



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

GUSTAVO APARECIDO DOS SANTOS

**“DIETÔMICA: A NOVA FERRAMENTA PARA ANÁLISE DE DIETAS E  
INCORPORAÇÃO DE NUTRIENTES EM NÍVEL CELULAR.”**

**“DIETOMICS: THE NEW TOOL FOR ANALYSIS OF DIETS AND  
INCORPORATION OF NUTRIENTS IN CELL LEVEL.”**

CAMPINAS  
2016

GUSTAVO APARECIDO DOS SANTOS

“DIETÔMICA: A NOVA FERRAMENTA PARA ANÁLISE DE DIETAS E  
INCORPORAÇÃO DE NUTRIENTES EM NÍVEL CELULAR.”

“DIETOMICS: THE NEW TOOL FOR ANALYSIS OF DIETS AND  
INCORPORATION OF NUTRIENTS IN CELL LEVEL.”

**ORIENTADOR:** PROF. DR. RODRIGO RAMOS CATHARINO

**COORIENTADOR:** PROF. DR. LÍCIO AUGUSTO VELLOSO.

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas como parte dos  
requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em  
Ciências.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL  
DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO GUSTAVO  
APARECIDO DOS SANTOS, ORIENTADO PELO PROF.  
DR. RODRIGO RAMOS CATHARINO E COORIENTADO  
PELO PROF. DR. LICIO AUGUSTO VELLOSO.

CAMPINAS

2016

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** CAPES, Não se aplica

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Santos, Gustavo Aparecido dos, 1989-  
Sa59d Dietômica : a nova ferramenta para análise de dietas e incorporação de nutrientes a nível celular / Gustavo Aparecido dos Santos. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Rofrigo Ramos Catharino.

Coorientador: Licio Augusto Velloso.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Dieta. 2. Espectrometria de massas. 3. Azeite de oliva extra virgem. 4. Esteato hepatite não alcoólica. 5. Ômicas. I. Catharino, Rodrigo Ramos, 1977-. II. Velloso, Licio Augusto, 1963-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

#### Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Dietomics : the new tool for analysis os diets and incorporation of nutrients in cell level

**Palavras-chave em inglês:**

Diet

Mass spectrometry

Extra virgin olive oil

Non-alcoholic fatty liver disease

Omics

**Área de concentração:** Fisiopatologia Médica

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:**

Rodrigo Ramos Catharino

Estela de Oliveira Lima

Andressa Coope dos Santos

Juliana Contin Moraes Garotti

Josué de Moraes

**Data de defesa:** 15-12-2016

**Programa de Pós-Graduação:** Fisiopatologia Médica

---

## **BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO**

**GUSTAVO APARECIDO DOS SANTOS**

---

**ORIENTADOR: RODRIGO RAMOS CATHARINO**

**COORIENTADOR: LICIO AUGUSTO VELLOSO**

---

### **MEMBROS:**

**1. PROF. DR. RODRIGO RAMOS CATHARINO**

**2. PROF. DR. ESTELA DE OLIVEIRA LIMA**

**3. PROF. DR. ANDRESSA COOPE DOS SANTOS**

**4. PROF. DR. JULIANA CONTIN MORAES GAROTTI**

**5. PROF. DR. JOSUÉ DE MORAES**

---

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Medica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

**Data: 15 de dezembro de 2016**

# DEDICATÓRIA

À minha família,  
amigos e conselheiros,  
dedico esse trabalho e agradeço  
pelo incentivo e confiança em todos os momentos da minha vida.

"Que seu remédio seja seu alimento, e que seu alimento seja seu remédio"

**Hipócrates**

"Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo só depende de nossa vontade e perseverança."

**Albert Einstein**

## **AGRADECIMENTOS:**

Agradeço a Deus, a minha família a todos os meus amigos que me auxiliaram na minha trajetória até aqui, agradeço aos meus amigos do laboratório INNOVARE de Biomarcadores em especial ao grande professor Rodrigo Ramos Catharino por ser um grande amigo e mestre que sempre me mostrou as melhores formas de encontrar as respostas para as perguntas que nortearam a minha vida profissional e por sempre se preocupar comigo, por me auxiliar e motivar (“só alegria!!”, grato por tudo, professor!!!) , agradeço ao Diogo Noin de Oliveira por ser um grande amigo que sempre me auxiliou no aprendizado no manuseio dos espectrômetros de massas e por todos os momentos de amizade e descontração, muito obrigado por tudo Diogão!. Agradeço a Monica Siqueira Ferreira pela sua grande ajuda no artigo e pelos momentos alegres no laboratório. Agradeço aos meus amigos do laboratório Tatiane M. Guerreiro, Fernando Melo, Cibele Z. Esteves, Estela Lima, Maico de Menezes, Matheus Pavani, Jeany Delafori e tudo os outros integrantes do laboratório INNOVARE de Biomarcadores. Agradeço ao Laboratório de Sinalização Celular (LabSincel) e aos seus pesquisadores e alunos, agradeço em especial ao meu co-orientador Licio Augusto Velloso que sempre acreditou em mim e me motivou a ser um bom pesquisador, desde os tempos do mestrado na unicamp, agradeço a bióloga Erika por ser uma amiga/irmã que sempre me auxiliou, orientou e estimulou, Erika a você o meu muito obrigado por tudo. Agradeço imensamente ao meu grande amigo, colaborador, mestre e parceiro professor Dennys Esper Cintra. Dennys, muito obrigado pela ajuda, discussões científicas, amizade de todos os anos, conversas e auxílio nas decisões da minha vida, muito obrigado meu amigo!. Agradeço aos alunos do professor Dennys E. Cintra, Alexandre Moura e Vanessa de Oliveira, a vocês agradeço pela companhia e colaboração nos experimentos, que foram imprescindíveis, para o meu trabalho; os frutos dessa amizade e colaboração se reflete nos nossos artigos publicados, obrigado galera!. A todos que participaram da minha história na Unicamp o meu muito obrigado por tudo!!!

## **AGRADECIMENTOS:**

Agradeço a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior ou formação de pessoal), CNPq e INCT (National ciência e Institutos de Tecnologia) pelo apoio financeiro.



## RESUMO

A obesidade é um processo fisiopatológico que se manifesta de forma pandêmica, principalmente nos países ocidentais e industrializados. O consumo excessivo de ácidos graxos possui relação direta com o desenvolvimento da obesidade e suas comorbidades. A Esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) é uma doença associada à obesidade caracterizada pelo acúmulo de gordura no fígado apresentando um quadro inflamatório. Já é bem evidenciado que o azeite de oliva extra virgem possui importantes funções neuroprotetoras, hepatoprotetoras, anti-inflamatórias e antioxidantes. Em nosso trabalho propomos uma dieta suplementada com azeite de oliva extra virgem para avaliar a sua ação sobre a EHNA. Foram utilizados camundongos machos tratados por 16 semanas com três diferentes tipos de dietas isocalóricas: controle (CT), dieta hiperlipídica (HFD) e dieta hiperlipídica suplementada com azeite de oliva extra virgem (HSO). Após tratamento com os diferentes tipos de dietas os fígados foram extraídos para avaliação morfológica, histológica, isolamento de mitocôndrias e análises em espectrometro de massas com ionização electrospray (ESI-MS). Os resultados morfológicos, histológicos e de espectrometria de massas indicaram uma redução do quadro de EHNA no grupo de animais que receberam HFSO quando comparado com o grupo que receberam HFD. Os dados de espectrometria por ESI-MS mostraram a incorporação de alguns compostos provenientes das dietas nos tecidos e na fração mitocondrial hepática dos animais como ácidos graxos e compostos fenólicos. O consumo de azeite de oliva extra virgem demonstrou ações benéficas frente à EHNA com a incorporação de importantes compostos fenólicos como a Oleuropeína aglicona na fração mitocondrial. Nossos resultados estão de acordo com a proposição de que o principal fator que influencia diferentes respostas as dietas é a sua composição, e não apenas as calorias especialmente quando se trata de estudos sobre obesidade.

**Palavras chaves:** Dieta / Espectrometria de massas / Azeite de oliva extra virgem / Esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) / Omicas.

## ABSTRACT

Obesity is a disease that is growing from pandemic in western and industrialized countries. The consumption of large amounts of fatty acids has a direct relationship with the development of obesity and its comorbidities. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is a disease associated with obesity characterized by accumulation of fat in the liver and an inflammatory condition. It is already known that extra virgin olive oil has important neuroprotective, hepatoprotective, anti-inflammatory and antioxidant functions. In our work we propose a diet supplemented with extra virgin olive oil to evaluate its action on NASH. Male mice treated with three different types of isocaloric diets were used: control (CT), hyperlipid diet (HFD) and hyperlipid diet supplemented with extra virgin olive oil (HSO). After treatment with the different types of diets the livers were removed histological analysis, isolation of mitochondria and mass spectrometry with electrospray ionization (ESI-MS). Morphological, histological, and mass spectrometry results indicated a reduction of NASH in the group of animals receiving HFSO when compared to the group receiving HFD. ESI-MS spectrometry data showed the incorporation of some compounds from the diet into the tissues and in the hepatic mitochondrial fraction of the animals as fatty acids and phenolic compounds. The consumption of extra virgin olive oil demonstrated therapeutic actions against NASH with the incorporation of important phenolic compounds such as Oleuropein aglycone in the mitochondrial fraction. Our results are in line with the proposition that the main factor influencing different responses to diets is their composition, not just the calories, especially when it comes to obesity studies.

**Keywords:** Diet / Mass spectrometry / Extra virgin olive oil / Nonalcoholic steatohepatitis / Omics.

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>DIETOMICS</b> .....	26
<b>Figure 1.</b> Liver extracted of mice and liver slices stained with H&E (x400). Control mice (A and D), mice submitted to HFD (B and E), and or HFSO (C and F). Ballooned hepatocytes (arrow) and fat vacuoles (arrowhead) caused by HFD were observed in HFSO. (G) Comparison between liver weight of CT, HFD and HFSO mice. ....	34
<b>Figure 2.</b> Principal component analysis of (A) mice liver extract in negative ion mode, (B) mice liver extract in positive ion mode and (C) mitochondria-enriched fraction in negative ion mode. Ion chemical markers of each group separated by principal component analysis (n = 8/group). The explained variances (X-expl) are shown on inferior part of the figure.....	35
<b>Figure S1.</b> Representative fingerprinting spectra of (A) standard rodent chow, (B) whole liver extract of CT mice, (C) mitochondria-enriched fraction of CT mice. Negative ion mode.....	36
<b>Figure S2.</b> Representative fingerprinting spectra of (A) lard, (B) HFD, (C) whole liver extract of HFD mice, (D) mitochondria-enriched fraction of HFD mice. Negative ion mode.....	37
<b>Figure S3.</b> Representative fingerprinting spectra of (A) EVOO, (B) HFSO, (C) whole liver extract of HFSO mice, (D) mitochondria-enriched fraction of HSO mice. Negative ion mode.....	38
<b>Figure S4.</b> Representative fingerprinting spectra of (A) standard rodent chow, (B) whole liver extract of CT mice. Positive ion mode.....	39
<b>Figure S5.</b> Representative fingerprinting spectra of (A) lard, (B) HFD, (C) whole liver extract of HFD mice. Positive ion mode.....	40
<b>Figure S6.</b> Representative fingerprinting spectra of (A) EVOO, (B) HFSO, (C) whole liver extract of HFSO mice. Positive ion mode. ....	41

## LISTA DE TABELAS

**Table 1.** Macronutrient composition of experimental diets (g/kg).....42

**Table 2.** Lipid chemical markers identified via DIGS-MS.....43

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AG</b>	Ácidos graxos
<b>CT</b>	Control (controle)
<b>DHGNA</b>	Doença hepática gordurosa não alcoólica
<b>EHNA</b>	Esteato-hepatite não alcoólica
<b>EROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>ESI</b>	Ionização por spray de elétrons
<b>EVOO</b>	Extra virgin olive oil (Azeite de oliva extra virgem)
<b>HFD</b>	High Fat Diet (Dieta hiperlipídica)
<b>HFSO</b>	HFD Suplementada “acrescida” com 10% de Extra Virgin olive oil
<b>LLH</b>	Ácido Linoleico, Ácido Linoleico, Ácido Heneicosanoico
<b>LLL</b>	Ácido Linoleico, Ácido Linoleico, Ácido Linoleico
<b>LM</b>	Ácido Laurico, Ácido Margarico
<b>MALDI</b>	Dessorção a laser assistida por matriz
<b>MS</b>	Espectrometria de massas
<b>MSI</b>	Espectrometria de massas por imagem
<b>MUFA´s</b>	Ácidos graxos monoinsaturados
<b>m/z</b>	Relação massa/carga
<b>OB</b>	Obeso
<b>OOO</b>	Ácido oleico, Ácido oleico, Ácido oleico
<b>PCA</b>	Principal Component Analysis
<b>PLL</b>	Ácido Palmítico, Ácido Linoleico, Ácido Linoleico
<b>POL</b>	Ácido Palmítico, Ácido Oleico, Ácido Linoleico
<b>POO</b>	Ácido Palmítico, Ácido Oleico, Ácido Oleico
<b>PP</b>	Ácido Palmítico, Ácido Palmítico
<b>PUFA´s</b>	Ácidos graxos Poli-insaturados
<b>SC</b>	Standard Chow (SC) (ração padrão)
<b>TAGs</b>	Triacilglicerol

## Sumário

Introdução .....	17
Espectrometria de massas .....	20
ESI-MS .....	20
Reações de Fragmentação (MS) .....	21
Metabolômica .....	21
Dietômica .....	23
Objetivo geral .....	25
Objetivos específicos .....	25
CAPITULO I .....	26
Identification of compounds from high-fat and extra virgin olive oil-supplemented diets in whole mouse liver and mitochondrial extracts using mass spectrometry ....	27
Introduction.....	28
Materials and methods .....	29
Results .....	31
Discussion .....	44
Conclusion .....	45
Acknowledgements .....	47
Competing financial interests .....	47
Referencias – Artigo .....	48
Referencias – Introdução .....	51
Anexo 1 (Protocolo Comissão de Ética no uso de Animais) .....	59
Anexo 2 (Permissão do uso do artigo) .....	62
Anexo 3 (Declaração de permissão de uso do artigo na tese e respeito ao direito autoral transferido à editora) .....	65

## INTRODUÇÃO

O comportamento alimentar é um dos principais fatores que influenciam diretamente a saúde humana <sup>1</sup>. A obesidade é uma doença de fundo genético e/ou comportamental que tem ligação direta com a ingestão incorreta de alguns tipos de nutrientes, como os ácidos graxos e carboidratos <sup>1-2</sup>. A obesidade vem tomando proporções pandêmicas que agravam a saúde pública mundial em todas as faixas etárias <sup>1a</sup>. Já é bem caracterizado que a ingestão excessiva de carboidratos e gorduras promove o aumento do peso corpóreo, dislipidemias, hiperfagia, doenças cardiovasculares, resistência à insulina, risco cardiometabólico, diabetes mellitus tipo 2 e doenças hepáticas como a esteatose hepática e esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) <sup>1a, 3</sup>.

A esteatose hepática é caracterizada pela presença de ectópicos de gordura no parênquima hepático na forma de triacilgliceróis <sup>4</sup>. Inicialmente a esteatose hepática é um estado transitório e benigno facilmente reversível (Meli et al., 2013). Contudo a ingestão excessiva de ácidos graxos e seu armazenamento na forma de triacilgliceróis no fígado, promove a degeneração dos hepatócitos onde estes perdem a estrutura poliédrica ficando em formato de balão (Vial et al., 2011), concomitante a esse processo se estabelece o quadro de inflamação tecidual com presença de citocinas pró-inflamatórias que podem levar a progressão de esteatose hepática simples para a EHNA <sup>5</sup>. A esteato-hepatite não alcoólica ou NASH do inglês “Nonalcoholic Steatohepatitis” é um conjunto de quadros multifatoriais, poligênicos e fisiopatológicos, caracterizada pela integração de processos inflamatórios e acúmulo de triacilgliceróis no fígado. Na EHNA o acúmulo de ácidos graxos nos hepatócitos favorece a lipogênese e inibe a oxidação (lipólise), corroborando o aumento excessivo do aporte de ácidos graxos (AG) e o acúmulo de triacilgliceróis no fígado <sup>5a, 6</sup>

É conhecido que diferentes condições metabólicas e nutricionais podem participar do controle do metabolismo hepático promovendo estímulos para anabolismo ou catabolismo <sup>5a, 7</sup>. O principal mecanismo de catabolismo de lipídeos no fígado é a  $\beta$ -oxidação mitocondrial, que tem por finalidade gerar energia a partir da oxidação mitocondrial de ácidos graxos <sup>4c, 7</sup>.

Durante o processo da  $\beta$ -oxidação nas mitocôndrias ocorre à formação de espécies reativas de oxigênio (EROS), que podem promover ações deletérias quando

estão em altas concentrações no organismo, como a peroxidação lipídica gerando também intermediários metabólicos com ações inflamatórias no fígado <sup>7</sup>.

Já é bem conhecido que o consumo de dieta rica em ácidos graxos saturados promove o aumento de citocinas pró-inflamatórias como, fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ), Interleucina tipo 6 (IL6) e Interleucina tipo-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) <sup>2, 5c, 8</sup>. Estudos do nosso grupo tem demonstrado que ácidos graxos saturados oriundos da dieta além de promover desordens no tecido hepático (Cintra et al., 2008) tem a capacidade de ativar processos inflamatórios no hipotálamo, uma importante região do sistema nervoso central, que regula o controle da ingestão alimentar (De Souza et al., 2005; Milanski et al., 2012).

Os ácidos graxos saturados, láurico (C12:0), místico (C14:0), palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0) tem a capacidade de ativar processos inflamatórios sistêmicos através da sua ligação a um receptor celular transmembrana que participa da resposta inflamatória a patógenos denominados Toll Like Receptor 4 (TLR4), que é um receptor membro da família dos receptores da interleucina-1 (IL-1R) <sup>2</sup>. O TLR4 responde a partículas potencialmente patogênicas como porções lipídicas presentes na parede de bactérias como os lipopolissacarídeos (LPS) (Kawai & Akira, 2006; Santos et al., 2013). O receptor TLR4 é amplamente encontrado em diversos órgãos como o tecido adiposo, fígado, baço e pâncreas e no sistema nervoso central (SNC) <sup>2, 9</sup>.

Atualmente na dieta ocidental pela influência da mídia e da indústria de alimentos apresenta alimentos altamente palatáveis, calóricos e ricos em gorduras saturadas <sup>2, 10</sup>. A ingestão desses alimentos altamente calóricos estabelece o quadro de obesidade, EHNA e distúrbios no controle da fome e saciedade <sup>11</sup>. Por esse motivo, profissionais da área da saúde ligados à área de alimentos e nutrição estão desenvolvendo novas metodologias para o controle da massa corpórea e diminuição do consumo de lípidos (Finelli & Tarantino, 2012). Na atualidade existem diferentes tipos de dietas que visam reeducar o status corpóreo além de atribuir ações protetoras ao organismo com é exemplo da dieta mediterrânea <sup>12</sup>.

A ingestão do azeite de oliva extra virgem (do inglês, Extra virgin olive oil - EVOO) é um dos principais fatores benéficos observados na dieta mediterrânea, porque além de possuir elevada concentração de MUFA's como o ácido oleico (18:1),



apresenta em sua constituição os compostos fenólicos que possuem importantes ações antioxidantes e protetoras <sup>1a, 13</sup>.

Os compostos fenólicos garantem uma elevada estabilidade ao EVOO por suas características químicas de capturar elétrons e estabilizar moléculas instáveis (Wang et al., 2014. Características estas que também estão ligadas aos efeitos benéficos após a ingestão do EVOO exercendo efeitos antiaterogênicos, neuroprotetores, hepatoprotetores, anti-inflamatórios, anticarcinogênicos <sup>11b, 13-14</sup>. Tais efeitos podem estar relacionados à ação antioxidante pelo combate da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), que por sua vez, contribui para a redução do estresse oxidativo comum em doenças hepáticas, neurodegenerativas, entre outras <sup>4c, 11b, 11c, 12, 14</sup>.

Os compostos fenólicos encontrados no azeite de oliva extra virgem são os carotenóides (tocoferóis) e compostos fenólicos hidrofílicos (álcoois e ácidos fenólicos, flavonóides, lignanos e secoiridóides). Os secoiridóides são os antioxidantes mais abundantes no EVOO e vêm despertando uma atenção especial pelas suas importantes atividades antioxidantes. Dentre os secoiridóides que têm mostrado maior atividade protetora estão o oleocanthal e a oleuropeína <sup>5b, 11b, 14-15</sup>.

A Oleuropeína é uma molécula resultante da esterificação do hidroxitirosol-fenol com o álcool elenólico, ela e seus derivados o 3,4- DHPEA-EDA e o 3,4-DHPEA-EA desempenham importantes efeitos protetores antioxidantes relacionados ao EVOO <sup>16</sup>.

Sabe-se que o consumo de EVOO promove ações benéficas após a sua ingestão <sup>4a, 14, 16</sup>, todavia não são bem compreendidos quais são os mecanismos exatos que promovem os efeitos antioxidantes e como se dá a incorporação tecidual, celular dos compostos fenólicos do azeite de oliva extra virgem. É conhecido que o consumo de alguns tipos de dietas, pode influenciar a composição tecidual de alguns órgãos<sup>4a, 6a, 11d, 13</sup>.

Interessantemente, cresce o uso de plataformas analíticas para avaliação de moléculas orgânicas presentes nos alimentos e nos tecidos, com o objetivo de caracterização, elucidação das estruturas químicas, acompanhamento da absorção e incorporação no organismo. Intrinsecamente ligada as plataformas analíticas está a ferramenta analítica espectrometria de massas, ferramenta bem consolidada pelo seu alto grau de sensibilidade e exatidão<sup>17a, 18-19</sup>..

## **Espectrometria de massas**

A espectrometria de massas é uma técnica analítica consolidada no âmbito da análise qualitativa e quantitativa de moléculas químicas e orgânicas. Ela é uma das técnicas analíticas de alto grau importância, pois permitiu a elucidação da estrutura química de compostos desconhecidos e a quantificação de moléculas conhecidas em misturas complexas <sup>17</sup>. A espectrometria de massas fornece informações valiosas para profissionais de diversas áreas: químicos, biólogos, farmacêuticos, físicos, astrônomos entre outros. A aplicação da espectrometria de massas na área de análise de alimentos e amostras biológicas traz grandes contribuições para a área da saúde <sup>18</sup>. Dentre as técnicas de ionização dentro da espectrometria de massas, encontramos ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) e a ionização por spray de elétrons (ESI) que atualmente ganham destaque por sua rapidez e fácil preparo das amostras para análise <sup>17a, 18-19</sup>.

### **ESI-MS:**

A ionização electrospray ou ionização por spray de elétrons (ESI) é considerada uma técnica de ionização branda <sup>19</sup>. O processo de ionização por spray de elétrons forma moléculas carregadas positivamente ou negativamente. Isso depende do tipo de solução na qual a amostra se encontra: soluções ácidas favorecem a formação de cátions e soluções negativas, ânions <sup>19-20</sup>. Os íons são formados em solução, que é submetida a um spray eletrolítico de um alto campo elétrico (4000V) sob pressão atmosférica que oxida os íons negativos, deixando as gotas produzidas no spray com excesso de íons positivos (ESI positivo), ou através da redução dos íons positivos, respectivamente aumentando os íons negativos (ESI negativo) <sup>19-20</sup>. O feixe de íons é colimado, formando o “cone de Taylor” e, através de contra-corrente de nitrogênio, o solvente começa a ser evaporado e o volume das gotas começa a ser gradativamente reduzido. Ocorre então repulsão crescente entre íons de mesma carga, com possível subdivisão (decomposição) das gotas, e estes íons são eventualmente transferidos para a fase gasosa em um processo brando e eficaz chamado de dessolvatação. A partir desta etapa, operam os processos normais de

análise, seleção e detecção de íons na fase gasosa por reações de fragmentação, denominadas “MS”<sup>19-21</sup>.

### **Reações de Fragmentação (MS):**

A ferramenta que auxilia a elucidação estrutural dos compostos são as reações de fragmentação de íons na espectrometria de massas, também chamadas de MS/MS ou espectrometria de massas em *tandem*<sup>17a</sup>. Diversos instrumentos contem essa função, especialmente os híbridos, equipamentos com dois ou mais tipos de analisadores combinados. Exemplos são os analisadores de massas do tipo triplo quadrupolo (QqQ), quadrupolo-*ion trap* (LTQ) ou mesmo quadrupolo-*time-of-flight* (qTOF)<sup>19, 22</sup>. Nesse tipo de experimento, seleciona-se um íon precursor de *m/z* conhecida e este é fragmentado pela colisão com átomos de um gás inerte (He, Ar), gerando íons-produtos. Esses, por sua vez, auxiliam na elucidação da estrutura do íon precursor, pelo padrão de fragmentação da molécula. Através da elucidação das estruturas químicas, podemos caracterizar e avaliar o grau de importância que cada molécula possui no metabolismo, determinando os metabolitos, as vias e suas ações orgânicas<sup>23</sup>. Uma importante plataforma analítica que integra os conhecimentos da análise de metabolitos é metabolômica.

### **Metabolômica**

A metabolômica é uma importante plataforma para o estudo de mecanismos, identificação e elucidação de biomarcadores “marcadores químicos” existentes nos organismos. A metabolômica corresponde à análise das moléculas do metaboloma<sup>24</sup>. O metaboloma é o conjunto dos produtos resultante do metabolismo orgânico, caracterizado pelo estudo, identificação e quantificação das moléculas de baixo peso molecular. Moléculas essas, geradas pelo metabolismo primário e intermediário em tecidos ou conjunto de células específicas<sup>23-24</sup>.

A metabolômica permite o estudo dos processos bioquímicos, celulares e moleculares e o aumento da compreensão dos sistemas biológicos através de ferramentas analíticas<sup>25</sup>. Assim como a metabolômica, outras plataformas denominadas por “Ômicas”, como a genômica, a transcriptômica e a proteômica são plataformas que utilizam equipamentos e ferramentas analíticas como exemplo a

espectrometria de massas e a cromatografia, para o entendimento dos sistemas orgânicos e compreensão dos distúrbios fisiopatológicos<sup>24, 26</sup>. O termo “Ómica” faz referência a diferentes técnicas de estudos na área analítica e biológica, a sua denominação vem do sufixo “Oma” (que significa o “conjunto de”)<sup>25-26</sup>. No campo de investigação das “Ómicas” unem-se conhecimentos da medicina translacional com suporte científicos em biologia molecular e celular que utilizam a bioinformática e de técnicas rápidas e automatizadas de alto rendimento para integrar a informação de forma coerente<sup>26</sup>.

A metabolômica amplia a compreensão do sistema orgânico e a etiopatogenia dos processos fisiopatológicos, estudando desde modelos celulares a modelos *in vivo*, auxiliando no entendimento das desordens que envolvem alterações no metabolismo energético e estresse oxidativo, incluindo a obesidade, dislipidemia, aterosclerose e síndrome metabólica dentre outras doenças<sup>27</sup>.

As estratégias metabolômicas para identificação de biomarcadores podem ser subdivididas em (i) *metabolic profiling*, onde é feita a identificação/caracterização e quantificação de um número pré-definido de metabólitos, que são geralmente relacionados a uma via metabólica específica; (ii) *metabolic fingerprint*, cujas análises são rápidas com a função de fornecer a classificação da amostra<sup>28</sup>. Também utilizada como importante ferramenta de *screening* para diferenciar estados biológicos (caso/controle, doença/saúde); (iii) *metabolic footprint*, que é a análise dos metabólitos secretados ou/e excretados por um organismo; (iv) *metabolite target analysis*, análise quantitativa e qualitativa de um ou de vários metabólitos relacionados a uma reação metabólica específica; e (v) *metabonomics*, onde é feita uma análise quantitativa de metabólitos em resposta a uma lesão/perturbação (doença ou tratamento terapêutico) ou a modificação genética<sup>25, 27-28</sup>. Devido às várias estratégias dispostas em análise metabolômica é possível acessar um número enorme de estados fisiopatológicos e as vias metabólicas para melhor entendê-los, além de auxiliar novas descobertas na área de medicina translacional<sup>25</sup>. A metabolômica desempenha importante papel na elucidação dos mecanismos envolvidos na obesidade, pois possibilita caracterizar o perfil lipídico e mediadores químicos envolvidos na inflamação<sup>3, 25, 29</sup>.

Como já é conhecido, a obesidade tem uma íntima ligação com a ingestão exacerbada e incorreta de alguns tipos de nutrientes, como os lipídios e carboidratos<sup>5c</sup>.<sup>26</sup>. É de suma importância além de saber o perfil lipídico tecidual saber também a

composição dos alimentos ingeridos, pois estes influenciam diretamente status corpóreo.

Até o momento não existia nenhuma técnica/ferramenta ou plataforma analítica que se mostrasse efetiva para a avaliação do perfil dos nutrientes ingeridos e a indicação da incorporação celular dos mesmos. Com essa prerrogativa foi criada uma nova ferramenta de análise de componentes alimentares oriundos da dieta e sua incorporação tecidual a Dietômica.

### **Dietômica**

Já dizia Hipócrates "*Que seu remédio seja seu alimento, e que seu alimento seja seu remédio*". Essa importante frase norteia como devem ser as diretrizes a serem abordadas no contexto atual, com o crescimento global e alarmante da população obesa<sup>30</sup>.

Atualmente por influência da mídia ocorre o incentivo do consumo de alimentos altamente palatáveis e gordurosos. Em contrapartida para minimizar o avanço do ganho de massa corporea "ganho de peso" e tentar diminuir o crescimento das comorbidades associadas a obesidade, estratégias governamentais em diversos países começaram a ser propagadas, com o objetivo de conscientizar a população sobre a importância da prática de exercícios e ingestão adequada de alguns tipos de alimentos, para garantir uma vida saudável. Contudo, as orientações nutricionais sempre foram ao encontro do controle de calorias e não pela qualidade e tipo de alimentos a serem utilizados<sup>3, 26, 29, 30c</sup>.

A análise da composição dos alimentos é suma importância pois possibilita caracterizar o perfil dos nutrientes demonstrando a quantidade de biomoléculas importantes com vitaminas, proteínas, carboidratos, lipídeos, flavonoides, minerais dentre outros. Uma ferramenta analítica importante que avalia a composição dos alimentos é a Foodômica, uma Ômica direcionada a análise dos alimentos "*foods* (do inglês)"<sup>30a, 30c, 31</sup>. A Foodômica desempenha papel importante para a avaliação do perfil de diversos alimentos e nutrientes, caracterizando, qualificando e quantificando os componentes químicos "biomoléculas" presentes nos alimentos<sup>30a, 30b, 31</sup>. Os dados analíticos gerados pela Foodômica corroboram os conhecimentos gerados pela

nutrigenômica, pois esta é área que correlacionada os alimentos e sua ação no organismo<sup>30a, 30b, 31</sup>.

No contexto atual muitos estudos avaliam o perfil dos alimentos e como os seus componentes comportam-se frente a doenças crônicas. Já é conhecido que as plataformas analíticas que utilizam ferramentas como a espectrometria de massas, desempenham papéis importantes para o entendimento dos processos orgânicos por sua exatidão e sensibilidade. Contudo até o momento não existia nenhuma ferramenta analítica que demonstrasse o perfil dos alimentos presentes nas dietas e como se dá a incorporação desses nutrientes no organismo, e foi com esse objetivo que o nosso grupo de pesquisa criou a Dietômica.

A Dietômica é uma nova ferramenta analítica com o objetivo de avaliar a incorporação de nutrientes a nível celular, possibilitando indicar o *status quo* dos nutrientes no organismo<sup>4a</sup>.

Com a criação da Dietômica amplia-se o campo de estudos para o entendimento da composição dos alimentos e como se dá a sua incorporação, auxiliando no entendimento de como ocorre a ação e função dos nutrientes no organismo<sup>4a</sup>.

## **OBJETIVO GERAL:**

O Principal objetivo deste trabalho foi o de elucidar os principais biomarcadores do tecido hepático e nas mitocôndrias de camundongos obesos tratados com dieta suplementada “acrescida” com 10% de azeite de oliva extra virgem (EVOO).

### **Objetivos específicos:**

a) Avaliação da composição lipídica da dieta hiperlipídica (HFD), dieta hiperlipídica suplementada “acrescida” com 10% de azeite de oliva (HSO) e ração padrão para roedores (SC).

b) Desenvolver uma metodologia para avaliar a composição de ácidos graxos e triacilgliceróis no fígado de animais tratados com dieta hiperlipídica (HFD), dieta hiperlipídica suplementada “acrescida” com 10% de azeite de oliva (HSO) e ração padrão para roedores (SC).

c) Desenvolver uma metodologia para avaliar a incorporação de compostos fenólicos no fígado e no extrato mitocondrial hepático de animais tratados dieta hiperlipídica (HFD), dieta hiperlipídica suplementada “acrescida” com 10% de EVOO (HSO) e ração padrão para roedores (SC).

## CAPITULO I

“DIETÔMICA: A NOVA FERRAMENTA PARA ANÁLISE DE DIETAS E INCORPORAÇÃO DE NUTRIENTES EM NÍVEL CELULAR.”

“DIETOMICS: THE NEW TOOL FOR ANALYSIS OF DIETS AND INCORPORATION OF NUTRIENTS IN CELL LEVEL.”

# Dietomics





## **Identification of compounds from high-fat and extra virgin olive oil-supplemented diets in whole mouse liver and mitochondrial extracts using mass spectrometry.**

Gustavo Aparecido dos Santos <sup>1§</sup>, Mônica Siqueira Ferreira <sup>1§</sup>, Diogo Noin de Oliveira <sup>1</sup>, Vanessa de Oliveira <sup>2</sup>, Edilene S. Siqueira-Santos <sup>3</sup>, Dennys Esper Corrêa Cintra <sup>2</sup>, Roger Frigério Castilho <sup>3</sup>, Lício Augusto Velloso <sup>4</sup>, Rodrigo Ramos Catharino <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>INNOVARE Biomarkers Laboratory, School of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil. <sup>2</sup>Sport Sciences Course, Faculty of Applied Sciences, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil. <sup>3</sup>Experimental Neurodegeneration Laboratory, School of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil. <sup>4</sup>Laboratory of Cell Signaling, School of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil.

\*Corresponding author: rrc@fcm.unicamp.br (R. R. Catharino).

**Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is a fatty liver disorder that could be improved with extra virgin olive oil (EVOO) supplementation in diet. We propose the monitoring, in whole mouse liver and mitochondrial extracts, of the absorption of compounds from three different diets: standard (CT), high-fat (HFD) and high-fat supplemented with EVOO (HFSO). Male mice were submitted to one of the following three diets: CT or HFD for 16 weeks or HFD for 8 weeks followed by additional 8 weeks with HFSO. Following this period, liver was extracted for histological evaluation, mitochondria isolation and mass spectrometry analyses. Diets, liver and a fraction enriched with mitochondria were analyzed using ESI-MS and the lipidomics approach. Morphological, histological and spectrometric results indicated a decrease in NASH severity with EVOO supplementation in comparison with animals maintained with HFD. Spectrometric data also demonstrated that some compounds presented on the diets are absorbed by the mitochondrial fraction. EVOO was shown to be a potential therapeutic alternative in food for NASH, with some of its compounds incorporated in the fraction enriched with mitochondria. Our results are in accordance with the proposition that the major factor that influences different responses to diets is their composition – and not only calories – especially when it comes to studies on obesity.**

## 1. INTRODUCTION

Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is a fatty liver disorder with worldwide distribution <sup>32</sup>. The essential features of NASH are ballooning degeneration of hepatocytes, accompanied by inflammatory cell infiltration, which has been linked to peripheral insulin resistance and increased triglyceride (TG) concentrations in the liver <sup>33</sup>. Studies have demonstrated that NASH is associated with several diseases, among which the best known are hyperglycemia <sup>34</sup>, type 2 diabetes <sup>35</sup>, hypertriglyceridemia <sup>36</sup>, and obesity <sup>37</sup>. However, NASH is mainly related to visceral adiposity, and not overall obesity <sup>38</sup>. When NASH is associated with obesity, other factors may be involved, such as oxidative stress <sup>39</sup>, TNF $\alpha$  <sup>40</sup>, other cytokines <sup>41</sup>, and chemokines <sup>42</sup>, but the ways in which they initiate or perpetuate steatohepatitis still remain unclear.

Therapeutic strategies for NASH patients consist of bariatric surgery, pharmacological interventions and lifestyle changes to promote weight loss <sup>43</sup>. The latter is considered the most natural method and more effective than several pharmacological interventions <sup>44</sup>. Furthermore, several long-term adverse effects may be associated with the therapy with xenobiotics, thereby increasing the search for natural products that could be used safely for a long period <sup>45</sup>.

In this context, extra virgin olive oil (EVOO) consumption has been associated with a lower risk of morbidity and mortality <sup>46</sup> and its therapeutic properties are fundamentally attributed to its phenolic content <sup>47</sup>. Among the phenolics class, oleuropein has been highlighted due to antioxidant, anti-inflammatory, antiatherogenic, anticancer, antimicrobial, antiviral and anti-aging effects <sup>48</sup>. Previous results have also demonstrated that lipid metabolism in the liver, body fat accumulation and the plasma concentrations of free fatty acids (FFAs) and TGs were significantly decreased in rats treated with oleuropein <sup>49</sup>.

Some studies have recently employed modern analytical approaches for EVOO analyses, such as chromatography, spectroscopic techniques and mass spectrometry, for quantification of phenolic compounds and EVOO's adulteration monitoring <sup>50</sup>. Between these tools, electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) has been greatly utilized for monitoring of food adulteration, classification and quality control <sup>51</sup>.

Despite great knowledge on the composition and benefits of EVOO, only in recently the absorption of its compounds has been further investigated and discussed, especially at intracellular level <sup>52</sup>; the incorporation at mitochondrial level, however, still remained unknown. In the present work, we proposed the use of ESI-MS to elucidate chemical markers that are related to NASH, as well as to characterize the compounds of three different diets (standard, high-fat and high-fat supplemented with EVOO) on whole liver extracts and on mitochondria-enriched extracts. The greatest advantage associated with the use of ESI-MS on these analyses is that it does not require chromatographic separation or many steps of sample preparation, significantly reducing the time dedicated to the analytical step.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Animals

Male 6-wk-old Swiss mice (*Mus musculus*) with an initial body mass of ~30 g, were taken from the University's central breeding colony. Initially, animals were separated in two groups: (i) mice that received standard rodent chow for 16 weeks (CT) (n=8) and (ii) mice that received high-fat diet (HFD) (n=16) for 8 weeks. Afterwards, animals from the HFD group were randomly assigned to one of the following regimens for 8 weeks: (i) maintained in HFD or (ii) introduced into HFD supplemented with extra virgin olive oil (HFSO) (n=8). All animals were maintained in individual cages, with a 12-h dark/12-h light cycle, receiving diet and water *ad libitum*. At the end of the experimental period, the animals were weighed and intraperitoneally anesthetized with 50 mg/kg sodium thiopental (Cristália Laboratories, São Paulo, Brazil). The liver of each animal was extracted, weighed and used for histological evaluations, mitochondria isolation and mass spectrometric analyses. All experiments were conducted in accordance with the principles and procedures described by the National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Experimental Animals and were approved by the University of Campinas Ethical Committee (ID 2014/3416-1).

## 2.2. High-fat diet preparation

Both HFD and HFSD were prepared every ten days and were stored protected from light at 4°C. Detailed composition of each diet is available in Table 1.

## 2.3. Histological experiments

Liver fragments were histologically processed for hematoxylin & eosin according to Cintra *et al.* (2012)<sup>53</sup>.

## 2.4. Liver mitochondria extractions

A fraction enriched with mitochondria was obtained from frozen mice by conventional differential centrifugation. Although the mitochondrial membrane integrity is damaged in frozen livers, membrane composition and enzyme activities remain. Briefly, mouse livers were defrost under ambient temperature, finely minced, and homogenized in an ice-cold isolation medium containing 0.25 M sucrose and 0.5 mM EGTA-K<sup>+</sup> (pH 7.2) in a Potter-Elvehjem homogenizer. The homogenates were centrifuged for 10 min at 750 *g* in a Beckman JA-25.50 rotor. The supernatants were recentrifuged for 10 min at 8000 *g*. The pellets were resuspended in approximately 20 mL of isolation medium and centrifuged for 10 min at 8000 *g*. The final pellets were resuspended in 0.25 M sucrose at approximate protein concentrations of 20 mg/mL. The entire procedure of mitochondrial isolation was carried out at 4°C. The final pellet was utilized for mass spectrometry analyses. This procedure results in a fraction enriched with mitochondria; the presence of organelles with similar density, such as peroxisomes, is very likely. Plasma membrane and endoplasmic reticulum are disrupted into small vesicles during the homogenization, nonetheless these vesicles are low-density and may comprise only a minor contaminant into the final pellet.

## 2.5. ESI-MS analysis

All samples (diet, liver and mitochondria extracts) were submitted to a customized lipid extraction, as described by Catharino *et al.* (2005). Lipid extracts were resuspended in 50 µL of H<sub>2</sub>O milliQ, and 10 µL of the latter was diluted in 990 µL of methanol. This solution was divided in two samples of 500 µL and 0.1% formic acid or ammonium hydroxide was added to assist ionization in the positive and negative modes, respectively. Data acquisition was performed in an ESI-LTQ-XL instrument (Thermo Scientific, Bremen, Germany). Spectra were acquired over 60 seconds in the

positive and negative ion modes, at the  $m/z$  range of 600 to 1200 (positive) and 150 to 600 (negative). General conditions were: sheath gas at 5 arb, flow rate of 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ , spray voltage of 5 kV and capillary temperature of 280°C. For chemical markers identification, MS/MS was performed using helium as collision gas and 30–50 of collision-induced dissociation (CID) energy.

### *2.6. Statistical analysis and chemical marker identification*

To verify the significance of mice and liver weights differences, one-way ANOVA test and Bonferroni post-test were employed using GraphPad Prism v.5.0 for Windows (GraphPad Software, California, USA).

In order to identify chemical markers that were characteristic of each group (CT, HFD and HFSO), principal component analysis (PCA) was performed using the Unscrambler v.9.7 (CAMO Software, Trondheim, Norway). The software has clustered samples according to the relationship between  $m/z$  and intensity, with results expressed as groups of samples with the same characteristics when considered these parameters. MS/MS reactions were performed with each potential chemical marker identified by PCA. Lipid MAPS (University of California, San Diego, CA - [www.lipidmaps.org](http://www.lipidmaps.org)), Human Metabolome (University of Alberta, Edmonton, CA - [www.hmdb.ca](http://www.hmdb.ca)) and METLIN (Scripps Center for Metabolomics, La Jolla, CA - [metlin.scripps.edu](http://metlin.scripps.edu)) online databases were consulted to help guiding the choice for potential lipid markers. Their structures were later inputted in Mass Frontier software v.6.0 (Thermo Scientific, California, USA), where a number of fragments and mechanisms were modeled. Mass Frontier uses literature data and mathematical calculations to propose fragmentation mechanisms and products. Structures were assigned to molecules that presented the highest number of matches between MS/MS experimental data and Mass Frontier-generated fragments.

## **3. RESULTS**

### *3.1. Animals*

To monitor the level of obesity on high-fat groups, all animals were weighed before and after 16 weeks of treatments. Measurements, available as mean  $\pm$  standard error (SE), demonstrated that at the end of treatments, mice of the HFD group

(64.1±1.3 g) presented a significantly higher weight than those of the CT group (44.4±1.9 g) ( $p < 0.001$ ). On the other hand, mice of HFSO group (52.3±1.4 g) presented reduced weight when compared with HFD ( $p < 0.001$ ). Mice of the CT and HFSO groups also presented significant differences ( $p < 0.001$ ).

### 3.2. Diet consumption

Diet intake for all groups was very similar, and did not present any significant variation during treatment. CT mice consumed (mean ± SE) about 4.2±0.2 g of rodent chow; HFD mice consumed 5.5±0.4 g of high-fat diet; and HFSO mice consumed 5.0±0.3 g of high-fat diet supplemented with EVOO. The comparison between the groups is, therefore, not significant.

### 3.3. Histological analysis and liver weight

Morphological analysis demonstrated that liver from HFD mice presented a modified color of the organ when compared to CT, indicating fat accumulation and possibly NASH (Figure 1A and 1B). However, when HFSO diet was administered, the predominance of fat was reduced, as demonstrated in Figure 1C. Statistical analysis of liver weight presented significant differences of HFD when compared with CT and HFSO ( $p < 0.05$ ). Comparison between CT and HFSO also presented significance (Figure 1G).

To confirm that HFD had promoted NASH condition and that the histological changes were caused by HFSO, liver slices of mice submitted to all experimental diets were stained with hematoxylin-eosin (Figure 1D-1F). Livers from HFD mice presented severe ballooning degeneration of hepatocytes, as well as fibrosis and higher prevalence of fat vacuoles (Figure 1E). However, HFSO nutrition demonstrated an improvement in the liver condition, with the predominance of only a few fat vacuoles (Figure 1F).

### 3.4. ESI-MS analysis

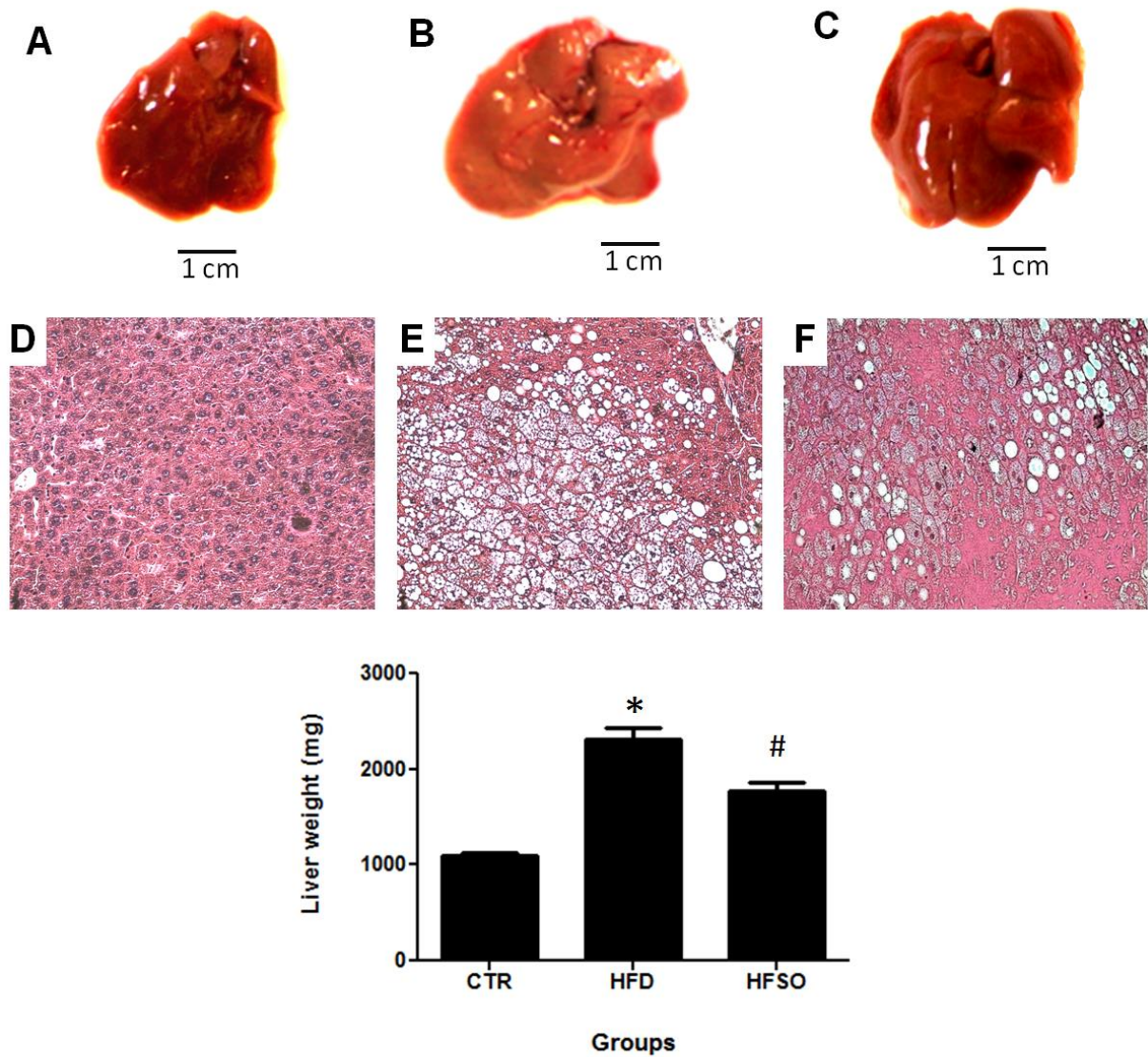
Fingerprinting data in the negative ion mode presented similarities when comparing the diet, liver and mitochondria extracts (Supplementary Material: Figures S1, CT; Figure S2, HFD; Figure S3, HFSO). The same occurred in the positive ion mode (Supplementary Material: CT, HFD and HFSO groups; Figures S4, S5 and S6,

respectively). As the incorporation of phenolic compounds was the main focus for the mitochondria, analyses for these samples were performed in negative ion mode only.

### *3.5. PCA and chemical markers identification*

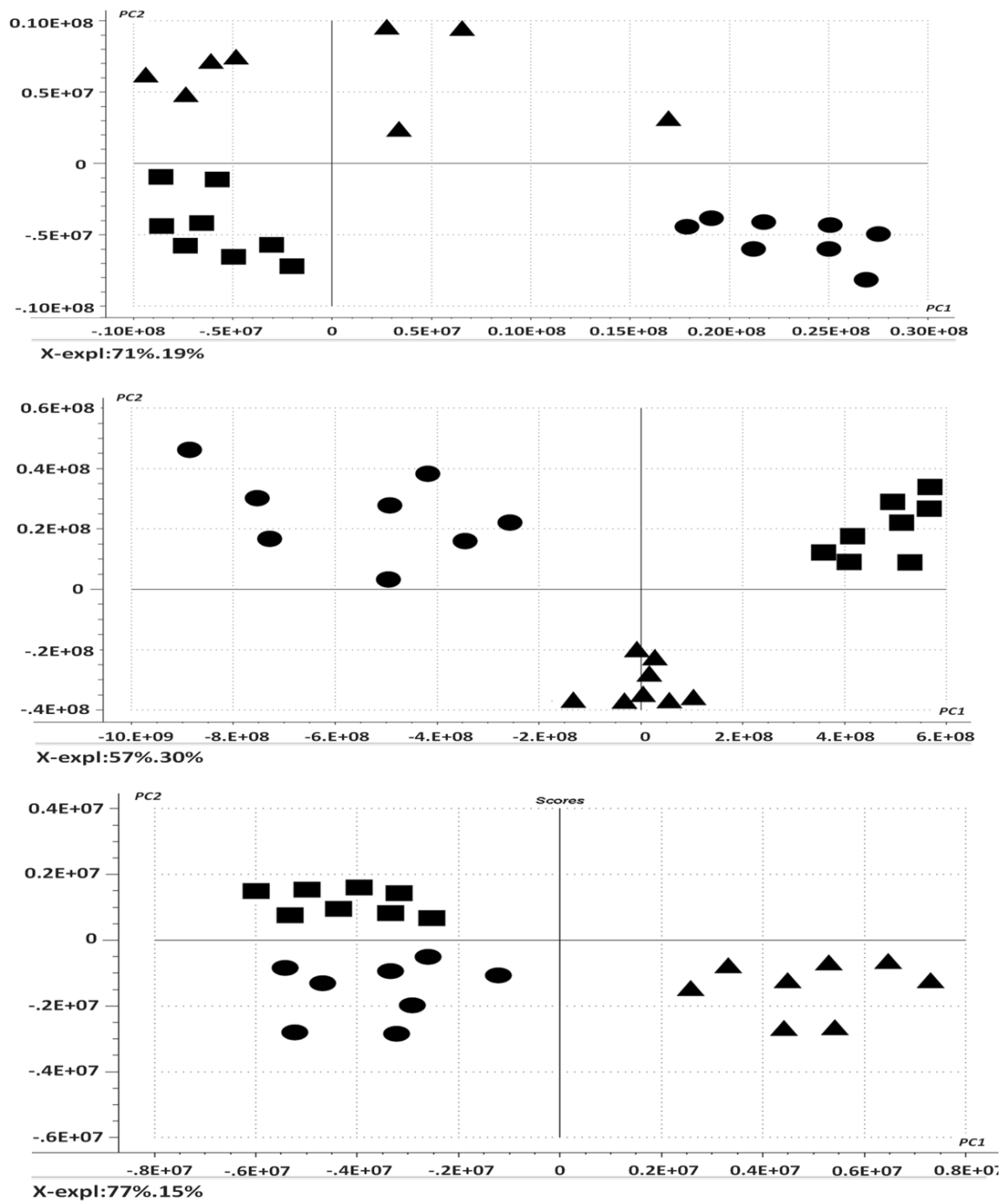
To elect chemical markers for each group, PCA was performed comparing CT, HFD and HFSD, both in liver and mitochondria samples. As shown in Figure 2, comparisons for different liver groups presented clear separation on both ion modes (A – positive and B – negative), with accuracy higher than 85%. Sample grouping according to each diet was also observed on the mitochondria-rich extracts (Figure 2C), which presented optimized separation on the negative ion mode.

For chemical markers identification, ion fragmentation reactions (MS/MS) were performed and then compared to characteristic fragmenting patterns predicted by software, as described in the Material and Methods Section. Table 2 presents the chemical markers identified in liver and mitochondria extracts, as well as the precursor ion characteristic fragmentation.

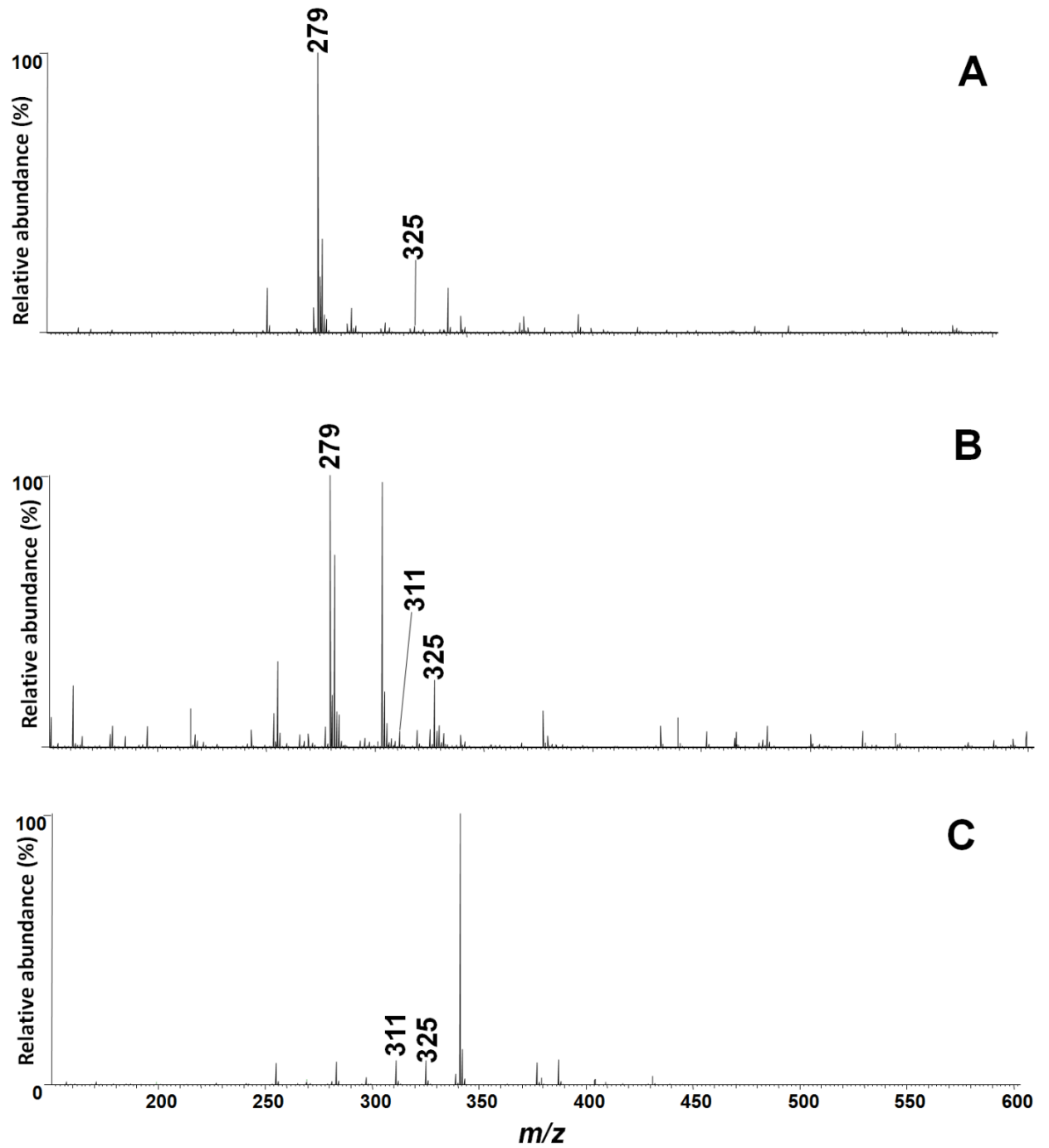


**Figure 1.** Liver extracted of mice and liver slices stained with H&E (x400). Control mice (A and D), mice submitted to HFD (B and E), and or HFSO (C and F). Ballooned hepatocytes (arrow) and fat vacuoles (arrowhead) caused by HFD were observed in HFSO. (G) Comparison between liver weight of CT, HFD and HFSO mice. \* $P < 0.05$  vs CT; # $P < 0.05$  vs HFD.

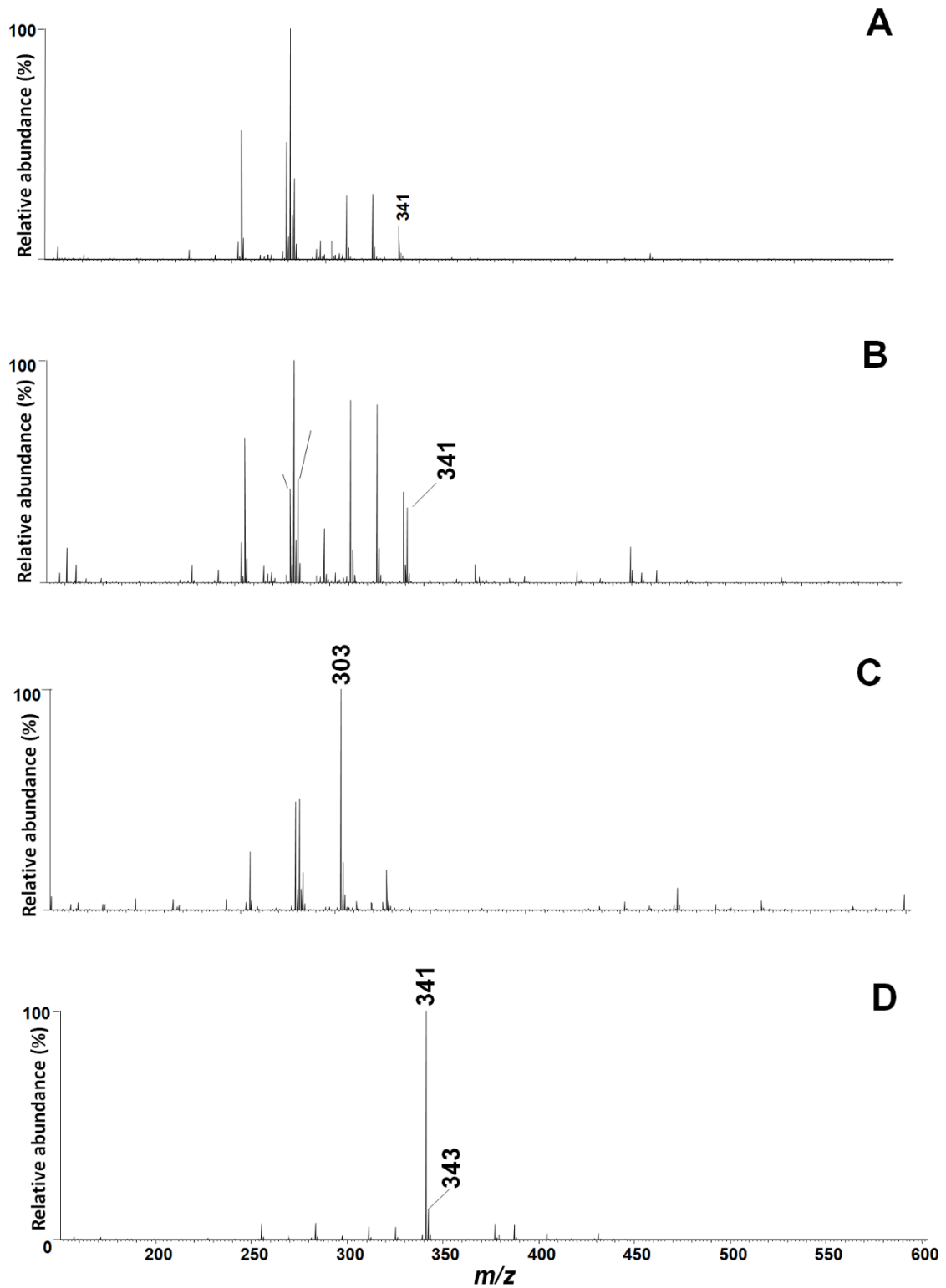




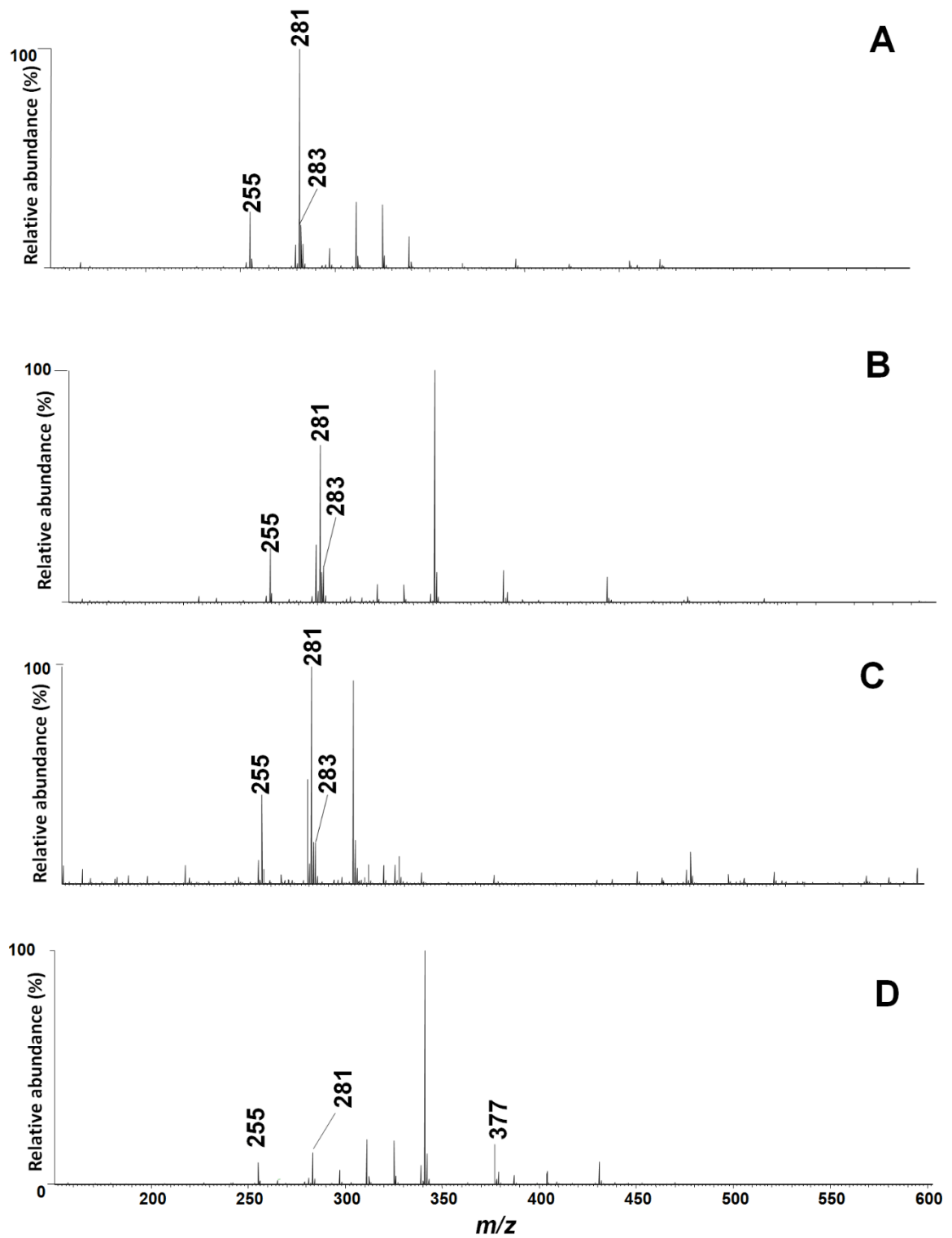
**Figure 2.** Principal component analysis of (A) mice liver extract in negative ion mode, (B) mice liver extract in positive ion mode and (C) mitochondria-enriched fraction in negative ion mode. Ion chemical markers of each group separated by principal component analysis ( $n = 8/\text{group}$ ). The explained variances (X-expl) are shown on inferior part of the figure. ▲, CT; ●, HFD; and ■, HFSO.



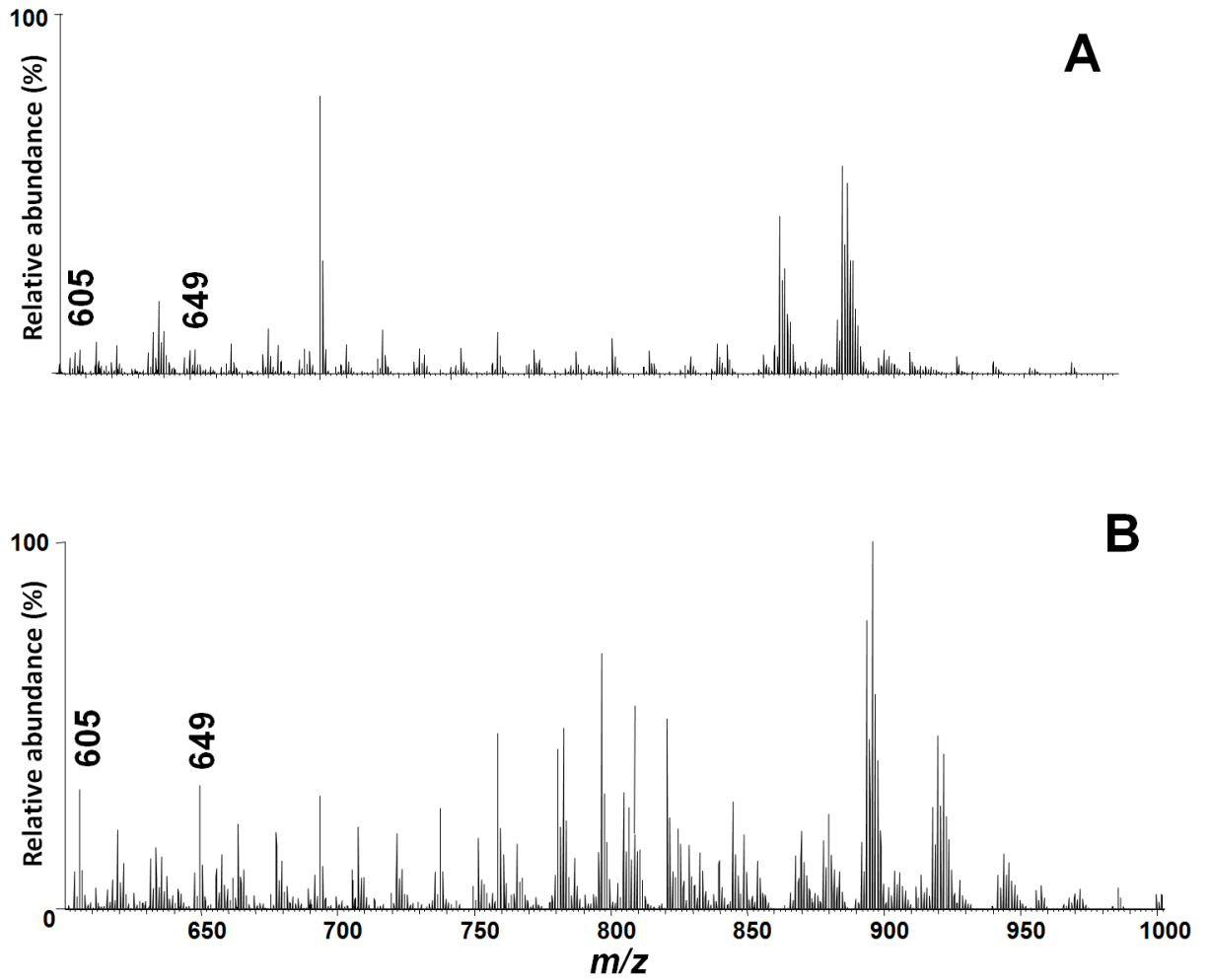
**Figure S1.** Representative fingerprinting spectra of (A) standard rodent chow, (B) whole liver extract of CT mice, (C) mitochondria-enriched fraction of CT mice. Negative ion mode.



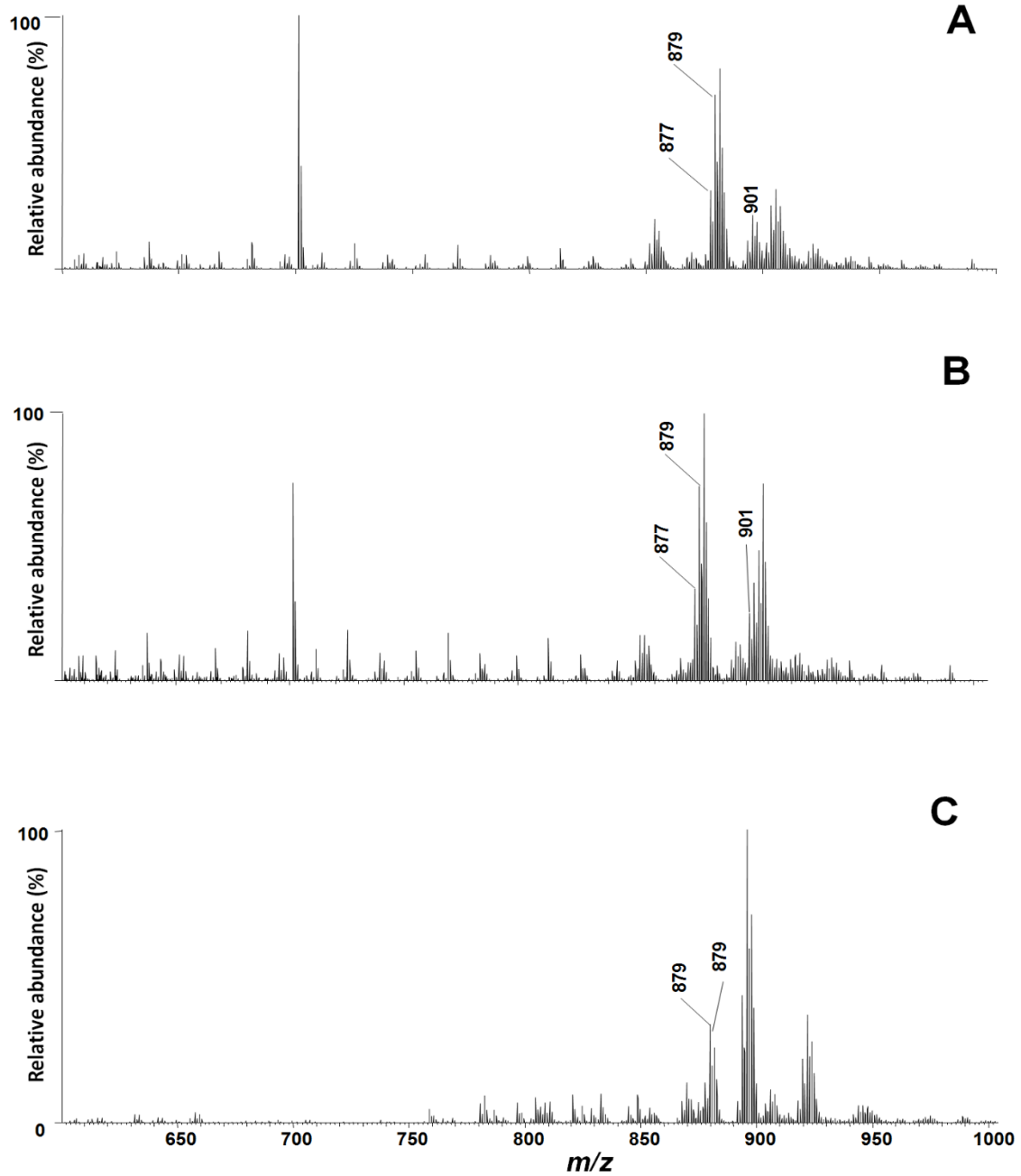
**Figure S2.** Representative fingerprinting spectra of (A) lard, (B) HFD, (C) whole liver extract of HFD mice, (D) mitochondria-enriched fraction of HFD mice. Negative ion mode.



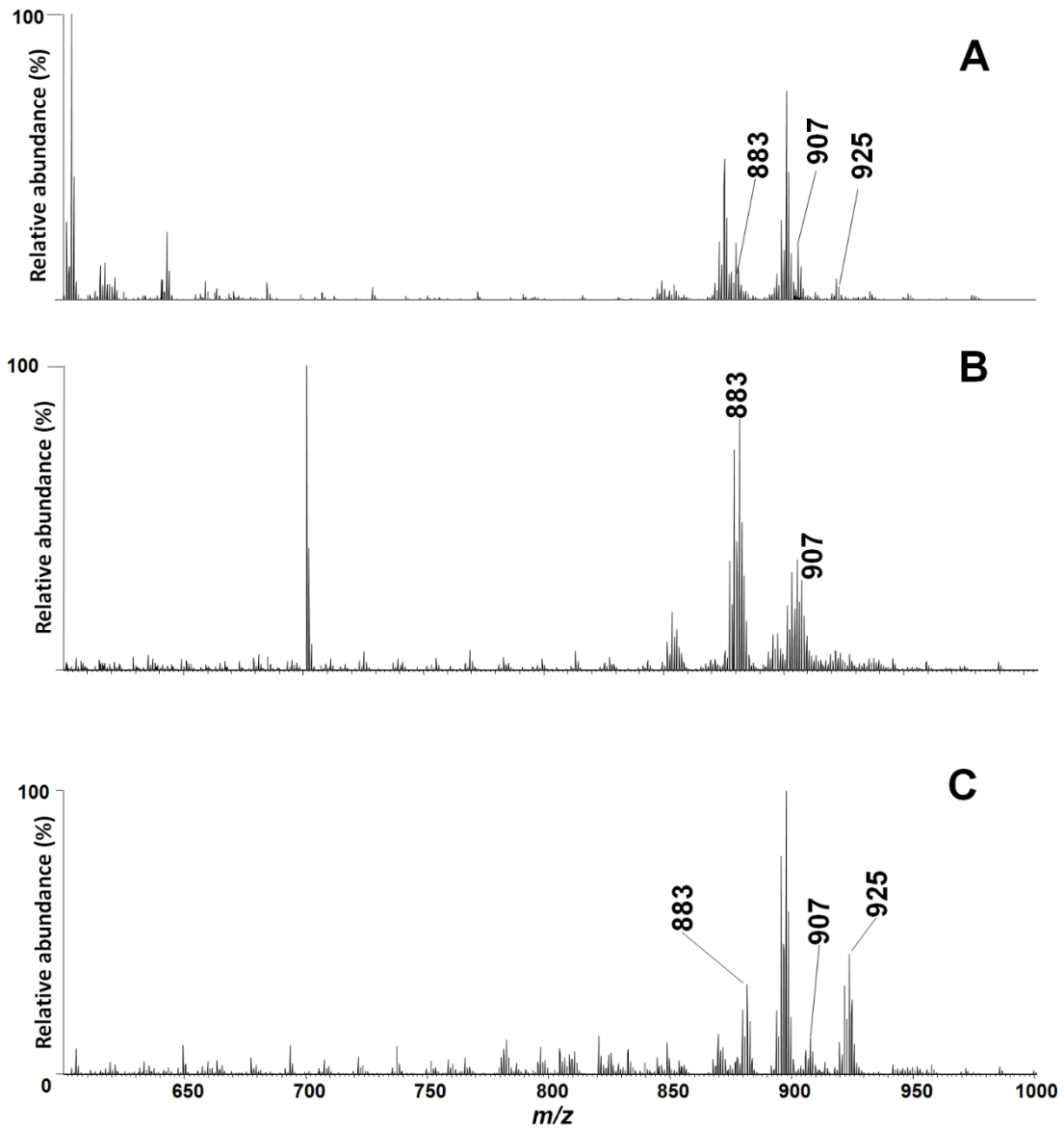
**Figure S3.** Representative fingerprinting spectra of (A) EVOO, (B) HFSO, (C) whole liver extract of HFSO mice, (D) mitochondria-enriched fraction of HSO mice. Negative ion mode.



**Figure S4.** Representative fingerprinting spectra of (A) standard rodent chow, (B) whole liver extract of CT mice. Positive ion mode.



**Figure S5.** Representative fingerprinting spectra of (A) lard, (B) HFD, (C) whole liver extract of HFD mice. Positive ion mode.



**Figure S6.** Representative fingerprinting spectra of (A) EVOO, (B) HFSO, (C) whole liver extract of HFSO mice. Positive ion mode.

**Table 1.** Macronutrient composition of experimental diets (g/kg).

<b>Ingredients</b>	<b>SRC</b>	<b>HFD</b>	<b>HSO</b>
Corn Starch	427.5	115.5	115.5
Casein	200.0	200.0	200.0
Sucrose	132.0	132.0	132.0
Dextrinated Starch	100.0	100.0	100.0
Soybean Oil	40.0	40.0	40.0
Lard	0.0	312.0	208.0
Extra Virgin Olive Oil	0.0	0.0	104.0
Cellulose	50.0	50.0	50.0
Mineral Mix	35.0	35.0	35.0
Vitamin Mix	10.0	10.0	10.0
L-Cysteine	3.0	3.0	3.0
Choline	2.5	2.5	2.5
<b>TOTAL</b>	<b>1000.0</b>	<b>1000.0</b>	<b>1000.0</b>

SRC, standard rodent chow. HFD, high fat diet. HSO, high fat diet supplemented with extra virgin olive oil.



**Table 2.** Lipid chemical markers identified via DIGS-MS.

<b>Whole liver extracts of mice analyzed in negative ion mode</b>					
<b>Sample assignment</b>	<b>Molecule [M-H]<sup>-</sup></b>	<b>Precursor ion <i>m/z</i></b>	<b>Product ions <i>m/z</i></b>	<b>LMID</b>	<b>MID</b>
CT	Docosahexaenoic acid	327	283, 229	LMFA01030185	3457
	Linoleic acid	279	261, 235	LMFA01030120	191
HFD	Arachidonic acid	303	285, 259	LMFA01030001	193
HFSO	Oleic acid	281	263, 237	LMFA01030002	190
	Stearic acid	283	265, 239	LMFA01010018	189
	Palmitic acid	255	237, 211	LMFA01010001	187
<b>Whole liver extracts of mice analyzed in positive ion mode</b>					
<b>Sample assignment</b>	<b>Molecule</b>	<b>Precursor ion <i>m/z</i></b>	<b>Product ions <i>m/z</i></b>	<b>LMID</b>	<b>MID</b>
CT	[LaM+H] <sup>+</sup> (12:0/17:1)	605	357, 377, 434	LMGP10010049	81215
	[PP+H] <sup>+</sup> (16:0/16:0)	649	437, 459, 410	LMGP10010027	81205
HFD	[PLL+Na] <sup>+</sup> (16:0/18:2/18:2)	877	833, 597	LMGL03010141	4838
	[POL+Na] <sup>+</sup> (16:0/18:1/18:2)	879	623, 601	LMGL03010121	36807
	[LLL+Na] <sup>+</sup> (18:2/18:2/18:2)	901	883, 857, 621	LMGL03010371	36870
HFSO	[POO+Na] <sup>+</sup> (16:0/18:1/18:1)	883	625, 599, 577	LMGL03010100	4798
	[LLH+H] <sup>+</sup> (18:2/18:2/21:0)	925	908, 897, 855	LMGL03010962	37461
	[OOO+Na] <sup>+</sup> (18:1/18:1/18:1)	907	889, 625, 603	LMGL03012612	39110
<b>Mitochondria-enriched fraction of liver analyzed in negative ion mode</b>					
<b>Sample assignment</b>	<b>Molecule [M-H]<sup>-</sup></b>	<b>Precursor ion <i>m/z</i></b>	<b>Product ions <i>m/z</i></b>	<b>LMID/HMID</b>	<b>MID</b>
CT	Arachidic acid	311	285, 259	LMFA01010020	401
	Heneicosanoic acid	325	283, 229	LMFA01010021	4208
HFD	2-hydroxy heneicosanoic acid	341	261, 235	LMFA01050209	35575
	11,12-dihydroxy arachidic acid	343	263, 237	LMFA01050095	35472
HFSO	Oleuropein-aglycone mono-aldehyde	377	265, 239	HMDB29304	86174
	Oleic acid	281	237, 211	LMFA01030002	190

CT, control mice. HFD, mice treated with high-fat diet. HFSO, mice treated with high-fat diet supplemented with extra virgin olive oil. La, lauric acid. M, margaric acid. P, palmitic acid. L, linoleic acid. O, oleic acid. H, heneicosanoic acid.

LMID, Lipid Maps ID. MID, METLIN ID. HMID, Human Metabolome Database ID.

## 4. DISCUSSION

Previous studies already demonstrated the importance of EVOO consumption and its beneficial effects on health <sup>46-48</sup>. Our results presented weight increase on HFD group, which was partially prevented by EVOO intake. These data suggest that EVOO has compounds that are able to improve health conditions, even in obesity. Specifically for NASH, our morphological and histological results presented evidences of steatohepatitis prevention with EVOO administration, i.e. reduction of both liver steatotic aspects and total number of fat vacuoles (Figure 1). Together, these data strongly suggest that EVOO consumption is effective against the NASH evolution.

The protective effect of EVOO is due to the incorporation of its compounds <sup>4b</sup>. In this report, our data indicated that some lipids from diets were incorporated both by liver and a fraction enriched with liver mitochondria of mice, as demonstrated by fingerprinting spectra. For example, our results in the negative ion mode indicated that heneicosanoic acid ( $m/z$  325) was presented in standard chow and it was incorporated by liver and liver mitochondria in control mice (Figure S1). Although the role of this fatty acid has still not been described in mitochondria, it is known that it participates as an energy source and it is also important to the membrane integrity/stability of several cell types <sup>54</sup>. Similarly, linoleic acid ( $m/z$  279) was incorporated by the liver of mice in the control group (Figure S1). This compound is an essential fatty acid and it is known to keep the water permeability barrier <sup>55</sup>. In hepatic cells, linoleic acid suppresses specific genes related to lipogenesis and glycolysis <sup>56</sup>. The results from positive ion mode present both chemical markers as phosphatidic acids (PA) that were incorporated to mice liver ( $m/z$  605 and 649) (Figure S4). This result makes sense, since PAs play the role of second messengers and may act as precursors of glycerides and phospholipids in the liver <sup>57</sup>. Moreover, some studies have also suggested that PA does not naturally occur in fresh mammalian tissues, such as heart, liver and brain, being only incorporated from the feed <sup>58</sup>.

When HFD was administered, mice liver presented morphological and histological aspects of NASH, as discussed above. Interestingly, one of the chemical markers for the HFD liver was arachidonic acid ( $m/z$  303) (Figure S2C), which is a molecule closely related to inflammatory responses involved in the progression of liver disease <sup>59</sup>. Some of these diseases, e.g. NASH, may be related to obesity – which is

also associated to a variety of inflammatory processes and increased oxidative stress<sup>60</sup>. The later may cause the opening of a non-specific pore, the mitochondrial permeability transition pore, enabling free passage of molecules of <1.5 kDa inside the mitochondria<sup>61</sup>. Permeability transition pore opening may explain the absorption of oxidized fatty acids by mitochondria, such as 2-hydroxy heneicosanoic acid ( $m/z$  341) and 11,12-dihydroxy arachidic acid ( $m/z$  343) (Figure S2). Furthermore, fatty acids can be used for triacylglycerols (TAG) synthesis, that are stored in excess as energy source in liver of obese mammals<sup>62</sup>. However, TAGs can also be obtained from diet, as occurred in HFD group. As seen on Figure S5, lard and HFD both contained PPL ( $m/z$  877) and POL ( $m/z$  879); these TAGs were both absorbed by liver, probably to be uses as energy sources.

TAGs and fatty acids also appeared as chemical markers on HFSO liver (Table 2). The same species of these compounds were found in EVOO (Figure S3 and S6), indicating the absorption of both by the liver. However, this absorption could not explain the improvement from NASH with EVOO consumption. On the other hand, oleuropein aglycone ( $m/z$  377) was also determined as a chemical marker in the fraction enriched with liver mitochondria for HFSO group, indicating that liver mitochondria were able to incorporate this phenolic compound from diet. Corroborating our results, recent studies observed that oleuropein attenuates hepatic diseases induced by high-fat diet in mice<sup>4b, 45</sup>. Similarly, in a recent study, human and mouse liver cell lines treated with free fatty acids (FFA) and oleuropein presented a reduction of apoptotic cell death<sup>63</sup>. These data are in accordance with the incorporation of oleuropein by mitochondria and the liver disease improvement with EVOO consumption.

## 5. CONCLUSION

An EVOO-supplemented diet was able to improve NASH condition; and, for the first time, we were able to distinguish chemical markers from EVOO included in the diet and/or absorbed by mice liver. These data evidenced the sensitivity of the method to specifically detect diverse compounds in complex samples. Furthermore, we demonstrated *in vivo* the incorporation of some compounds in a fraction enriched with

liver mitochondria. The most interesting feature of our work is that the obtained results indicate that diet composition should be considered at all times, and not just counting total calories, and it must be more importantly observed in obesity studies – since EVOO shows therapeutic properties, a high-fat diet based on this oil will possibly not give satisfactory results. Moreover, this new trend in the molecular study of diets, in combination with the lipidomics strategy has generated a new analytical platform that includes monitoring of composition, adulteration, absorption and compound quantification of foods. Thus, a new term should be coined: *dietomics*.

## **- ACKNOWLEDGEMENTS**

We would like to thank FAPESP (São Paulo Research Foundation, 2014/00084-2, 2014/23010-4 and 2011/50400-0), CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Level or Education Personnel), CNPq and INCT (National Science and Technology Institutes) for the financial support.

## **- COMPETING FINANCIAL INTERESTS**

The authors declare no competing financial interests.

## REFERENCIAS - ARTIGO

- [1] G. C. Farrell, C. Z. Larter, *Hepatology* **2006**, *43*, S99.
- [2] R. Hughes, LWW, **2006**.
- [3] E. M. Brunt, C. G. Janney, A. M. Di Bisceglie, B. A. Neuschwander-Tetri, B. R. Bacon, *The American journal of gastroenterology* **1999**, *94*, 2467.
- [4] G. Marchesini, E. Bugianesi, G. Forlani, F. Cerrelli, M. Lenzi, R. Manini, S. Natale, E. Vanni, N. Villanova, N. Melchionda, *Hepatology* **2003**, *37*, 917.
- [5] B. B. Lowell, G. I. Shulman, *Science* **2005**, *307*, 384.
- [6] I. R. Willner, B. Waters, S. R. Patil, A. Reuben, J. Morelli, C. A. Riely, *The American journal of gastroenterology* **2001**, *96*, 2957.
- [7] I. R. Wanless, J. S. Lentz, *Hepatology* **1990**, *12*, 1106.
- [8] J. G. Kral, F. Schaffner, R. N. Pierson Jr, J. Wang, *Metabolism* **1993**, *42*, 548.
- [9] E. Thomas, G. Hamilton, N. Patel, R. O'Dwyer, C. Dore, R. Goldin, J. Bell, S. Taylor-Robinson, *Gut* **2005**, *54*, 122.
- [10] N. Matsuzawa, T. Takamura, S. Kurita, H. Misu, T. Ota, H. Ando, M. Yokoyama, M. Honda, Y. Zen, Y. Nakanuma, *Hepatology* **2007**, *46*, 1392.
- [11] Q. Cheng, N. Li, M. Chen, J. Zheng, Z. Qian, X. Wang, C. Huang, S. Xu, G. Shi, *Digestive diseases and sciences* **2013**, *58*, 2895.
- [12] S. Uysal, F. Armutcu, T. Aydogan, K. Akin, M. Ikizek, M. R. Yigitoglu, *Clinical biochemistry* **2011**, *44*, 1375.
- [13] C. Baeck, A. Wehr, K. R. Karlmark, F. Heymann, M. Vucur, N. Gassler, S. Huss, S. Klussmann, D. Eulberg, T. Luedde, *Gut* **2012**, *61*, 416.
- [14] K. Te Sligte, I. Bourass, J. Sels, A. Driessen, R. Stockbrügger, G. Koek, *European journal of internal medicine* **2004**, *15*, 10.
- [15] K. Cusi, *Gastroenterology* **2012**, *142*, 711.
- [16] S. W. Kim, W. Hur, T. Z. Li, Y. K. Lee, J. E. Choi, S. W. Hong, K.-S. Lyoo, C. R. You, E. S. Jung, C. K. Jung, *Experimental & molecular medicine* **2014**, *46*, e92.
- [17] E. Komaki, S. Yamaguchi, I. Maru, M. Kinoshita, K. Kakehi, Y. Ohta, Y. Tsukada, *Food Science and Technology Research* **2003**, *9*, 35.
- [18] K. L. Tuck, P. J. Hayball, *The Journal of nutritional biochemistry* **2002**, *13*, 636.
- [19] L. Bravo, *Nutrition reviews* **1998**, *56*, 317.
- [20] Y. Oi-Kano, T. Kawada, T. Watanabe, F. Koyama, K. Watanabe, R. Senbongi, K. Iwai, *Journal of nutritional science and vitaminology* **2008**, *54*, 363.
- [21] A. M. Gómez Caravaca, A. Carrasco Pancorbo, B. Cañabate Díaz, A. Segura Carretero, A. Fernández Gutiérrez, *Electrophoresis* **2005**, *26*, 3538.
- [22] H. Yang, J. Irudayaraj, *Journal of the American Oil Chemists' Society* **2001**, *78*, 889.

- [23] C. D. Calvano, C. D. Ceglie, L. D'Accolti, C. G. Zambonin, *Food chemistry* **2012**, *134*, 1192.
- [24] R. García-Villalba, A. Carrasco-Pancorbo, C. Oliveras-Ferraros, A. Vázquez-Martín, J. A. Menéndez, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **2010**, *51*, 416.
- [25] R. R. Catharino, R. Haddad, L. G. Cabrini, I. B. Cunha, A. C. Sawaya, M. N. Eberlin, *Analytical chemistry* **2005**, *77*, 7429.
- [26] Y. Ouni, A. Taamalli, A. M. Gómez-Caravaca, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, M. Zarrouk, *Food chemistry* **2011**, *127*, 1263.
- [27] D. N. de Oliveira, S. de Bona Sartor, N. Damário, A. B. Gollücke, R. Catharino, *Journal of Food Measurement and Characterization* **2014**, *8*, 9.
- [28] S. Lopez, B. Bermudez, I. P. S. Montserrat-de, S. Jaramillo, L. Varela, A. Ortega-Gomez, R. Abia, F. Muriana, *Biochim Biophys Acta*. **2014**, *1838*, 1638.
- [29] D. E. Cintra, E. R. Ropelle, J. C. Moraes, J. R. Pauli, J. Morari, C. T. de Souza, R. Grimaldi, M. Stahl, J. B. Carvalheira, M. J. Saad, L. A. Velloso, *PLoS ONE* **2012**, *7*, e30571.
- [30] R. R. Catharino, R. Haddad, L. G. Cabrini, I. B. S. Cunha, A. C. H. F. Sawaya, M. N. Eberlin, *Analytical chemistry* **2005**, *77*, 7429.
- [31] S. Park, Y. Choi, S.-J. Um, S. K. Yoon, T. Park, *Journal of hepatology* **2011**, *54*, 984.
- [32] S. Pfeiffer, G. Vielhaber, J.-P. Vietzke, K.-P. Wittern, U. Hintze, R. Wepf, *Journal of investigative dermatology* **2000**, *114*, 1030.
- [33] M. Keles, Y. Demir, I. Altuntas, Z. Umudum, E. Bakan, *Turkish Journal of Medical Sciences* **2000**, *30*, 465.
- [34] T. Hyötyläinen, I. Mattila, S. K. Wiedmer, A. Koivuniemi, M.-R. Taskinen, H. Yki-Järvinen, M. Orešič, *Molecular bioSystems* **2012**, *8*, 2559.
- [35] H. S. Hansen, B. Jensen, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* **1985**, *834*, 357.
- [36] S. D. Clarke, D. R. Romsos, G. A. Leveille, *The Journal of nutrition* **1977**, *107*, 1170.
- [37] S. Clarke, D. Jump, *Nutrition and Gene Expression*'Eds Berdanier, C. & Hargrove, *JL CRC Press, Boca Raton, Florida* **1993**, 227.
- [38] S. D. Clarke, D. B. Jump, *Lipids* **1996**, *31*, S7.
- [39] M. Liimatta, H. C. Towle, S. Clarke, D. B. Jump, *Molecular Endocrinology* **1994**, *8*, 1147.
- [40] H. L. Reeves, M. G. Thompson, C. L. Dack, A. D. Burt, C. P. Day, *Hepatology* **2000**, *31*, 95.
- [41] F. Possmayer, G. Scherphof, T. Dubbelman, L. Van Golde, L. Van Deenen, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* **1969**, *176*, 95.
- [42] G. Marinetti, E. Stotz, *Biochimica et biophysica acta* **1956**, *21*, 168.
- [43] R. Dawson, *Biochimica et biophysica acta* **1954**, *14*, 374.
- [44] P. Davies, P. J. Bailey, M. M. Goldenberg, A. W. Ford-Hutchinson, *Annual review of immunology* **1984**, *2*, 335.

- [45] N. Ferre, J. Claria, *Mini reviews in medicinal chemistry* **2006**, 6, 1321.
- [46] P. Dandona, A. Aljada, A. Bandyopadhyay, *Trends in immunology* **2004**, 25, 4.
- [47] S. Furukawa, T. Fujita, M. Shimabukuro, M. Iwaki, Y. Yamada, Y. Nakajima, O. Nakayama, M. Makishima, M. Matsuda, I. Shimomura, *Journal of Clinical Investigation* **2004**, 114, 1752.
- [48] A. P. Halestrap, *Journal of molecular and cellular cardiology* **2009**, 46, 821.
- [49] A. J. Kowaltowski, R. F. Castilho, A. E. Vercesi, *FEBS letters* **2001**, 495, 12.
- [50] C. A. Nagle, E. L. Klett, R. A. Coleman, *Journal of lipid research* **2009**, 50, S74.
- [51] W. H. Hur, Y. K. Lee, S. W. Hong, S. K. Yoon, *대한간학회지* **2011**, 17, 47.



## REFERENCIAS - INTRODUÇÃO

1. (a) Alvarez-Perez, J.; Sanchez-Villegas, A.; Diaz-Benitez, E. M.; Ruano-Rodriguez, C.; Corella, D.; Martinez-Gonzalez, M. A.; Estruch, R.; Salas-Salvado, J.; Serra-Majem, L.; Investigators, P. S., Influence of a Mediterranean Dietary Pattern on Body Fat Distribution: Results of the PREDIMED-Canarias Intervention Randomized Trial. *J Am Coll Nutr* **2016**, *35* (6), 568-580; (b) Jurado-Ruiz, E.; Varela, L. M.; Luque, A.; Berná, G.; Cahuana, G.; Martinez-Force, E.; Gallego-Durán, R.; Soria, B.; Roos, B.; Gómez, M. R., An extra virgin olive oil-rich diet intervention ameliorates the non-alcoholic steatohepatitis induced by a high-fat “Western type” diet in mice. *Molecular Nutrition & Food Research* **2016**.
2. Milanski, M.; Arruda, A. P.; Coope, A.; Ignacio-Souza, L. M.; Nunez, C. E.; Roman, E. A.; Romanatto, T.; Pascoal, L. B.; Caricilli, A. M.; Torsoni, M. A.; Prada, P. O.; Saad, M. J.; Velloso, L. A., Inhibition of hypothalamic inflammation reverses diet-induced insulin resistance in the liver. *Diabetes* **2012**, *61* (6), 1455-62.
3. Locke, A. E.; Kahali, B.; Berndt, S. I.; Justice, A. E.; Pers, T. H.; Day, F. R.; Powell, C.; Vedantam, S.; Buchkovich, M. L.; Yang, J., Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature* **2015**, *518* (7538), 197-206.
4. (a) Santos, G. A.; Ferreira, M. S.; Oliveira, D. N.; Oliveira, V.; Siqueira-Santos, E. S.; Cintra, D. E. C.; Castilho, R. F.; Velloso, L. A.; Catharino, R. R., Identification of compounds from high-fat and extra virgin olive oil-supplemented diets in whole mouse liver extracts and isolated mitochondria using mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **2015**, *50* (7), 951-958; (b) Park, S.; Choi, Y.; Um, S.-J.; Yoon, S. K.; Park, T., Oleuropein attenuates hepatic steatosis induced by high-fat diet in mice. *Journal of Hepatology* **2011**, *54* (5), 984-993; (c) Lama, A.; Pirozzi, C.; Mollica, M. P.; Trinchese, G.; Guida, F. D.; Cavaliere, G.; Calignano, A.; Raso, G. M.; Canani, R. B.; Meli, R., Polyphenol-rich virgin olive oil reduces insulin resistance and liver inflammation and improves mitochondrial dysfunction in high fat diet fed rats. *Mol Nutr Food Res* **2016**.
5. (a) Cintra, D. E.; Pauli, J. R.; Araujo, E. P.; Moraes, J. C.; de Souza, C. T.; Milanski, M.; Morari, J.; Gambero, A.; Saad, M. J.; Velloso, L. A., Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. *J Hepatol* **2008**, *48* (4), 628-37; (b) Park, S.; Choi, Y.; Um, S. J.; Yoon, S. K.; Park, T., Oleuropein attenuates hepatic steatosis induced by high-fat diet in mice. *J Hepatol* **2011**, *54* (5), 984-93; (c) Oliveira, V.; Marinho, R.; Vitorino, D.; Santos, G.; Moraes, J.; Dragano, N.; Sartori-Cintra, A.; Pereira, L.; Catharino, R.; da Silva, A., Diets Containing  $\alpha$ -linolenic ( $\omega$ 3) or oleic ( $\omega$ 9) fatty acids rescues obese mice from insulin resistance. *Endocrinology* **2015**, *156* (11), 4033-4046.

6. (a) Meli, R.; Mattace Raso, G.; Irace, C.; Simeoli, R.; Di Pascale, A.; Paciello, O.; Pagano, T. B.; Calignano, A.; Colonna, A.; Santamaria, R., High Fat Diet Induces Liver Steatosis and Early Dysregulation of Iron Metabolism in Rats. *PloS one* **2013**, *8* (6), e66570; (b) Zhukova, N. V.; Novgorodtseva, T. P.; Denisenko, Y. K., Effect of the prolonged high-fat diet on the fatty acid metabolism in rat blood and liver. *Lipids in health and disease* **2014**, *13*, 49; (c) Caldwell, S. H.; Swerdlow, R. H.; Khan, E. M.; Iezzoni, J. C.; Hespdenheide, E. E.; Parks, J. K.; Parker, W. D., Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of hepatology* **1999**, *31* (3), 430-434.
7. Vial, G.; Dubouchaud, H.; Couturier, K.; Cottet-Rousselle, C.; Taleux, N.; Athias, A.; Galinier, A.; Casteilla, L.; Leverve, X. M., Effects of a high-fat diet on energy metabolism and ROS production in rat liver. *J Hepatol* **2011**, *54* (2), 348-56.
8. De Souza, C. T.; Araujo, E. P.; Bordin, S.; Ashimine, R.; Zollner, R. L.; Boschero, A. C.; Saad, M. J.; Velloso, L. A., Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* **2005**, *146* (10), 4192-9.
9. (a) Kawai, T.; Akira, S., TLR signaling. *Cell death and differentiation* **2006**, *13* (5), 816-25; (b) Santos, G. A.; Moura, R. F.; Vitorino, D. C.; Roman, E. A.; Torsoni, A. S.; Velloso, L. A.; Torsoni, M. A., Hypothalamic AMPK activation blocks lipopolysaccharide inhibition of glucose production in mice liver. *Mol Cell Endocrinol* **2013**, *381* (1-2), 88-96.
10. Melo, A. M.; Benatti, R. O.; Ignacio-Souza, L. M.; Okino, C.; Torsoni, A. S.; Milanski, M.; Velloso, L. A.; Torsoni, M. A., Hypothalamic endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in offspring of mice dams fed high-fat diet during pregnancy and lactation. *Metabolism* **2014**, *63* (5), 682-92.
11. (a) Alam, S.; Gupta, U. D.; Alam, M.; Kabir, J.; Chowdhury, Z. R.; Alam, A. K., Clinical, anthropometric, biochemical, and histological characteristics of nonobese nonalcoholic fatty liver disease patients of Bangladesh. *Indian journal of gastroenterology : official journal of the Indian Society of Gastroenterology* **2014**; (b) Kim, S. W.; Hur, W.; Li, T. Z.; Lee, Y. K.; Choi, J. E.; Hong, S. W.; Lyoo, K. S.; You, C. R.; Jung, E. S.; Jung, C. K.; Park, T.; Um, S. J.; Yoon, S. K., Oleuropein prevents the progression of steatohepatitis to hepatic fibrosis induced by a high-fat diet in mice. *Experimental & molecular medicine* **2014**, *46*, e92; (c) Valenti, L.; Nobili, V., Deciphering the Role of omega3-Fatty Acids in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **2014**; (d) Cintra, D. E.; Ropelle, E. R.; Moraes, J. C.; Pauli, J. R.; Morari, J.; Souza, C. T.; Grimaldi, R.; Stahl, M.; Carnevalheira, J. B.; Saad, M. J.; Velloso, L. A., Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *PloS one* **2012**, *7* (1), 18.
12. Finelli, C.; Tarantino, G., Is there any consensus as to what diet or lifestyle approach is the right one for NAFLD patients? *J Gastrointest Liver Dis* **2012**, *21* (3), 293-302.

13. Stradling, C.; Hamid, M.; Taheri, S.; Thomas, N., A Review of Dietary Influences on Cardiovascular Health: Part 2: Dietary Patterns. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* **2014**, *30*, 30.
14. Wang, S.; Moustaid-Moussa, N.; Chen, L.; Mo, H.; Shastri, A.; Su, R.; Bapat, P.; Kwun, I.; Shen, C. L., Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *J Nutr Biochem* **2014**, *25* (1), 1-18.
15. Jemai, H.; Bouaziz, M.; Fki, I.; El Feki, A.; Sayadi, S., Hypolipidemic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chemico-biological interactions* **2008**, *176* (2-3), 88-98.
16. (a) de Bock, M.; Derraik, J. G.; Brennan, C. M.; Biggs, J. B.; Morgan, P. E.; Hodgkinson, S. C.; Hofman, P. L.; Cutfield, W. S., Olive (*Olea europaea* L.) leaf polyphenols improve insulin sensitivity in middle-aged overweight men: a randomized, placebo-controlled, crossover trial. *PLoS one* **2013**, *8* (3), 13; (b) Garcia-Villalba, R.; Larrosa, M.; Possemiers, S.; Tomas-Barberan, F. A.; Espin, J. C., Bioavailability of phenolics from an oleuropein-rich olive (*Olea europaea*) leaf extract and its acute effect on plasma antioxidant status: comparison between pre- and postmenopausal women. *European journal of nutrition* **2014**, *53* (4), 1015-27.
17. (a) Calvano, C. D.; Ceglie, C. D.; D'Accolti, L.; Zambonin, C. G., MALDI-TOF mass spectrometry detection of extra-virgin olive oil adulteration with hazelnut oil by analysis of phospholipids using an ionic liquid as matrix and extraction solvent. *Food chemistry* **2012**, *134* (2), 1192-8; (b) Capriotti, A. L.; Cavaliere, C.; Crescenzi, C.; Foglia, P.; Nescatelli, R.; Samperi, R.; Lagana, A., Comparison of extraction methods for the identification and quantification of polyphenols in virgin olive oil by ultra-HPLC-QToF mass spectrometry. *Food chemistry* **2014**, *158*, 392-400.
18. de Oliveira, D. N.; Ferreira, M. S.; Catharino, R. R., Rapid and simultaneous in situ assessment of aflatoxins and stilbenes using silica plate imprinting mass spectrometry imaging. *PLoS one* **2014**, *9* (3).
19. Fernandez, R.; Lage, S.; Abad-Garcia, B.; Barcelo-Coblijn, G.; Teres, S.; Lopez, D. H.; Guardiola-Serrano, F.; Martin, M. L.; Escriba, P. V.; Fernandez, J. A., Analysis of the Lipidome of Xenografts Using MALDI-IMS and UHPLC-ESI-QTOF. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2014**, *25* (7), 1237-46.
20. Zhong, X.; Zhang, Z.; Jiang, S.; Li, L., Recent advances in coupling capillary electrophoresis-based separation techniques to ESI and MALDI-MS. *Electrophoresis* **2014**, *35* (9), 1214-25.
21. de Souza, P. P.; Resende, A. M.; Augusti, D. V.; Badotti, F.; Gomes Fde, C.; Catharino, R. R.; Eberlin, M. N.; Augusti, R., Artificially-aged cachaca samples characterised by direct infusion electrospray ionisation mass spectrometry. *Food chemistry* **2014**, *143*, 77-81.
22. Prideaux, B.; Staab, D.; Stoeckli, M., Applications of MALDI-MSI to pharmaceutical research. *Methods Mol Biol* **2010**, *656*, 405-13.
23. Barrett, A. J., Transplant biomarkers ready for the clinic? *Blood* **2017**, *129* (2), 137-139.

24. Esko, T.; Hirschhorn, J. N.; Feldman, H. A.; Hsu, Y. H.; Deik, A. A.; Clish, C. B.; Ebbeling, C. B.; Ludwig, D. S., Metabolomic profiles as reliable biomarkers of dietary composition. *Am J Clin Nutr* **2017**.
25. Barnes, E. L.; Burakoff, R., New Biomarkers for Diagnosing Inflammatory Bowel Disease and Assessing Treatment Outcomes. *Inflamm Bowel Dis* **2016**, *22* (12), 2956-2965.
26. Playdon, M. C.; Moore, S. C.; Derkach, A.; Reedy, J.; Subar, A. F.; Sampson, J. N.; Albanes, D.; Gu, F.; Kontto, J.; Lassale, C.; Liao, L. M.; Mannisto, S.; Mondul, A. M.; Weinstein, S. J.; Irwin, M. L.; Mayne, S. T.; Stolzenberg-Solomon, R., Identifying biomarkers of dietary patterns by using metabolomics. *Am J Clin Nutr* **2016**.
27. Roberts, L. R., Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* **2016**, *12* (4), 252-5.
28. Sakuma, M.; Inoue, T., [Inflammatory biomarkers]. *Nihon Rinsho* **2016**, *74 Suppl 4 Pt 1*, 321-6.
29. Shukla, A. P.; Buniak, W. I.; Aronne, L. J., Treatment of obesity in 2015. *Journal of cardiopulmonary rehabilitation and prevention* **2015**, *35* (2), 81-92.
30. (a) Ferranti, P.; Roncada, P.; Scaloni, A., Foodomics - Novel insights in food and nutrition domains. *J Proteomics* **2016**, *147*, 1-2; (b) Bordoni, A.; Capozzi, F., Foodomics for healthy nutrition. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **2014**, *17* (5), 418-24; (c) Capozzi, F.; Bordoni, A., Foodomics: a new comprehensive approach to food and nutrition. *Genes Nutr* **2013**, *8* (1), 1-4.
31. Herrero, M.; Simo, C.; Garcia-Canas, V.; Ibanez, E.; Cifuentes, A., Foodomics: MS-based strategies in modern food science and nutrition. *Mass Spectrom Rev* **2012**, *31* (1), 49-69.
32. Farrell, G. C.; Larter, C. Z., Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* **2006**, *43* (S1), S99-S112.
33. (a) Hughes, R., Fatty Liver Disease NASH and Related Disorders. LWW: 2006; (b) Brunt, E. M.; Janney, C. G.; Di Bisceglie, A. M.; Neuschwander-Tetri, B. A.; Bacon, B. R., Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *The American journal of gastroenterology* **1999**, *94* (9), 2467-2474.
34. Marchesini, G.; Bugianesi, E.; Forlani, G.; Cerrelli, F.; Lenzi, M.; Manini, R.; Natale, S.; Vanni, E.; Villanova, N.; Melchionda, N., Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* **2003**, *37* (4), 917-923.
35. Lowell, B. B.; Shulman, G. I., Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* **2005**, *307* (5708), 384-387.
36. Willner, I. R.; Waters, B.; Patil, S. R.; Reuben, A.; Morelli, J.; Riely, C. A., Ninety patients with nonalcoholic steatohepatitis: insulin resistance, familial tendency, and severity of disease. *The American journal of gastroenterology* **2001**, *96* (10), 2957-2961.
37. Wanless, I. R.; Lentz, J. S., Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology* **1990**, *12* (5), 1106-1110.
38. (a) Kral, J. G.; Schaffner, F.; Pierson Jr, R. N.; Wang, J., Body fat topography as an independent predictor of fatty liver. *Metabolism* **1993**, *42* (5), 548-551; (b)

- Thomas, E.; Hamilton, G.; Patel, N.; O'Dwyer, R.; Dore, C.; Goldin, R.; Bell, J.; Taylor-Robinson, S., Hepatic triglyceride content and its relation to body adiposity: a magnetic resonance imaging and proton magnetic resonance spectroscopy study. *Gut* **2005**, *54* (1), 122-127.
39. Matsuzawa, N.; Takamura, T.; Kurita, S.; Misu, H.; Ota, T.; Ando, H.; Yokoyama, M.; Honda, M.; Zen, Y.; Nakanuma, Y., Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology* **2007**, *46* (5), 1392-1403.
40. Cheng, Q.; Li, N.; Chen, M.; Zheng, J.; Qian, Z.; Wang, X.; Huang, C.; Xu, S.; Shi, G., Cyclooxygenase-2 Promotes Hepatocellular Apoptosis by Interacting with TNF- $\alpha$  and IL-6 in the Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis in Rats. *Digestive diseases and sciences* **2013**, *58* (10), 2895-2902.
41. Uysal, S.; Armutcu, F.; Aydogan, T.; Akin, K.; Ikizek, M.; Yigitoglu, M. R., Some inflammatory cytokine levels, iron metabolism and oxidant stress markers in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *Clinical biochemistry* **2011**, *44* (17), 1375-1379.
42. Baeck, C.; Wehr, A.; Karlmark, K. R.; Heymann, F.; Vucur, M.; Gassler, N.; Huss, S.; Klussmann, S.; Eulberg, D.; Luedde, T., Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury. *Gut* **2012**, *61* (3), 416-426.
43. Te Sligte, K.; Bourass, I.; Sels, J.; Driessen, A.; Stockbrügger, R.; Koek, G., Non-alcoholic steatohepatitis: review of a growing medical problem. *European journal of internal medicine* **2004**, *15* (1), 10-21.
44. Cusi, K., Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology* **2012**, *142* (4), 711-725. e6.
45. Kim, S. W.; Hur, W.; Li, T. Z.; Lee, Y. K.; Choi, J. E.; Hong, S. W.; Lyoo, K.-S.; You, C. R.; Jung, E. S.; Jung, C. K., Oleuropein prevents the progression of steatohepatitis to hepatic fibrosis induced by a high-fat diet in mice. *Experimental & molecular medicine* **2014**, *46* (4), e92.
46. Komaki, E.; Yamaguchi, S.; Maru, I.; Kinoshita, M.; Takehi, K.; Ohta, Y.; Tsukada, Y., Identification of Anti- $\alpha$ -Amylase Components from Olive Leaf Extracts. *Food Science and Technology Research* **2003**, *9* (1), 35-39.
47. Tuck, K. L.; Hayball, P. J., Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *The Journal of nutritional biochemistry* **2002**, *13* (11), 636-644.
48. Bravo, L., Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews* **1998**, *56* (11), 317-333.
49. Oi-Kano, Y.; Kawada, T.; Watanabe, T.; Koyama, F.; Watanabe, K.; Senbongi, R.; Iwai, K., Oleuropein, a phenolic compound in extra virgin olive oil, increases uncoupling protein 1 content in brown adipose tissue and enhances noradrenaline and adrenaline secretions in rats. *Journal of nutritional science and vitaminology* **2008**, *54* (5), 363-370.
50. (a) Gómez Caravaca, A. M.; Carrasco Pancorbo, A.; Cañabate Díaz, B.; Segura Carretero, A.; Fernández Gutiérrez, A., Electrophoretic identification and quantitation of compounds in the polyphenolic fraction of extra-virgin olive oil. *Electrophoresis*

- 2005**, 26 (18), 3538-3551; (b) Yang, H.; Irudayaraj, J., Comparison of near-infrared, Fourier transform-infrared, and Fourier transform-Raman methods for determining olive pomace oil adulteration in extra virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **2001**, 78 (9), 889-895; (c) Calvano, C. D.; Ceglie, C. D.; D'Accolti, L.; Zambonin, C. G., MALDI-TOF mass spectrometry detection of extra-virgin olive oil adulteration with hazelnut oil by analysis of phospholipids using an ionic liquid as matrix and extraction solvent. *Food chemistry* **2012**, 134 (2), 1192-1198; (d) García-Villalba, R.; Carrasco-Pancorbo, A.; Oliveras-Ferraro, C.; Vázquez-Martín, A.; Menéndez, J. A.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A., Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils with anticancer properties by a rapid and resolutive LC-ESI-TOF MS method. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **2010**, 51 (2), 416-429.
51. (a) Catharino, R. R.; Haddad, R.; Cabrini, L. G.; Cunha, I. B.; Sawaya, A. C.; Eberlin, M. N., Characterization of vegetable oils by electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting: classification, quality, adulteration, and aging. *Analytical chemistry* **2005**, 77 (22), 7429-7433; (b) Ouni, Y.; Taamalli, A.; Gómez-Caravaca, A. M.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; Zarrouk, M., Characterisation and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils according to their geographical origin by a rapid and resolutive LC-ESI-TOF MS method. *Food chemistry* **2011**, 127 (3), 1263-1267; (c) de Oliveira, D. N.; de Bona Sartor, S.; Damário, N.; Gollücke, A. B.; Catharino, R., Antioxidant activity of grape products and characterization of components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Measure* **2014**, 8 (1), 9-14.
52. Lopez, S.; Bermudez, B.; Montserrat-de, I. P. S.; Jaramillo, S.; Varela, L.; Ortega-Gomez, A.; Abia, R.; Muriana, F., Membrane composition and dynamics: a target of bioactive virgin olive oil constituents. *Biochim Biophys Acta*. **2014**, 1838 (6), 1638-56. doi 10.1016/j.bbamem.2014.01.007. Epub 2014 Jan 16.
53. Cintra, D. E.; Ropelle, E. R.; Moraes, J. C.; Pauli, J. R.; Morari, J.; de Souza, C. T.; Grimaldi, R.; Stahl, M.; Carvalheira, J. B.; Saad, M. J.; Velloso, L. A., Unsaturated Fatty Acids Revert Diet-Induced Hypothalamic Inflammation in Obesity. *PLoS ONE* **2012**, 7 (1), e30571.
54. (a) Pfeiffer, S.; Vielhaber, G.; Vietzke, J.-P.; Wittern, K.-P.; Hintze, U.; Wepf, R., High-pressure freezing provides new information on human epidermis: simultaneous protein antigen and lamellar lipid structure preservation. Study on human epidermis by cryoimmobilization. *Journal of investigative dermatology* **2000**, 114 (5), 1030-1038; (b) Keles, M.; Demir, Y.; Altuntas, I.; Umudum, Z.; Bakan, E., Determination of free fatty acid composition in plasma membranes of neutrophils in diabetics. *Turkish Journal of Medical Sciences* **2000**, 30 (5), 465-468; (c) Hyötyläinen, T.; Mattila, I.; Wiedmer, S. K.; Koivuniemi, A.; Taskinen, M.-R.; Yki-Järvinen, H.; Orešič, M., Metabolomic analysis of polar metabolites in lipoprotein fractions identifies lipoprotein-specific metabolic profiles and their association with insulin resistance. *Molecular bioSystems* **2012**, 8 (10), 2559-2565.

55. Hansen, H. S.; Jensen, B., Essential function of linoleic acid esterified in acylglucosylceramide and acylceramide in maintaining the epidermal water permeability barrier. Evidence from feeding studies with oleate, linoleate, arachidonate, columbinate and  $\alpha$ -linolenate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* **1985**, *834* (3), 357-363.
56. (a) Clarke, S. D.; Romsos, D. R.; Leveille, G. A., Differential effects of dietary methyl esters of long-chain saturated and polyunsaturated fatty acids on rat liver and adipose tissue lipogenesis. *The Journal of nutrition* **1977**, *107* (7), 1170-1181; (b) Clarke, S.; Jump, D., Fatty acid regulation of gene expression: a unique role for polyunsaturated fats. *Nutrition and Gene Expression* Eds Berdanier, C. & Hargrove, J.L. CRC Press, Boca Raton, Florida **1993**, 227-246; (c) Clarke, S. D.; Jump, D. B., Polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Lipids* **1996**, *31* (1), S7-S11; (d) Liimatta, M.; Towle, H. C.; Clarke, S.; Jump, D. B., Dietary polyunsaturated fatty acids interfere with the insulin/glucose activation of L-type pyruvate kinase gene transcription. *Molecular Endocrinology* **1994**, *8* (9), 1147-1153.
57. (a) Reeves, H. L.; Thompson, M. G.; Dack, C. L.; Burt, A. D.; Day, C. P., The role of phosphatidic acid in platelet-derived growth factor-induced proliferation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* **2000**, *31* (1), 95-100; (b) Possmayer, F.; Scherphof, G.; Dubbelman, T.; Van Golde, L.; Van Deenen, L., Positional specificity of saturated and unsaturated fatty acids in phosphatidic acid from rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* **1969**, *176* (1), 95-110.
58. (a) Marinetti, G.; Stotz, E., Chromatography of phosphatides on silicic acid impregnated paper. *Biochimica et biophysica acta* **1956**, *21* (1), 168-170; (b) Dawson, R., The measurement of  $^{32}$ P labelling of individual cephalins and lecithin in a small sample of tissue. *Biochimica et biophysica acta* **1954**, *14*, 374-379.
59. (a) Davies, P.; Bailey, P. J.; Goldenberg, M. M.; Ford-Hutchinson, A. W., The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. *Annual review of immunology* **1984**, *2* (1), 335-357; (b) Ferre, N.; Claria, J., New insights into the regulation of liver inflammation and oxidative stress. *Mini reviews in medicinal chemistry* **2006**, *6* (12), 1321-1330.
60. (a) Dandona, P.; Aljada, A.; Bandyopadhyay, A., Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends in immunology* **2004**, *25* (1), 4-7; (b) Furukawa, S.; Fujita, T.; Shimabukuro, M.; Iwaki, M.; Yamada, Y.; Nakajima, Y.; Nakayama, O.; Makishima, M.; Matsuda, M.; Shimomura, I., Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation* **2004**, *114* (12), 1752-1761.
61. (a) Halestrap, A. P., What is the mitochondrial permeability transition pore? *Journal of molecular and cellular cardiology* **2009**, *46* (6), 821-831; (b) Kowaltowski, A. J.; Castilho, R. F.; Vercesi, A. E., Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS letters* **2001**, *495* (1), 12-15.
62. Nagle, C. A.; Klett, E. L.; Coleman, R. A., Hepatic triacylglycerol accumulation and insulin resistance. *Journal of lipid research* **2009**, *50* (Supplement), S74-S79.

63. Hur, W. H.; Lee, Y. K.; Hong, S. W.; Yoon, S. K., Free Paper Session: Liver Surgery/Basic; Oleuropein attenuates free fatty acid-induced hepatic Lipotoxicity through reducing mitochondrial damage in hepatocyte in vitro NAFLD model (초). *대한간학회지* **2011**, *17* (3s), 47-47.

## **ANEXO 1**

Protocolo Comissão de Ética no uso de Animais



1:3



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Estudo de diferentes dietas para a proteção contra esteato-hepatite utilizando MALDI" (protocolo nº 3416-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino / Mônica Siqueira Ferreira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 09 de junho de 2014.

Campinas, 09 de junho de 2014.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira  
Presidente

Fátima Alonso  
Secretária Executiva

2:3



Eu, Professor Rodrigo Ramos Catharino venho através desta informar que a tese do aluno de doutorado Gustavo Aparecido dos Santos, foi obtida através de resultados e dados provenientes do protocolo aprovado para uso de animais em pesquisa (**Protocolo N° 3416-1 Intitulado: Estudo de diferentes tipos de dietas para a proteção contra esteato-hepatite usando MALDI**), sobre minha responsabilidade. Sendo esse mesmo protocolo supra citado, utilizado no artigo: Identification of compounds from high-fat and extra virgin olive oil-supplemented diets in whole mouse liver extracts and isolated mitochondria using mass spectrometry, onde o aluno Gustavo Aparecido dos Santos é um principal autor.

Campinas, 01 de Agosto de 2016.

A handwritten signature in black ink, which appears to read "Rodrigo Ramos Catharino", is written over a horizontal line. The signature is fluid and cursive.

Rodrigo Ramos Catharino

- Os resultados do protocolo nº3021-1 foram inconclusivos e por esse motivo não foram adicionados na tese.



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Lipidômica aplicada ao Sistema Nervoso Central: A participação dos Órgãos Circunventriculares e a barreira hematoencefálica na obesidade" (protocolo nº 3021-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino / Gustavo Aparecido Dos Santos, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 09 de maio de 2013.

Campinas, 09 de maio de 2013.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359  
E-mail: [comisib@unicamp.br](mailto:comisib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

**ANEXO 2**

(Permissão de uso do artigo)



RightsLink®

Home

Account  
Info

Help



**Title:** Identification of compounds from high-fat and extra virgin olive oil-supplemented diets in whole mouse liver extracts and isolated mitochondria using mass spectrometry

**Author:** Gustavo Aparecido Santos, Mônica Siqueira Ferreira, Diogo Noin Oliveira, Vanessa Oliveira, Edilene S. Siqueira-Santos, Dennys Esper Corrêa Cintra, Roger Frigério Castilho, Lício Augusto Velloso, Rodrigo Ramos Catharino

**Publication:** Journal of Mass Spectrometry

**Publisher:** John Wiley and Sons

**Date:** Jun 8, 2015

Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Ltd.

Logged in as:  
Rodrigo Catharino  
Account #:  
3001043854

LOGOUT

### Order Completed

Thank you for your order.

This Agreement between Rodrigo R Catharino ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

Your confirmation email will contain your order number for future reference.

### [Printable details.](#)

License Number	4032161507679
License date	Jan 18, 2017
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Journal of Mass Spectrometry
Licensed Content Title	Identification of compounds from high-fat and extra virgin olive oil-supplemented diets in whole mouse liver extracts and isolated mitochondria using mass spectrometry
Licensed Content Author	Gustavo Aparecido Santos, Mônica Siqueira Ferreira, Diogo Noin Oliveira, Vanessa Oliveira, Edilene S. Siqueira-Santos, Dennys Esper Corrêa Cintra, Roger Frigério Castilho, Lício Augusto Velloso, Rodrigo Ramos Catharino
Licensed Content Date	Jun 8, 2015
Licensed Content Pages	8
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Print and electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	No
Title of your thesis / dissertation	Efeito da suplementação com azeites de oliva em dietas hiperlipídicas em esteatose hepática não-alcoólica
Expected completion date	Jan 2017
Expected size (number of pages)	90
Requestor Location	Rodrigo R Catharino Rua Cinco de Junho 350  Campinas, SP 13083877 Brazil Attn: Rodrigo R Catharino
Publisher Tax ID	EU826007151
Customer VAT ID	BR21406322814
Billing Type	Invoice

30/01/2017

Gmail - Fwd: Thank you for your order with RightsLink / John Wiley and Sons



Gustavo Ap. Santos &lt;gustavo.ap89@gmail.com&gt;

## Fwd: Thank you for your order with RightsLink / John Wiley and Sons

1 mensagem

**Diogo Oliveira** <diogo.1986@gmail.com>  
 Para: "Gustavo Ap. Santos" <gustavo.ap89@gmail.com>

27 de janeiro de 2017 11:22

----- Forwarded message -----

From: **Rodrigo Ramos Catharino** <rrcatharino@gmail.com>  
 Date: 2017-01-27 11:20 GMT-02:00  
 Subject: Fwd: Thank you for your order with RightsLink / John Wiley and Sons  
 To: "diogo.1986@gmail.com" <diogo.1986@gmail.com>

----- Forwarded message -----

From: <no-reply@copyright.com>  
 Date: 2017-01-18 22:08 GMT-02:00  
 Subject: Thank you for your order with RightsLink / John Wiley and Sons  
 To: rrcatharino@gmail.com



### Thank you for your order!

Dear Prof. Rodrigo Catharino,

Thank you for placing your order through Copyright Clearance Center's RightsLink® service.

#### Order Summary

Order Date: Jan 18, 2017  
 Order Number: 4032161507679  
 Publication: Journal of Mass Spectrometry  
 Title: Identification of compounds from high-fat and extra virgin olive oil-supplemented diets in whole mouse liver extracts and isolated mitochondria using mass spectrometry  
 Type of Use: Dissertation/Thesis  
 Order Total: 0.00 USD

View or print complete [details](#) of your order and the publisher's terms and conditions.

<https://mail.google.com/mail/u/0/?ui=2&ik=64d3cbd2d0&view=pt&search=inbox&th=159e017a29696e75&siml=159e017a29696e75>

1/2

30/01/2017



Gmail - Fwd: Thank you for your order with RightsLink / John Wiley and Sons

**Please note:** You will be invoiced within 24 hours.

Sincerely,

Copyright Clearance Center

How was your experience? Fill out this [survey](#) to let us know.

<p>Tel: +1-855-239-3415 / +1-978-646-2777 customer@copyright.com <a href="https://myaccount.copyright.com">https://myaccount.copyright.com</a></p>	 Copyright Clearance Center  RightsLink®
--	---

## ANEXO 3

(Declaração de permissão de uso do artigo na tese e respeito ao direito autoral transferido à editora).



### UNIVERSITY OF CAMPINAS

Prof. Rodrigo Ramos Catharino  
 INNOVARE Biomarkers Laboratory  
 University of Campinas  
 Campinas, SP  
 e-mail: rrc@fcm.unicamp.br  
 Phone: 55-19-35219138

Campinas, 16/12/2016

Journal of Mass Spectrometry

Dear, **Joseph Tomaszewski**

Senior Account Manager  
 John Wiley & Sons Inc.  
 111 River Street  
 Hoboken, NJ 07030  
 USA  
 Phone: 201-748-8895  
 Email: jtomaszews@wiley.com  
 general inquiries to: ads\_science@wiley.com

We are writing to you in order to obtain a permission to re-use material included in the following article published in Journal of Mass Spectrometry for inclusion in my Ph.D. thesis.

The article that will be used is: *"Identification of compounds from high-fat and extra virgin olive oil-supplemented diets in whole mouse liver and mitochondrial extracts using mass spectrometry."* by Gustavo Aparecido dos Santos, Mônica Siqueira Ferreira, Diogo Noin de Oliveira, Vanessa de Oliveira, Edilene S. Siqueira-Santos, Dennys Esper Corrêa Cintra, Roger Frigério Castilho, Lício Augusto Velloso and Rodrigo Ramos Catharino. 2015 Jul;50(7):951-8. doi: 10.1002/jms.3609. PMID: 26349651 DOI: 10.1002/jms.3609.

This thesis is for academic use only and it is not going to be used for commercial, advertising or promotion purposes. I am planning to make 02 printed copies of my thesis/dissertation. One of these copies will be displayed at The University (Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brazil) library. In addition, an electronic version of the thesis will be made available at the University Thesis Database. I thank you very much in advance.

Best regards.

Gustavo Aparecido dos Santos  
 gustavo.ap89@gmail.com

Dr. Rodrigo Ramos Catharino  
 rrcatharino@gmail.com