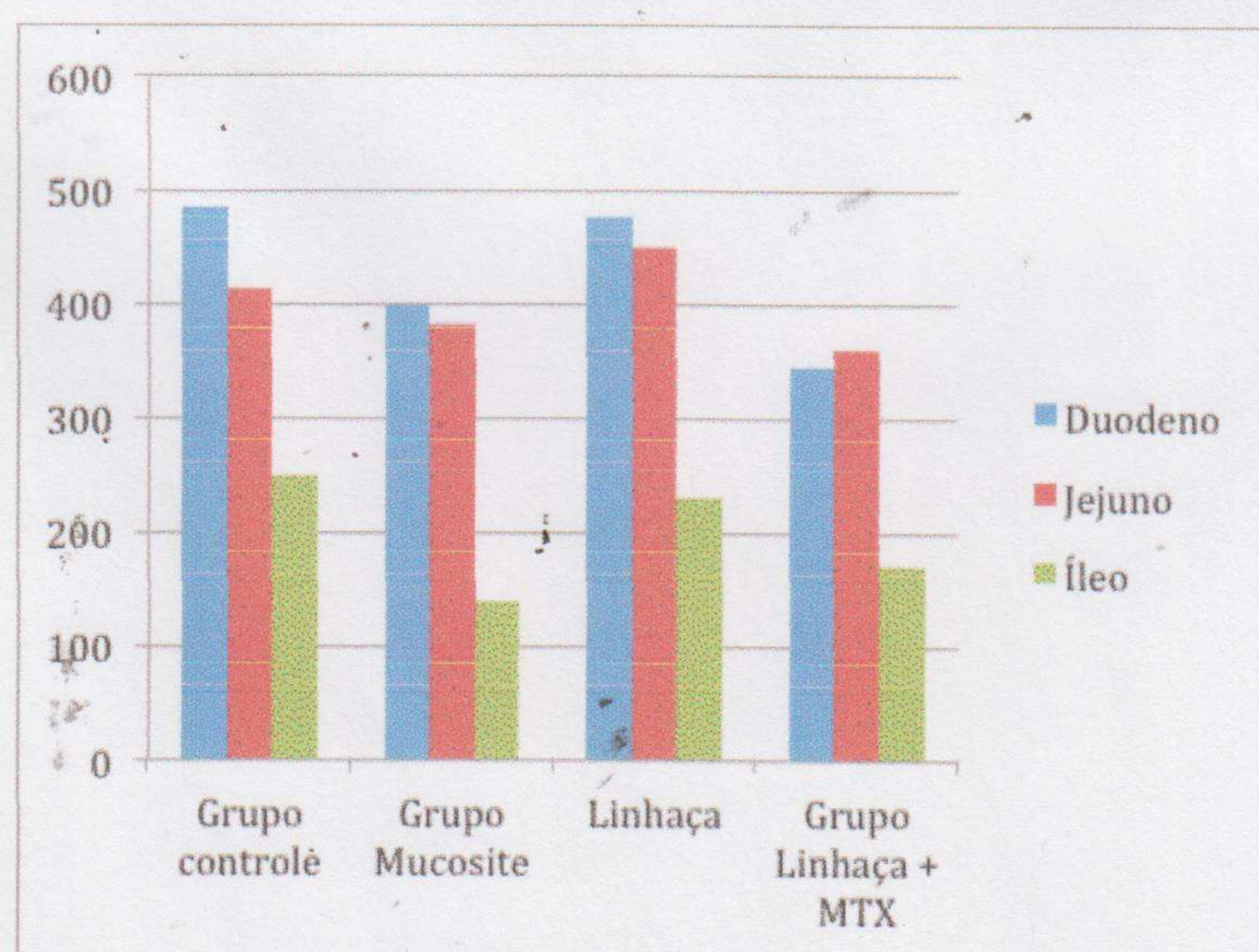


Figura 4: Média da altura das vilosidades (µm).

Quanto às criptas intestinais, o grupo mucosite não apresentou diferenças nos seguimentos duodeno e jejuno, comparando-as ao grupo controle. Já para a profundidade das criptas do íleo foi observado que estas apresentam diferenças estando menores que as criptas do grupo controle.

Observando as criptas intestinais do grupo linhaça em relação ao grupo controle podemos notar que não houve diferenças relevantes sobre as criptas no segmento duodeno. No segmento jejuno pode-se perceber um aumento da profundidade das criptas, podendo supor que o óleo de linhaça gerou um crescimento celular neste local. O crescimento das criptas é um ponto positivo pois o celular garante que e que essas células irão se diferenciar em vilosidades intestinais (ROSA et al., 2010). Todavia, o segmento íleo apresentou uma diminuição sobre a profundidade das criptas intestinais, o que pode sugerir que a suplementação não gerou estímulo celular neste segmento.

O grupo linhaça + mucosite quando comparadas ao do grupo mucosite, pode-se perceber nos segmento duodeno e íleo um aumento da profundidade nas criptas intestinais, por outro lado, no segmento jejuno as criptas não apresentaram diferenças.

Diferentemente do efeito do MTX nas vilosidades, causando dano, e visto que a linhaça não preveniu a injuria causada nos grupos nos quais foi administrado o MTX, nas criptas intestinais foi possível observar que o tratamento com óleo de linhaça com posterior uso do MTX teve efeito positivo nos segmentos duodeno e íleo, demonstrando que o óleo de linhaça promoveu um efeito protetor celular nas criptas intestinais.

Figura 5: Média de profundidade das criptas .

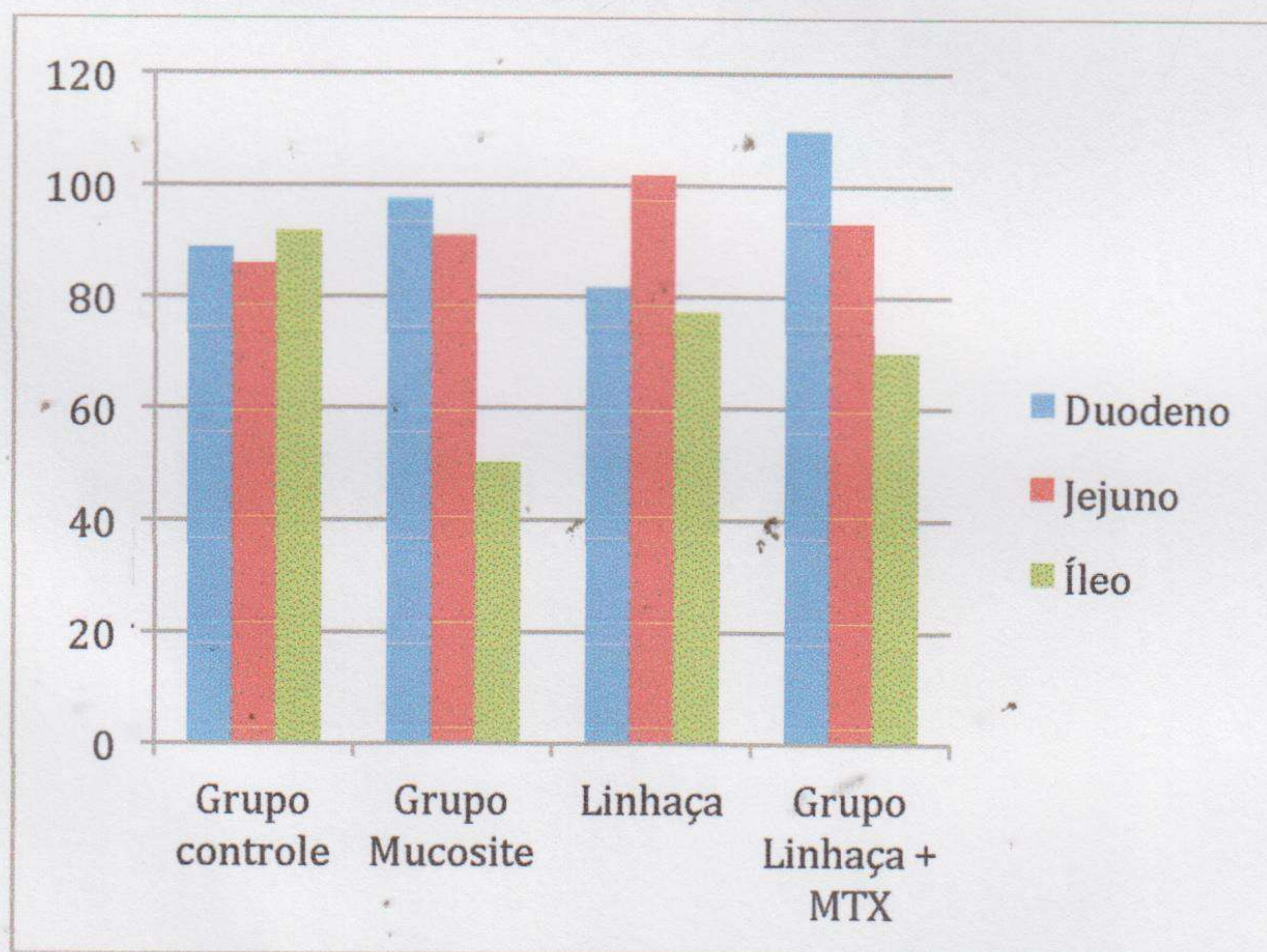


FIGURA 5: Média de profundidade das criptas (μm).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os animais apresentaram crescimento linear durante o experimento e na presença do MTX, ocorreu uma redução da massa corporal no grupo tratado.

Foi comprovado que o fármaco causou danos nas vilosidades e criptas intestinais nos segmentos do intestino delgado dos 4 grupos. Notou-se também que vilosidades do segmento íleo foi o mais afetado em todos os grupos do experimento.

A suplementação do óleo de linhaça nos animais com mucosite não preveniu os danos causados pelo quimioterápico. Porém o pré-tratamento com o óleo de linhaça promoveu a restauração das vilosidades e criptas do intestino delgado. Mais estudos e experimentos necessitam ser realizados para a comprovação. Podendo ser analisados variações de dosagem e tempo de experimento diferentes.

REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA, K. C. L; BOAVENTURA, G. T; GUZMAM-SILVA, M. A. A. Linhaça (*Linum usitatissimum*) como fonte de ácido α - linolênico na formação da bainha de mielina. **Revista de Nutrição**. 2009, v.22, n.5, p.747-754. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732009000500015&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 25 set. 2011.
2. ANDRADE, P. M. M., CARMO, M. G. T., **Ácidos graxos n-3: um link entre eicosanoides**. Mn – metabólica. Rio de Janeiro, RJ. 2006. Disponível em: <<http://www.nutricaoedesenvolvimento.com.br/images/Priscila%20de%20Mattos%20Machado%20Andrade%20MN%20Metab%20C3%B3lica%20v8n3.pdf>> Acesso em: 10 jun. 2011.
3. BELARMINO FILHO, J. N. **Modulação da resposta inflamatória com dexametasona reverte a dismotilidade gastrointestinal associada à mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos**. 2010. 90f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.
4. CAMPOS, F. G. et al. Imunonutrição em colite experimental: efeitos benéficos dos ácidos graxos ômega-3. **Arquivos de Gastroenterologia**. v. 39, n.1 p. 48-54, jan.\mar. 2002.
5. CARNEIRO-FILHO, B. A. et al. Intestinal Barrier Function and Secretion in Methotrexate – Induced Rat Intestinal mucositis. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 49, n. 1 p. 65-72, 2004.
6. ÇETIN, A.; Kaynar, L.; Kocyigit, I.; Hacıoglu, S.K.; Saraymen, R.; Ozturk, A.; Sari, i.; Sagdic, O. Role of grape seed extract on methotrexate induced oxidative stress in rat liver. **The American Journal of Chinese Medicine**, n.5, vol. 36, p. 861-872. 2008.
7. DADHANIA, V.P.; TRIPATHI, D.N.; VIKRAM, A.; RAMARAO, P.; JENA, G.B. Intervention of α -lipoic acid ameliorates methotrexate-induced oxidative stress and genotoxicity: A study in rat intestine. **Chemico-Biological Interactions**, n.183, p. 85-97. 2010.
8. FAINTUCH, J.; PORTOLOTTO, L.A.; MARQUES, P.C.; FAINTUCH, J.J.; FRANÇA, J.I.; CECCONELLO, I. Systemic inflammation and carotid diameter in obese patients: pilot comparative study with flaxseed powder and cassava powder. **Nutrición Hospitalaria**, vol. 16, n.1, p. 208-213, 2011.
9. GARÓFOLO, A., PETRILLI, A. S. Balaço entre ácidos graxos ômega-3 e 6 na resposta inflamatória em pacientes com câncer e caquexia. **Revista de Nutrição**. v. 19, n. 5, p. 611-621. set.\out. 2006.
10. KONING, B. A. E. et al. methotrexate – induced mucositis in mucin 2 – deficient mice. **Jornal of cellular physiologi**. p.144 - 152, 2007.
11. KUMAR, V. et al. Robbins & Cotran: **Patologia, Bases patológicas das doenças**. Tradução: FERNADES, P. D. et al. 8 ed. Rio de Janeiro, RJ. Elsevier, 2010.

12. LIMA, T. L. **Avaliação dos efeitos da ingestão de semente de linhaça (*Linum usitatissimum*) em ratos wistars fêmeas.** Monografia (faculdade Assis Gurgacz) 2008. Disponível em: http://www.fag.edu.br/tcc/2008/Nutri%E3o/avaliacao_dos_efeitos_da_injestao_de_semente_de_linhaca.pdf. Acesso em: 25 set. 2011.
13. MARTINS, M. B. et al. 2008. Propriedades dos ácidos graxos poli-insaturados – ômega-3 obtidos de peixes e óleo de linhaça. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde.** v. 26, n. 2, p. 153 – 156, 2008.
14. METCALF, R. G.; JAMES, M. J.; GIBSON, R. A.; EDWARDS, J. R. M.; STUBBERFIELD, J.; STUKLIS, R.; ROBERTS-THOMSON, K.; YOUNG, G. D.; CLELAND, L. G. Effects of fish-oil supplementation on myocardial fatty acids in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, n.85, p.1222-8. 2007.
15. MOLENA-FERNANDES, C. A. et al. Avaliação dos efeitos da suplementação com farinha de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) marrom e dourada sobre o perfil lipídico e a evolução ponderal em ratos Wistar. **Revista Brasileira de Planta Medicinal.** v.12, n.2, p. 201-207, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v12n2/v12n2a12.pdf>. Acesso em: 24 set. 2011.
16. MOTA, M. L. S. **Avaliação dos efeitos do agente citoprotetor amifostina na mucosite oral e disfunção da barreira intestinal:** Modelos experimentais em ratos e em pacientes portadores de câncer submetidos à quimioterapia antineoplásica. 2004. 202f. Tese (doutorado em farmacologia) – Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, 2004.
17. PINHEIRO JR., M. N., et al. Uso oral do óleo de linhaça (*Linum usitatissimum*) no tratamento do olho seco de pacientes portadores da síndrome de Sjögren. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia.** São Paulo, vol 70, n 4. 2007. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0004-27492007000400016&script=sci_arttext . Acesso em: 10 jun. 2011.
18. REHEN, C. S. et al. **Efeito do óleo de linhaça sobre a mucosa intestinal de animais submetidos à modelo de colite experimental.** Departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia e Biofísica. Instituto de Biologia - IB, UNICAMP. Departamento de Farmacologia/UNICAMP, D. F. Federação de Sociedades de Biologia Experimental-Fesbe 2010. Disponível em: http://www.fesbe.org.br/fesbe2010/FESBE2010_programa_090_810.pdf. Acesso em: 10 jun. 2011.
19. ROSA, D.D.; SALES, R.L.; MORAES, L.F.S.; LOURENÇO, F.C.; NEVES, C.A.; SABARENSE, C.M.; RIBEIRO, S.M.R.; PELUZIO, M.C.G. Flaxseed, olive and fish oil influence plasmatic lipids, lymphocyte migration and morphometry of the intestinal of Wistar rats. **Acta Cirurgica Brasileira.** n.3, v.25. 2010.

20. SUGIYAMA, A.; KIMURA, H.; OGAWA, S.; YOKOTA, K.; TAKEUCHI, T. Effects of Polyphenols from Seed Shells of Japanese Horse Chestnut (*Aesculus turbinata* BLUME) on Methotrexate-Induced Intestinal Injury in Rats. **The Journal of Veterinary Medical Science**. n.73, v.5, p. 673–678. 2010.
21. VOLPATO, L. E. R. et al. Mucosite Bucal Rádio e Químioinduzida. **Revista Brasileira Otorrinolaringologia**. vol.73 n.4. São Paulo. SP. 2007. Scielo. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0034-72992007000400017&script=sci_arttext&tlng=pt>. Acesso em: 23 set. 2011.
22. TRAN, C.D.; SUNDAR, S.; HOWARTH, G.S.; Dietary zinc supplementation and methotrexate-induced small intestinal mucositis in metallothionein-knockout and wild-type mice. **Cancer Biology & Therapy**. n.17, v. 8, p. 1662-1667. 2009.
23. VARDI, N. et al. Potent protective effect of apricot and b-carotene on methotrexate-induced intestinal oxidative damage in rats. **Food and Chemical Toxicology**, n. 46, p. 3015-3022. 2008.

TÍTULO DO ARTIGO

INTRODUÇÃO

Escreva o texto utilizando esta formatação que a diagramação da revista realizará o enquadramento em suas normas.

A HOLOS recebe artigos em português, inglês e espanhos.

A organização do texto e seu formato seguirão as presentes instruções:

O texto integral do trabalho, incluído Título, Nomes e Qualificação dos Autores, Resumo, Palavras-chave, Subtítulos, Corpo do Trabalho, Tabelas e Referências Bibliográficas. O espaçamento entre linhas deverá ser SIMPLES.

Para o corpo do trabalho, serão utilizados os seguintes formatos e alinhamentos:

- **SUBTÍTULOS** - fonte Colibri, corpo 12, negrito, alinhado à esquerda.
- **Corpo do texto** - fonte Colibri, corpo 12, justificado.
- **Tabelas** - Deverão ser numeradas seqüencialmente, referidas no texto e devem necessariamente estar inseridas no mesmo arquivo do texto do trabalho e não como anexos ou arquivos a parte, centralizadas. **Títulos de Tabela** - Deverão ser incluídos na linha imediatamente anterior à Tabela e centralizados. Utilizar fonte Colibri, corpo 12, **negrito**. Exemplo:

Tabela 1: Parâmetros e Técnicas Analíticas Utilizadas.

PARÂMETROS	TÉCNICA ANALÍTICA	UNIDADE
PH	Direto, Potenciométrico	-----
SST	Standard Methods, Gravimétrico	mg/L
SSV	Standard Methods, Gravimétrico	mg/L
DQO	Standard Methods, Refluxo Aberto	mg/L

- **Figuras/Fotografias** - Podem ser incluídas livremente. Todas as figuras, gráficos, ilustrações e fotografias deverão ser referenciadas como figuras e **devem necessariamente estar inseridas no**

mesmo arquivo do texto do trabalho, centralizadas. Deverão também ser numeradas seqüencialmente e referidas no texto do trabalho.

Título de Figura/Fotografia - Deverá ser incluído na linha imediatamente posterior a Figura e centralizado. Utilizar fonte Colibri, corpo 12, negrito. Exemplo:

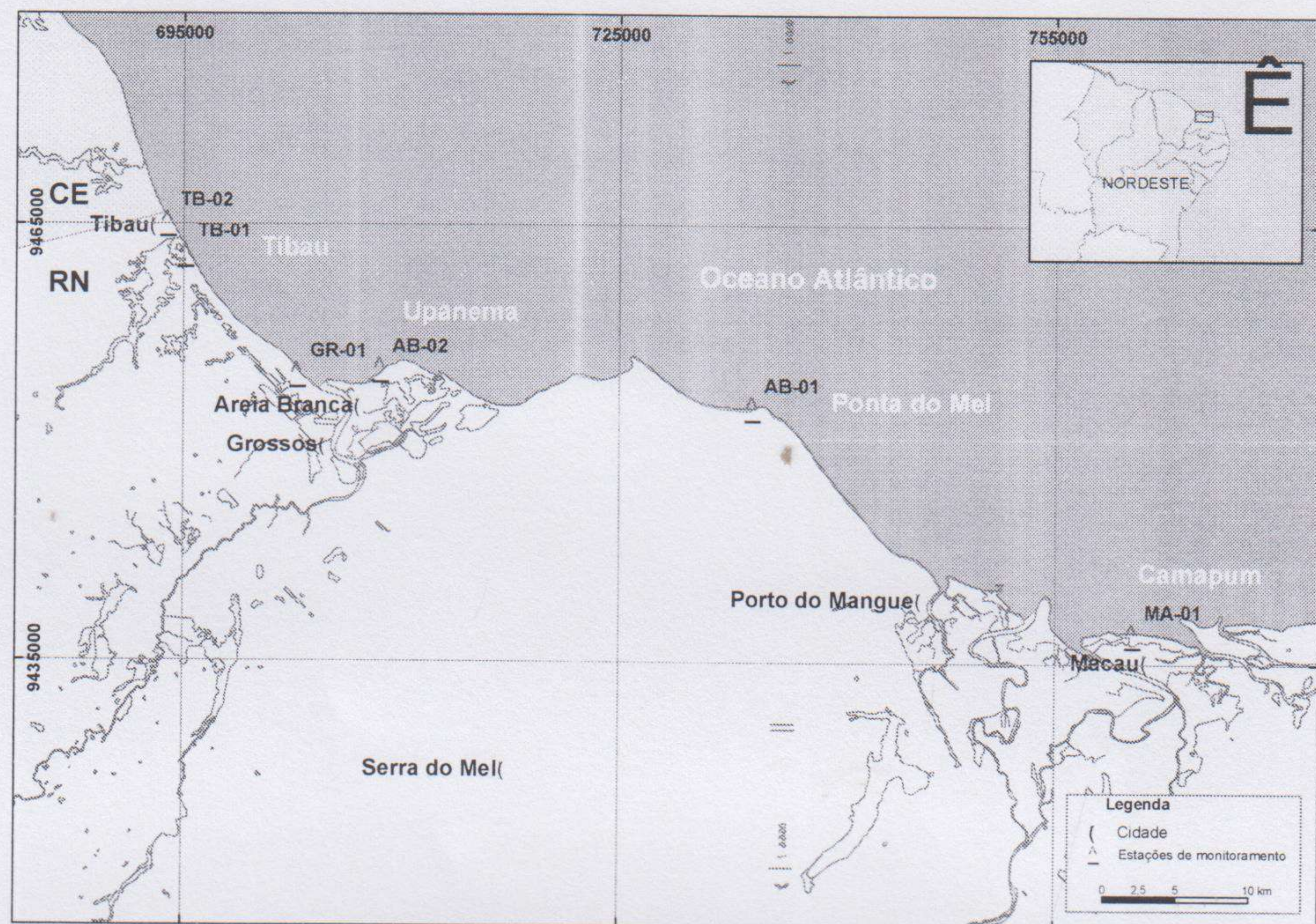


Figura 1 - Mapa mostrando a localização das estações monitoradas na Costa Norte Potiguar.

- **Fórmulas ou Equações** - Utilizar fonte Times New Roman, corpo 12, em negrito e alinhadas à esquerda. Deverão também ser numeradas seqüencialmente e referidas no texto do trabalho. Exemplo:



- **Marcadores (Bullets)** - Seu uso é permitido para dar ênfase e destaque a itens, tópicos e subitens.

O texto deverá ser cuidadosamente verificado e submetido ao corretor ortográfico, no idioma nativo, visando minimizar o trabalho de edição da equipe de produção. Os termos normalmente grafados em itálico poderão ser tanto formatados em itálico quanto sublinhados. **Serão aceitos entrelinhamentos diferenciados para destacar parágrafos ou itens com marcadores.**

Ao final do texto deverão aparecer as **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**, utilizando fonte Colibri, **corpo 12**, alinhamento de parágrafo justificado e espaçamento de parágrafo de 6 pontos (depois). No início de cada item bibliográfico deverá ser usado um marcador de numeração crescente, com **Posição do Número:** esquerdo, **Alinhado em:** 0 cm e distância de recuo de texto **Recuar em:** 0,6 cm. Exemplo:

1 linhas em branco

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARORA, M.L., BARTH, E., UMPHRES, M.B. Technology evaluation of sequencing batch reactors. Journal Water Pollution Control Federation, v.57, n.8, p. 867-875, ago. 1985.
2. DATAR, M.T., BHARGAVA, D.S. Effects of environmental factors on nitrification during aerobic digestion of activated sludge. Journal of the Institution of Engineering (India), Part EN: Environmental Engineering Division, v.68, n.2, p.29-35, Feb. 1988.
3. FADINI, P.S. Quantificação de carbono dissolvido em sistemas aquáticos, através da análise por injeção em fluxo. Campinas, 1995. Dissertação de mestrado-Faculdade de Engenharia Civil-Universidade Estadual de Campinas, 1995.