RAFAEL CELESTINO DE SOUZA

Estudo do metaboloma salivar e sua associação com a doença periodontal em pacientes com síndrome de Down

São Paulo
2015

RAFAEL CELESTINO DE SOUZA

Estudo do metaboloma salivar e sua associação com a doença periodontal em pacientes com síndrome de Down

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientador: Profa. Dra. Ana Lídia Ciamponi

Coorientador: Pesquisadora Dra. Maria Anita Mendes

São Paulo
2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Souza, Rafael Celestino de.
Estudo do metaboloma salivar e sua associação com a doença periodontal em pacientes com síndrome de Down / Rafael Celestino de Souza ; orientador Ana Lídia Ciamponi; coorientador Maria Anita Mendes. -- São Paulo, 2015.

142 p. : fig., tab., graf. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Odontopediatria. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Doenças periodontais. 2. Metaboloma. 3. Síndrome de Down. 4. Metabólitos. I. Ciamponi, Ana Lídia. II. Mendes, Maria Anita. III. Título.

Souza RC. Estudo do metaboloma salivar e sua associação com a doença periodontal em pacientes com síndrome de Down. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Aprovado em ___/___/2015

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a). _____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof.(a) Dr.(a). _____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof.(a) Dr.(a). _____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof.(a) Dr.(a). _____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof.(a) Dr.(a). _____

Instituição:_____ Julgamento:_____

DEDICATÓRIA

*Aos meus amados pais **Francisco** e **Benedita**, pelos valores de minha criação, lições de honestidade e humildade que nenhuma universidade seria capaz de oferecer. Por não medirem esforços para realização de meus sonhos, sendo os incentivadores mais sinceros. Espero um dia ser um pouco, da imagem que realmente enxergam de mim. É um privilégio ser filho de vocês. A minhas irmãs, **Julliana** e **Tatiana**, por compreenderem a minha ausência, demonstrarem o orgulho e carinho que tem por mim.*

Obrigado por tudo.

§

*Aos sobrinhos **Bernardo** e **Pietra**, que alegram a minha vida independente da situação que eu esteja vivendo. O amor que sinto por vocês é algo único e irracional, espero poder sempre estar disposto para vocês.*

§

*À minha querida esposa **Sophie**, fonte infindável de inspiração e apoio. Toda descoberta que eu fizer, nunca será tão grandiosa, quanto o amor que descobri em você.* Por dividir comigo todos os momentos, especiais ou aflitivos, sempre me encorajando a ir em frente e me mostrando o quanto eu posso fazer de diferença neste meio. *Para você, não seria necessário uma dedicatória nesta página.. pois todas as letras que seguem, não teriam sentido se não fossem para você.*

"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.

Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes".

Marthin Luther King

AGRADECIMENTOS

*À **Deus**, que com sua maravilhosa graça, me proporcionou tudo o que tenho até hoje. Uma família maravilhosa, sem a qual não teria apoio para continuar; um ofício, o qual posso investir para contribuir com o próximo; e inspiração, para continuar a viver, sonhar e buscar sabedoria.*

"Pois Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas"

Romanos 11:36

*A querida **Profa. Dra. Ana Lídia Ciamponi**, que quem conhece, sabe o quanto especial ela é. Agradeço muito por Deus por ter guiado meu caminho até você, que me acolheu dando grande liberdade de trabalho. Sempre admirei o modo como você se relaciona com a sua família, o cuidado que tem com a meninas e também com seus pais. Se tem alguma coisa que me identifico muito com você, é realmente isso. Claro, a importância do consultório e poder gerar conhecimento dentro da área de Pacientes Especiais também nos aproximam muito.*

Acredito que você foi a pessoa certa, no momento certo e com a sua confiança pude trilhar um caminho de descobertas autonomamente – sendo uma experiência enriquecedora. Lembro-me que no primeiro dia que nos conhecemos, você me perguntou: "Você é especialista em Odontopediatria?". E eu, nervoso e apreensivo disse: - não. E você logo respondeu: "Então, sairá daqui um". E não foi que como um passe de mágica, meu consultório encheu de crianças, participei das clínicas de graduação e diversos laboratórios, sendo convidado para ministrar diversas aulas nos cursos de odontopediatria. Não sou pretensioso de dizer que me tornei um, mas que cheguei perto, com certeza. Obrigado por todas as oportunidades e direções, certamente, estou terminando este processo muito melhor do que quando o comecei. Que Deus sempre abençoe seu caminho e seus planos. A minha gratidão.

*À **Universidade de São Paulo** e ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas – FOUSP**, por fomentar uma experiência completa nesta etapa acadêmica que concluo.*

*Ao **Prof. Fausto**, um pesquisador inspirador! Obrigado por me auxiliar a quebrar tantos dogmas, contestar as verdades impostas, auxiliar a apresentar resultados de qualidade e compartilhar a paixão por.... cervejas! Trabalhar próximo das salas de referências em Odontopediatria como você, só aumentaram a minha expectativa de realizar um bom estudo. Obrigado por me enriquecer com seus ensinamentos constantes e me divertir com seus comentários únicos!*

*À **Profa. Mariana**, muito querida, que com seu empenho e dedicação, também compartilhou seus conhecimentos e amizade. Admiro muito seu trabalho e agradeço de poder ter partilhado dele, nos diversos laboratórios, que muito me agregaram, e também nas disciplinas. Pela sua gratidão em todos os momentos, inclusive nos sociais, em que sempre foi agradável e acolhedora. Acompanhar sua produção de maior impacto, o Fefê..rs, também foi muito especial. Obrigado Mari e Caio.*

*À **Profa. Daniela**, ou Dani, que sempre querida, inspira com suas diversas publicações, bom humor e lifestyle. Sempre me sinto bem perto de você! Fui seu aluno na graduação (entre nós) e poder participar de mais uma etapa acadêmica aprendendo com você é motivo de gratidão. Que sua luz continue sempre brilhando. Muito obrigado.*

*Ao **Prof. Marcelo Bonecker**, que ao participar de minha banca de mestrado, me incentivou a continuar esta trajetória e me apresentou a Profa. Ana Lidia. Por acreditar na qualidade de meu trabalho e pela oportunidade, Obrigado.*

*Ao **Prof. Imparato**, muito obrigado! Tenho muita gratidão pela sua vida e por tudo o que tem me proporcionado. Um grande modelo de professor, empreendedor, inspirador, autor... e tudo indissociável, expira trabalho. Obrigado pela confiança e elogios ao meu trabalho, espero poder sempre contribuir positivamente nos cursos de Odontopediatria.*

*Aos demais professores do Departamento de Odontopediatria, **Profa. Salete**, **Profa. Marcia**, **Profa. Ana Estela**, minha admiração pelo profissionalismo e conhecimentos compartilhados durante minha formação. Espero poder continuar dividindo*

experiências acadêmicas e sociais com vocês que são referência na área e pessoas incríveis.

***À Profa. Dra. Maria Anita**, por todo esforço não medido para que este trabalho acontecesse. Seu profissionalismo é invejável, seu conhecimento admirável e sua acessibilidade tamanha. Agradeço por tornar este projeto possível, abrindo portas e confiando seu laboratório (construído com muito esforço) para que eu pudesse executar todas as análises necessárias. Por ser disposta a ouvir as dúvidas, sugestões e sempre retornar em prazo recorde. Eu aprendi muito, mas muito mesmo com você. Não tenho palavras suficientes para agradecer, porém, espero fazê-lo com a conclusão deste trabalho.*

*À **Meiriellen**, por todo auxilio nos preparos das análises desta tese e por me ensinar tanto sobre a prática laboratorial. Desejo muito sucesso na sua carreira acadêmica.*

Aos colegas da Pós-Graduação, pela agradável e produtiva companhia durante estes quase 3 anos. Independente da turma, todos vocês são muito queridos!

*Aos "Specials" – **Vanessinha, Helena, Levy e Taci** que compartilharam das mesmas aflições e momentos agradáveis, grandes colegas de orientação. Que possamos continuar o trabalho iniciado e a parceria ao longo de nossas trajetórias. **Heleninha**, seu coração de ouro e sinceridade, são sempre lembrados por mim. Você fez muita falta quando concluiu seu trabalho.*

*Aos que já concluíram estas etapas e não tenho muito mais contato, porém, os acompanho nas redes e admiro o trabalho continuado, **Cris Murakami, Dani Bittar, Jenny, Thathi Lenzi e Tuca**. Obrigado pelo incentivo.*

*Aos Queridos colegas de convivência diária, **Caleb, Carol, Edu, Evelyn, Gabi, Gustavo, Pati, Renatinha, Jú Mattos, Aline, Carmela, Deise, Isabel, Laysa, Camila, Thaís, Fê e Muri**. Sou grato a Deus por ter a oportunidade de aprender um pouco com cada um de vocês. Por rirem das minhas palhaçadas, por me incentivarem e acreditarem no meu trabalho, por tornar completo um processo de*

pós-graduação. Torço muito pelo sucesso de cada um de vocês e uma experiência enriquecedora neste programa. Muito obrigado.

*À querida **Tamara**, grande amiga! Não sei o porque ou como aconteceu.. mas você é uma daquelas pessoas que simplesmente queremos bem. Poderia te agradecer por inúmeros motivos, por me receber tão bem no local onde não conhecia ninguém; por me ajudar a realizar estáticas para o seminário; por lembrar de mim em cada viagem; por me convidar para ministrar aulas; por dividir comigo suas expectativas e conquistas. Mas é por você, me incluir, me fazer sentir parte do grupo e de modo especial mostrar que tenho um lugar reservado que sou muito grato. Você que sempre diz que as pessoas são presentes de Deus, eu reforço, é verdade e você é um destes presentes especiais que recebi. Que possamos sempre brindar nossa amizade, nossas produções e felicidades. Obrigado Master!*

*À querida **Isa**, por compartilhar uma amizade muito além dos conhecimentos científicos. Obrigado pela confiança em diversos momentos, pelas risadas e também pelas lágrimas, pelas diversas mensagens trocadas e ligações. Acho que construímos uma amizade daquelas que não precisamos falar muito, mas podemos contar de olhos fechados. Os meus desejos para você sempre serão os melhores. Você com certeza é minha querida Parça!*

*Às queridas **Thata Gimenez, Ju Kimura e Dani Hesse** – que são pessoas formidáveis que carregarei sempre em meu coração. Tão diferentes, mas tão especiais, nunca negavam uma conversa de corredor que durava longos minutos. Thata – por sua generosidade e confiança; Juju – pelas emoções sinceras e votos mútuos de sucesso; Dani Hesse – pelos valores lindos e humor indescritível. Me alegrava o dia, quando chegava e lá estavam pessoas que poderia trocar incertezas, dar risadas e planejar o futuro. Sou grato por vocês terem feito parte da minha formação.*

*Ao querido **Juan**, por me mostrar que é possível concluir a etapa acadêmica com um sorriso no rosto, mesmo com diversas dificuldades. Obrigado por toda amizade, pelas cervejas aos finais de semana e por dividir momentos de ensino juntos.*

Obrigado pelos auxílios com os trabalhos, que faz com tanto cuidado. Juanito, hoje é meu dia de "morrer" rs!

*À querida **Karlinha**, que com sua empolgação contagiante se tornou uma grande amiga. Nossas conversas profundas e inteligentes sempre acabavam em risadas. Muito bom conviver com você!!*

*À **Audrey**, pelos auxílios durante as consultas clínicas deste estudo. E pela parceria em seu trabalho de iniciação cientifica. Foi um prazer poder conduzir este trabalho com você.*

*À querida e eterna turma de Odontopediatria da UNIP Campinas – **Lucila, Cássio, Tamara e Ana Flávia**, por serem incríveis parceiros – os melhores. Grato por que me escolheram para agregar conhecimento e confiaram a mim o ensino da Odontopediatria – me fazendo acreditar que eu poderia fâze-lo. Pelas diversas madrugadas de segunda-feira recheadas de histórias familiares, tragicomédias, planejamentos e sono....muito sono. Vocês com certeza marcaram minha vida, e foram a grande recompensa desta história – amigos. Muito obrigado pelo conhecimento e conselhos despendidos neste tempo, me sinto muito honrado em ter trabalhado com vocês.*

*Ao **Prof. Elcio**, por ser o responsável pelo início da minha vida acadêmica. Que acreditou em mim, ainda na graduação, investindo com conhecimento e oportunidades que me abriram portas para chegar onde estou. Por me fazer enxergar a minha paixão pela área de cuidados a Pacientes Especiais e confiar a mim a extensão deste ensino. Foi uma honra lecionar na universidade em que me formei, e isso foi possível devido a sua colaboração. Serei eternamente grato pelas experiências que pude viver através da Universidade Paulista, mesmo hoje não integrando mais seu corpo docente. Obrigado.*

*À Profa. **Adriana Lira Ortega**, que inspira e ensina com muita dedicação duas áreas que conquistaram meu coração, odontopediatria e pacientes especiais. Obrigado pela amizade, apoio e confiança, que muitas vezes é expressada através dos convites para aulas. Você um grande exemplo de profissional, afinal você é TOP!*

Aos meus queridos amigos-irmãos, ***Philipe, Gabi, Priscila, Stéphanie e Yuri,*** *que sonham comigo esta etapa da minha carreira. Obrigado por todo apoio sempre e por serem incentivadores em que posso acreditar.*

Ao ***Instituto Casa do Todos*** *e especialmente à querida* ***Mirella****, que compartilham vivências profundas que inspiram a qualquer um que os conhecem. Obrigado pela confiança que expressam sobre meu atendimento aos queridos pacientes que assisto.*

Aos queridos ***Pacientes*** *do Centro de Atendimento a Pacientes Especiais (CAPE-FOUSP) e da clínica de Odontopediatria, que prontamente aceitaram participar desta pesquisa, mesmo que com dificuldades. Vocês são parte deste projeto e motivação para continuação dos mesmos. Obrigado.*

Às queridas secretárias da D'SOUZA Saúde, ***Mônica e Luana****, que com grande competência e companheirismo, cuidaram de meu consultório e resolveram diversos problemas da melhor forma. A ajuda de vocês em todo este tempo foi fundamental para este trabalho. Muito Obrigado!*

Aos queridos e prestativos funcionários do Departamento de Odontopediatria, ***Anne****,* ***Antônio****,* ***Fátima****,* ***Julio e Marize****. Agradeço por todo o carinho despendido e auxilio nos momentos em que precisei. Das brincadeiras de corredor até os processos mais burocráticos. Muito obrigado.*

Aos queridos ***Alunos*** *de aperfeiçoamento, especialização e mestrado em Odontopediatria e Pacientes Especias, da Universidade Paulista, FUNDECTO e da Faculdade São Leopoldo Mandic. Muito obrigado por me incentivarem a persistir na vida docente.*

A ***CNPq****, pela bolsa concedida.*

"Se não podes entender, crê para que entendas. A fé precede, o intelecto segue"

Agostinho de Hipona

"É preciso força pra sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê".

Los Hermanos

RESUMO

Souza RC. Estudo do metaboloma salivar e sua associação com a doença periodontal em pacientes com síndrome de Down [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

Os pacientes com Síndrome de Down (SD) possuem grande incidência de doença periodontal (DP), caracterizada por um curso precoce e com maior severidade. O estudo de metaboloma pode contribuir para o entendimento deste curso da doença, identificando possíveis metabólitos como biomarcadores nestes indivíduos. Para entender o perfil metabolômico dos indivíduos com síndrome de Down e a sua relação com a doença periodontal, realizamos a identificação de metabólitos salivares de adolescentes e adultos jovens, entre 12 e 21 anos, ambos os gêneros. Foram coletados dados sobre o estado geral de saúde e realizados exames clínicos bucais, como índice de higiene oral simplificado, sangramento e profundidade de sondagem. Para a análise do metaboloma foi coletada amostra de saliva não estimulada, analisadas por meio de cromatografia gasosa acoplada á espectrometria de massas. Saliva e fluido crevicular gengival também foram coletados para identificação microbiana através do MALDI-TOF. Os dados encontrados foram submetidos a análise estátisca por meio da Análise dos Componentes Principais (PCA) e quantificação relativa dos metabólitos foi avaliada por testes não paramétricos, Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. Foi possível observar através dos modelos de PCA separação dos indivíduos com SD e controles, independente da doença periodontal. A quantificação relativa revelou maiores níveis de glicina, l-prolina, l-leucina, l-serina, ácido palmítico, ácido pentanóico, ácido tetradecanóico, tirosina e l-fenilalanina nos grupos SD quando comparados aos controles. Controles com DP também apresentaram níveis elevados de glicina, l-alanina, l-serina e manopiranose quando comparados com controles saudáveis. A microbiota de indivíduos com SD apresentous diferenças siginificantes em relação aos individuos controles, principalmente para *Rothia dentocariosa, Staphylococcus epidermidis, Tannerella forsythia* quando avaliado a saliva e *A. Actinomycetemcomitans, Micrococcus luteus, Rothia aeria, Treponema denticola* no fluido crevicular gengival. Em conclusão, o perfil metabolômico impresso nos indivíduos com SD difere

significativamente dos indivíduos controles, independente da doença periodontal. Entretanto, os metabólitos que diferenciam indivíduos controles com e sem DP, apresentam-se elevados em todos indivíduos com SD, promovendo novos "*insights*" para o perfil metabólico relacionado a DP na SD.

Palavras-chaves: Doença periodontal, Metaboloma, Síndrome de Down, Saliva, Alanina, Glicina; Microorganismos.

ABSTRACT

Souza RC. Saliva metabolome in patients with Down syndrome and its association with periodontal disease [thesis].São Paulo:Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

Down Syndrome (DS) patients have a high incidence of periodontal disease (PD), characterized by an early course and greater severity. The metabolome study may contribute to the understanding of the disease course, identifying possible metabolites as biomarkers in these individuals. To understand the metabolomic profile of the DS and their relationship with PD, we conducted the identification of salivary metabolites of adolescents and young adults between 12 and 21 years, both genders. Data were collected on general health and was performed oral clinical examination, as the IHOS, bleeding index and probing depth. For metabolome analysis was collected unstimulated saliva sample, analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. Saliva and gingival crevicular fluid were also collected for microbial identification by MALDI-TOF. Data were submitted to analysis-statistic by PCA and relative quantification of metabolites was evaluated by Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests. It can be observed through the PCA models separation of DS groups and controls groups, regardless of periodontal disease. Relative quantification showed higher levels of glycine, L-proline, L-leucine, L-serine, palmitic acid, pentanoic acid, tetradecanoic acid, tyrosine and L-phenylalanine in the SD groups when compared to controls groups. Controls with PD also showed high levels of glycine, L-alanine, L-serine and mannopyranose compared with healthy controls. The microbiota of individuals with DS groups show significant differences compared to control groups, especially for *Rothia dentocariosa, Staphylococcus epidermidis, Tannerella forsythia* when evaluated saliva and *A. actinomycetemcomitans, Micrococcus luteus, Rothia aeria*, *Treponema denticola* in gingival crevicular fluid. In conclusion, the printed metabolomic profile in individuals with Down syndrome differs significantly from control subjects, regardless of periodontal disease. However, the metabolites that distinguish controls group with and without PD, show up high in all DS individuals, promoting new "insights" to the metabolic profile related to PD in DS.

Keywords: Periodontal diseases, Metabolome, Down syndrome, Saliva, Alanine, Glicine, Microorganism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Uma visão geral das quatro principais areas "ômicas", da genômica à metabolômica 35

Figura 2.2 - Diagrama dos principais tipos diferentes de reações metabólicas que ocorrem na célula 36

Figura 2.3 - Diagrama esquemático do fluxo de trabalho de um MALDI-TOF/MS ...44

Figura 2.4 - Valores por escore indicativos da identificação 46

Figura 4.1 - Esquema de análise microbiológica utilizando MALDI-Biotyper preconizado para este estudo 57

Figura 6.1 - Fluxograma do recrutamento de pacientes para pesquisa. 62

Figura 6.2 - Diagrama de Venn dos metabólitos salivares. 65

LISTA DE QUADROS

Quadro 4.1 - Divisão dos grupos e subgrupos da pesquisa. 49

Quadro 4.2 - Condições de análise determinadas do GC-MS. 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Classificação dos principais metabólitos em uma célula de acordo com sua estrutura química.....38

Tabela 6.1 - Distribuição e frequência das variáveis clínicas do estudo.....63

Tabela 6.2 - Distribuição dos Índice de placa e profundidade de sondagem entre indivíduos com e sem síndrome de Down 64

Tabela 6.3 - Autovalores e % de variabilidade explicada para PCA dos metabólitos de saliva presentes em pelo menos 20% da amostra 66

Tabela 6.4 - Autovalores e % de variabilidade explicada para PCA dos metabólitos de saliva dos grupos SD-DP e SD+DP 70

Tabela 6.5 - Autovalores e % de variabilidade explicada para PCA dos metabólitos de saliva dos grupos SD+DP e C+DP 72

Tabela 6.6 - Média, mediana e desvio padrão dos metabólitos em comum entre os grupos SD seguido do p-valor do teste de Mann-Withney – saliva 74

Tabela 6.7 - Média, mediana e desvio padrão dos metabólitos em comum nos grupos controles seguido do p-valor do teste de Mann-Withney 75

Tabela 6.8 - Média, mediana e desvio padrão dos metabólitos em comum nos índividuos com e sem SD sem DP seguido do p-valor do teste de Mann-Withney 76

Tabela 6.9 - Média e variação dos metabólitos em comum em todos os grupos seguido do p-valor do teste de Kruskal-Wallis 77

Tabela 6.10 - Frequência de microrganismos isolados e identificados pelo método *MALDI-Biotyper* das amostras de salivas dos grupos estudados.....80

Tabela 6.10 - Frequência de microrganismos isolados e identificados pelo método *MALDI-Biotyper* das amostras de fluído crevicular gengival dos grupos estudados.....81

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 2.1 - Evolução no número de artigos em ciências metabolômicas indexados e publicados nos últimos anos 39

Gráfico 2.2 - Evolução no número de artigos em ciências odontológicas e área "ômica" indexados e publicados nos últimos anos.....40

Gráfico 6.1 - Primeiro plano fatorial dos metabólitos da saliva (20%) 67

Gráfico 6.2 - Primeiro plano fatorial dos metabólitos da saliva (70%) 68

Gráfico 6.3 - Projeção bidimensional dos metabólitos da saliva em comum a todos os grupos e a correlação em função dos componentes principais 69

Gráfico 6.4 - Primeiro plano fatorial dos metabólitos da saliva dos grupos SD-DP e SD+DP 71

Gráfico 6.5 - Projeção bidimensional dos diferentes metabólitos da saliva dos grupos SD-DP e SD+DP 71

Gráfico 6.6 - Primeiro plano fatorial dos metabólitos da saliva dos grupos SD+DP e C+DP.....73

Gráfico 6.7 - Projeção bidimensional dos diferentes metabólitos da saliva dos grupos SD+DP e C+DP 73

Gráfico 6.8 - Quantificação relativa dos metabólitos entre os grupos do estudo.....78

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Celsius
AAP	*American Academy of Periodontology*
ADA	*American Dental Association*
ADP	Difosfato de adenosina
AS	Audrey Soeiro
ATP	Trifosfato de adenosina
BHI	Brain Heart Infusion
C-DP	Pacientes normoreativo sem doença periodontal
C+DP	Pacientes normoreativo com doença periodontal
CAPE	Centro de atendimento a Pacientes Especiais
CEMS	Eletroforese Capilar associada à Espectrometria de massa
ceo-d	Indice de dentes cariados, perdidos e obturados - decíduos
COMET	*Consortium for Metabonomic Toxicology*
COX	Ciclooxigenase
CPOD	índice de dentes cariados, perdidos e obturados
DCC	defeitos cardíacos congênitos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Doença Periodontal
DP±	Desvio Padrão
EPUSP	Escola Politécnica de Química da USP
FC	Fluido Crevicular
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
GC	cromatografia gasosa
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICP-MS	Plasma acoplado pro indução associado espectrometria de massa
IFNs	Interferons
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IHO-S	Índice de Higiene Oral Simplificado

IL10	Interleucina 10
IS	Índice de sangramento
LACA	Levy Anderson Cesar Alves
LPS	Lipopolissacarídeos
MALDI-TOF	Matrix Assited Laser Desorption-Ionization – Time of Flight
mL	Mililitros
MS	Espectrometria de massa
NAD^+	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (oxidado)
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (reduzido_
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OMS	Organização mundial de Saúde
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
PGE2	Prostaglandina E2
PSR	*Periodontal Screening Record*
RCS	Rafael Celestino de Souza
RMN	Ressonância magnética nucelar
RNA	Ácido ribonucléico
SD	síndrome de Down
SD-DP	Pacientes com síndrome de Down sem doença periodontal
SD+DP	Pacientes com síndrome de Down com doença periodontal
SOD-1	Super Óxido Dismutase -1
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TIC	cromatograma de íons total
µL	microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 22
2 REVISÃO DA LITERATURA 24
2.1 Síndrome de Down 24
2.2 Manifestações bucais na síndrome de Down 26
2.3 Doença periodontal e a síndrome de Down 28
2.4 Saliva do paciente com síndrome de Down 33
2.5 Metaboloma 35
2.6 Metaboloma e a doença periodontal 41
2.6 Identificação de microrganismos pela técnica MALDI-TOF 43
3 PROPOSIÇÃO 47
4 MATERIAL E MÉTODOS 48
4.1 Descrição Geral e Seleção da Amostra 48
4.2 Grupos Experimentais 49
4.3 Anamnese e Exame Clínico 50
4.4 Índice de placa e cálculo 51
4.5 Índice de Sangramento 52
4.6 Avaliação periodontal 53
4.7 Preparo e coleta das amostras 53
4.7.1 Saliva 53
4.7.2 Fluido Crevicular Gengival 58
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA 60
6 RESULTADOS 61
6.1 Dados demográficos e Clínicos 61
6.2 Metaboloma Salivar 64
6.3 Identificação Bacteriana Através do MALDI-Biotyper 80
7 DISCUSSÃO 83
8 CONCLUSÃO 96
REFERÊNCIAS 97
ANEXOS 110

1. INTRODUÇÃO

A síndrome de Down (SD) é uma das doenças genéticas humanas mais comuns, causada pela presença de um cromossoma 21 extra. Indivíduos com SD diferem na sua condição bucal, quando comparados com a população saudável, principalmente pelo desenvolvimento de doença periodontal (DP) com curso precoce e mais grave (Souza, 2011). Alguns fatores estão relacionados com a DP nestes indivíduos, como o baixo fluxo salivar, apinhamentos dentários, higiene bucal precária e alterações imunológicas (Shapira et al., 1991; Mustacchi, 2000; Souza, 2011; Martinez-Martinez et al., 2013).

Além disso, diversos estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que a característica disfunção sistêmica geral da DS está associada com o estresse oxidativo, principalmente devido à superexpressão de SOD-1, que é codificada na região cromossômica 21q22, dando origem a um feedback positivo do estresse oxidativo (Komatsu et al., 2013). As alterações do sistema imunitário dos indivíduos SD podem ter um efeito profundo sobre a saúde bucal, e esta por sua vez afetar a sua aceitabilidade social e qualidade de vida (Oliveira et al., 2007; Buckley; Sacks, 2007; Loureiro et al., 2007).

Embora, algumas teorias tentem explicar como ocorre este processo inflamatório crônico e agressivo, ainda existem lacunas abertas quanto à resposta desta pergunta.

O avanço da tecnologia proporcionou um novo campo de estudo e novas metodologias que compreendem a era “ômica” visam colaborar com o estudo das reações e produtos finais celulares, como o metaboloma.

O metaboloma surgiu com o objetivo de identificar e compreender o efeitos dos produtos metabólicos, como nucleotídeos, aminoácidos, açucares, lipídeos e outras moléculas de amostras biológicas. Essa nova metodologia, permite desde análise de toxidade de drogas, biomarcadores, genoma funcional até a patologia molecular (Rochfort, 2005).

Os metabólitos desempenham papel importante na conexão das diferentes vias metabólicas que operam dentro de uma célula viva e podem

ser detectados por métodos como a espectrometria de massa (MS), cromatografia gasosa (GC) e a ressonância magnética nucelar (RMN) (Fidalgo, 2010). O impacto da doença periodontal no perfil metabólico já foi testado em amostras de fluído crevicular gengival por EM (Barnes et al., 2009) e na saliva por RMN (Silwood et al., 2002; Fidalgo, 2010), possibilitando a utilização da análise de metabolômica como uma ferramenta de diagnóstico.

Não existem estudos na literatura que apontem o estudo dos metabólitos na SD através da técnica de metaboloma, sejam dentro da área da medicina ou odontologia, principalmente relacionando-a ao curso da doença periodontal.

Desta forma, a hipótese deste estudo sugere a identificação de metabólitos oriundos de biofluidos de indivíduos com SD por meio do metaboloma, assim como uma possível associação com o curso da inflamação na doença periodontal, possibilitando a descoberta de biomarcadores.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Síndrome de Down

A síndrome de Down, ou trissomia do cromossomo 21, é a condição aneuplóide mais comum compatível com a sobrevida a termo, podendo apresentar comprometimento intelectual associado e desordens sistêmicas ou músculo-esqueléticas (Mustacchi, 2000; Moraes et al., 2008; Srikanth et al., 2011).

O comprometimento genético pode ocorrer de três maneiras distintas: a trissomia simples, a translocação e o mosaicismo. Na trissomia simples ou forma livre, ocorre a não disjunção do cromossomo de número 21, caso em que o indivíduo irá apresentar 47 cromossomos, sendo no 21, o cromossomo extra. No caso de translocação, o indivíduo irá apresentar 46 cromossomos, ficando o cromossomo 21 geralmente grudado no cromossomo 14, ocorrendo uma translocação. O mosaicismo é um tipo de comprometimento no qual o indivíduo irá apresentar duas populações celulares, algumas com 46 e outras com 47 cromossomos. Em 95% dos casos a trissomia é simples ou forma livre (trissomia do cromossomo 21), em 2% dos pacientes, evidenciam-se mosaicos cromossômicos e em outros 2% existe a translocação de um dos três cromossomos 21 para um cromossomo do grupo D e em 1% a translocação ocorre com um cromossomo do grupo G (21 ou 22) (Mustacchi, 2000).

Segundo o Censo 2010 do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), 23,9% da população brasileira apresenta alguma deficiência física ou mental, ou seja, trata-se de uma população de 45,6 milhões de pessoas. Deste grupo, cerca de 300 mil pessoas apresentam a SD, e anualmente cerca de oito mil brasileiros nascem com a trissomia do cromossomo 21 (IBGE, 2010).

A incidência dessa síndrome é de 1 caso para cada 600 a 700 nascimentos com vida no Brasil, sendo que em mais da metade dos fetos

afetados, essa anomalia provoca o aborto espontâneo durante o início da gestação (Desai, 1997; Yang et al., 2002; Buckley; Sacks, 2007).

Pacientes com SD exibem uma grande quantidade de doenças sistêmicas, sendo as mais importantes, os defeitos cardíacos congênitos (DCC), as imunodeficiências, quadros de leucemias, disfunções gastresofágicas, alterações neurológicas (5 a 7% destes pacientes exibem quadros convulsivos) e disfunções da glândula tireoide (30% destes pacientes exibem hipotireoidismo) (Abanto et al., 2011).

Estudos apontam uma alta prevalência de DCC, com relatos entre 40 a 60% das crianças nascidas com SD de acordo com a população investigada (Freeman et al., 2008; Faria et al., 2014). Essas má formações estruturais ocorrem nos três primeiros meses de gravidez, e nem sempre são detectados pelo ultrassom. Somente o ecocardiograma fetal bimensional com Doppler pode determinar com mais exatidão a existência de um problema cardíaco. De maneira geral, o achado mais frequente é o defeito de septo atrioventricular (30-60%), seguido de defeito do septo ventricular (cerca de 30%) (Valenzuela et al., 2011). Segundo Farias et al. (2014), uma grande parte da população de pacientes com SD com DCC apresenta associação com infecções localizadas e generalizadas, 70% e 85% respectivamente.

Devido a esses acometimentos existe a necessidade de profilaxia antibiótica antes de alguns tratamentos odontológicos, prevenindo quadros de endocardite infecciosa (Abanto et al., 2011).

A maioria dos defeitos é cirurgicamente corrigida no nascimento, isso porque a doença cardíaca é destacada como a principal causa de morte entre os sindrômicos, seguida pela infecção respiratória e pelas más formações gastrintestinais, sendo o primeiro ano de vida responsável pela metade delas (Rasmussen et al., 2006).

Felizmente, recentemente houve aumento significativo na expectativa de vida da população com SD, que atualmente é de cerca de 60 anos. Podemos relacionar este aumento aos progressos na área da saúde e manutenção, principalmente na correção das cardiopatias e tratamento das pneumopatias, que já foram as principais causas de morte destes pacientes (Yang et al., 2002; Uppal et al., 2015).

Oliveira et al. (2007), também observaram o aumento na expectativa de vida dos SD, devido ao processo de inclusão social e familiar favorecerem muito a conquista de uma melhor qualidade de vida para essa população.

Como parte desse processo, observamos aumento da necessidade de cuidados bucais para estes indivíduos, uma vez que as doenças e condições bucais podem interferir na qualidade de vida destes indivíduos. Isto enfatiza como a odontologia é de grande relevância na melhoria da qualidade de vida e também de aceitação dessas pessoas junto à sociedade (Amaral Loureiro et al., 2007).

2.2. Manifestações bucais na síndrome de Down

As características craniofaciais mais comuns observadas em pessoas com DS são: nariz pequeno, ponte nasal baixa e estreita, palato ogival, úvula bífida, subdesenvolvimento da mandíbula, movimento da língua impreciso e lento (motricidade oral) e alterações na erupção dentária decídua e permanente (Oliveira et al., 2008; Macho et al., 2014).

Diversas alterações craniofaciais interagem com algumas manifestações sistêmicas (cardíaca, respiratória, otorrinolaringológico, e doenças imunes) e agravam o quadro de saúde geral destes pacientes, especialmente quando não existe um tratamento preventivo ou terapêutico (Mitchell et al., 2003; Oliveira et al., 2008) .

Muitos estudos ainda apontam que dentre as manifestações orofaciais na SD são presentes as alterações de lábio e língua, sendo a língua fissurada mais prevalente do que na população geral (10% e 78%), porém, ainda podem apresentar lábio leporino, selamento labial inadequado e lábios hipotônicos. A incidência de queilite angular também aparece elevado em indivíduos com SD, e isso pode ser atribuído à ponte nasal baixa e a hipotonia muscular, gerando a boca aberta com respiração bucal e língua saliente (Bilgili et al., 2011; Al-Maweri et al., 2015).

Estes pacientes também podem ser acometidos por diversas anomalias dentárias como hipodontia ou oligodontia, geminação, fusão de

dentes, incisivos centrais em meia lua, incisivos laterais conóides e hipocalcificação e maloclusão dentária. Essas alterações geram um impacto considerável na vida dessas pessoas e causam problemas em suas atividades diárias, incluindo a discriminação com base na aparência física e problemas relacionados ao funcionamento oral, como mastigação, deglutição, fala e infecções (Mustacchi, 2000; Oliveira et al., 2008; Abanto et al., 2011).

Indivíduos com SD apresentam baixa prevalência de cárie, apresentando, de maneira geral, índices mais baixos do que indivíduos sem a síndrome. Este achado tem sido apontado por diversos estudos devido aos fatores: atraso de erupção dentária (exposição a fatores etiológicos por menor tempo), alta prevalência de bruxismo (superfícies oclusais planas), morfologia dentária, composição salivar e diferenças na composição da microbiota (Souza, 2011; Areias et al., 2011; Macho et al., 2013).

É sabido que muitos pacientes com SD possuem auto anticorpos circulantes, entretanto apresentam um problema relacionado à imunidade. Provavelmente, um defeito na maturação dos linfócitos T, uma vez que o timo nestes pacientes apresenta alterações morfológicas, como depleção linfocitária, diminuição do córtex e aumento dos corpúsculos de Hassal (Laroca et al., 1988).

Para Amano et al. (2001), a redução numérica dos linfócitos e os defeitos funcionais de quimiotaxia e fagocitose celular dos neutrófilos e monócitos, resultam em comprometimento local da resistência à infecção, constituindo as alterações mais comuns observadas na resposta imunológica do paciente SD, as quais o tornam susceptível a lesões orais, doenças periodontais e outros acometimentos sistêmicos. Este comprometimento da resposta imunológica inata e adquirida torna-os mais susceptíveis ao desenvolvimento de processos infecciosos (Antonaccio, 2009).

Dentre os diversos achados relacionados à SD, uma preocupação constante é a alta prevalência de doença periodontal e o curso desta doença nestes indivíduos.

2.3. Doença Periodontal e a síndrome de Down

A Doença periodontal é uma infecção crônica, produzida por bactérias gram-negativas, sendo a segunda maior causa de patologia dentária na população humana de todo o Mundo (Petersen; Ogawa, 2005).

É definida como uma doença sujeito e sitio-específica, que evolui continuamente com períodos de exacerbação e de remissão, resultando de uma resposta inflamatória e imune do hospedeiro à presença de bactérias e seus produtos. A sua progressão é favorecida pelas características morfológicas dos tecidos afetados, o que a distingue de outras doenças infecciosas (Cavalcante et al., 2009).

Compreendemos que a evolução da doença periodontal ocorre a partir de uma infecção bacteriana crônica persistente, que libera produtos bacterianos do biofilme induzindo uma inflamação local na gengiva, e em alguns casos, evoluindo para a destruição de tecido conjuntivo e reabsorção óssea ao redor dos dentes. Também se caracteriza pela formação de bolsas e recessão dos tecidos aderidos. Sem tratamento, a destruição do tecido periodontal, a reabsorção óssea e perda dentária pode seguir (Tonetti et al., 2007).

A doença periodontal também tem sido associada a diversas doenças sistêmicas, incluindo a doença cardiovascular, *diabetes mellitus*, doenças respiratórias, artrite reumatóide, doença renal crônica e efeitos adversos da gestação (Demmer; Desvarieux, 2006; Barnes et al., 2014).

Por este motivo, o fator etiológico e a reação tecidual não podem ser equacionados como uma simples reação de causa e efeito. Além disso, não podemos atribuir aos fatores locais (como intensidade, frequência e duração) toda a responsabilidade pelo processo, pois os tecidos são influenciados pelo estado de saúde geral do paciente (Cavalcante et al., 2009).

A doença periodontal é o problema de saúde bucal mais significativo em pessoas com SD. Fatores como destreza manual deficitária, falta de compreensão das necessidades de higiene bucal e falta de autonomia, podem levar a má higiene e, portanto, ao acúmulo de biofilme favorecendo a instalação de periodontopatógenos (Souza et al., 2011). Por conseguinte, um

grande número de jovens com DS perdem seus dentes anteriores permanentes precocemente na adolescência (Maatta et al., 2006; Oredugba, 2007).

A prevalência estimada da doença periodontal em indivíduos com SD oscila entre 35% e 50% em menores de 30 anos de idade, alcançando 96% em população adulta (Cichon et al., 1998; Morgan, 2007; Cavalcante et al., 2009). Em indivíduos com SD a doença se instala precocemente, progredindo facilmente com a idade. Isto pode levar à perda do dente (Saxen Aula, 1982; Reuland-Bosma et al., 2001) causando impacto negativo na qualidade de vida da população afetada (Amaral Loureiro et al., 2007).

É possível observar que indivíduos com SD apresentam aumento da prevalência da doença periodontal se comparado à pessoas sem alterações cromossômicas (euplóides) e à outros pacientes com deficiência intelectual de idade similar (Finoti et al., 2013).

Embora o comprometimento cognitivo e intelectual esteja associado à higienização bucal precária, sendo um importante fator para o desenvolvimento da DP, este isoladamente não é suficiente para explicar a destruição periodontal severa que ocorre nos indivíduos com SD (Souza, 2011).

Muito tem sido explorado na associação de diversos fatores relacionados com a doença e a destruição periodontal de maior severidade em pacientes com SD, em uma tentativa de explicar sua aparição e comportamento. Porem, algumas lacunas continuam vazias e o entendimento da doença nesta população é ainda controverso.

Shapira et al. (1991) ao estudarem a necessidade de tratamento periodontal em 12 pacientes com SD, avaliaram a profundidade de sondagem em sextantes e quando comparados à 2 grupos controles (sem SD e com deficiência intelectual), a doença periodontal foi mais severa e mais incidente na SD.

Cichon et al. (1998), sugeriram que a destruição periodontal severa que ocorre nos indivíduos com SD é consonante com o padrão de periodontite agressiva. Diversos são os periodontopatógenos que podem colonizar muito precocemente a cavidade bucal destes indivíduos. Nesse estudo foram detectados por PCR, 9 de 10 espécies de periodontopatógenos

de placa subgengival em indivíduos com SD e de idade entre 2 a 4 anos, com significativa diferença em relação ao grupo controle (sem SD). *Tannerella forsythensis*, *Bacteroides forsythus* e *Treponema denticola*, são considerados importantes na periodontite do adulto e foram encontrados em crianças com SD desde aos 2 anos de idade, sendo que em crianças não sindrômicas apenas o *Bacteroides forsythus* foi detectado a partir de 8 anos de idade. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* está associado à periodontite agressiva e é considerado importante na periodontite de indivíduos com SD.

Bagic et al. (2003) relataram que a doença periodontal é mais grave nos pacientes com SD, e quando compararam o grau de sua condição periodontal com um grupo de pacientes isentos da trissomia, encontraram que o índice de sextantes saudáveis foi significativamente maior no segundo grupo, inferindo, portanto que os indivíduos com SD possuem maior severidade de doença periodontal, necessitando assim de maiores cuidados.

Indivíduos com SD apresentam algumas alterações no sistema imune. Mesmo que o número de neutrófilos e monócitos seja normal, suas funções de quimiotaxia e fagocitose são diminuídas (Sreedevi; Munshi, 1998). A quimiotaxia deficiente dos neutrófilos foi correlacionada à maior perda de osso alveolar, que somada ao número reduzido de linfócitos T maduros que esses indivíduos apresentam, são características que podem contribuir para a progressão da doença periodontal na SD, quando comparado à indivíduos normais e com semelhante deficiência intelectual (Barr-Agholme et al., 1998; Martinez-Martinez et al., 2013).

A superexpressão da enzima SOD 1, com gene localizado no cromossomo 21, é outra peculiariedade que ocorre na SD. Essa enzima converte rapidamente superóxidos em peróxido de hidrogênio e na SD encontramos níveis da enzima 50% a 150% mais elevados quando comparados a indivíduos saudáveis. Esses altos níveis são capazes de provocar nos polimorfonucleares drástica redução de superóxidos, diminuindo a capacidade dessas células de agir contra micro-organismos que requeiram estritamente superóxidos para serem destruídos (Mustacchi, 2000; Garlet et al., 2013; Souza et al., 2011).

Bactérias periodontopatogênicas, como *Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* (juntas são chamadas de *“red*

complex"), promovem uma reação inflamatória intensa. (Feng; Weinberg, 2000; Hafajee; Socransky, 2000). Os microrganismos do "red complex" são associados com periodontites também na SD e foram encontrados significativamente mais frequentemente em crianças com SD em idade mais precoce do que o observado nos controles (Amano et al., 2000).

É possível observar aumento dos níveis de *A. actinomycetemcomitans* em crianças com SD (Sreedevi; Munshi, 1998). Da mesma forma, Sakellari et al. (2005) encontraram vários patógenos periodontais na colonização de crianças, adolescentes e jovens adultos com síndrome de Down precocemente e em níveis mais elevados do que os indivíduos sem a síndrome ou pessoas com paralisia cerebral.

Embora estes patógenos sejam considerados importantes para periodontite crônica grave, outros estudos não relataram diferenças na prevalência ou na quantidade de patógenos do "red complex" em pessoas com SD com periodontite em comparação à um grupo controle (Khocth et al., 2012; Reuland-Bosma et al., 2001).

Segundo Reuland-Bosma et al., 2001, ao estudar a microbiota subgengival de indivíduos SD e doença periodontal, não observou diferenças estatisticamente significativas na prevalência subgengival e proporções cultiváveis de sete patógenos bacterianos periodontais.

Sendo assim, a colonização bacteriana é variável e talvez não justifique isoladamente o curso da doença nestes indivíduos.

Cavalcante et al. (2012) afirma que os fibroblastos gengivais estimulados com lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias gram-negativas agem como uma endotoxina, *e* expressam mais ciclooxigenase 2 (COX-2), o que induz à produção de prostaglandina E2 (PGE2), cuja concentração se mostra elevada no fluido gengival em indivíduos com SD.

Tanaka et al. (2012) realizou um estudo para determinar a influência da SD na modulação dos interferons (IFNs) na via de sinalização na DP. Para isso, avaliou clinicamente 19 indivíduos com SD e realizou biópisa gengival. Foram mensurados os níveis de expressão de IFNg e IFNA, e os seus receptores IFNGR1, IFNGR2, IFNAR1 e IFNAR2, assim como os intermediários de sinalização utilizando PCR em tempo real. Os sinais clínicos de doença periodontal foram marcadamente mais grave na SD e nos

pacientes controles com e sem DP. Não houve diferença significante nos níveis de mRNA de IFNA, IFNg, INFGR2, IFNAR1 e IFNAR2 entre SD e indivíduos controle, mesmo que alguns desses genes estejam localizados no cromossomo 21. STAT1 e níveis de mRNA IRF1 foram significativamente menores nos pacientes com SD em comparação com indivíduos controle com DP. Concluindo que a redução da expressão de genes STAT1 e IRF1 indicam uma ativação diminuída de IFNs em indivíduos com SD e DP. A expressão de IFNA e IFNg e receptores de IFN não foi alterada na SD, indicando que estão envolvidos indiretamente na ativação reduzida de sinalização de IFN.

O contexto genético da SD pode explicar alterações na resposta imune, que, *in turn*, podem afetar a inflamação e expressão de citocinas como a IL10 e IFNy no tecido gengival (Tanaka et al., 2012).

Além das alterações imunológicas e genéticas, outros fatores propostos para explicar a alta prevalência da DP e o aumento da sua severidade em indivíduos com SD incluem a má oclusão e o apinhamento, que favorecem a instalação dos periodontopatógenos (Alves et al., 2004). Ainda neste contexto, as alterações salivares têm relação com a DP na SD, principalmente a redução ou alteração do fluxo salivar, que contribuem para o surgimento da DP (Souza, 2011).

O diagnóstico de DP se baseia principalmente no exame clínico e nos parâmetros radiográficos. Porém, nos últimos anos, vários estudos têm fornecido uma contribuição significativa para a compreensão detalhada da rede de bioquímica e via na DP, apontando para uma bateria de biomarcadores de diagnóstico (Perinetti et al. 2008, Pisano et al. 2005, Pradeep et al. 2009, Thaweboon et al. 2010).

Embora a literatura apresente vários estudos para elucidar o processo patogênico da doença periodontal na SD, ainda não foram identificados quais os metabólitos envolvidos neste processo. Além disso, uma vez que estudos longitudinais conduzidos em pacientes com SD são escassos, mais estudos que demonstrem como a doença se desenvolve e progride, contribuirão para uma gestão clínica mais eficaz destes pacientes.

2.4. Saliva do Paciente com síndrome de Down

É consagrado na literatura que a saliva dos indivíduos com SD sofre alterações, que geralmente ocorre em nível de glândulas salivares parótidas, onde ocorre maior concentração de sódio, cálcio e bicarbonato se comparado com indivíduos saudáveis. A relação entre aumento da concentração de bicarbonato encontrado na saliva e a menor prevalência de cárie dentária nos indivíduos SD foi proposta, uma vez que o bicarbonato faz parte do sistema tamponante salivar (Winer; Chauncey, 1975).

Segundo Yarat et al., 1999, em estudo comparando ácido siálico salivar, proteínas, fluxo salivar, pH e capacidade tampão e os índices de cárie entre indivíduos com SD e controles sem a síndrome, observaram não haver diferença estatisticamente significante quanto ao pH e à capacidade tampão entre os dois grupos, mas notaram aumento do pH em relação à idade crescente e dentição (mista e permanente) nos indivíduos com SD.

Entretanto Siqueira et al. (2004, 2005), propuseram avaliar pH, capacidade tampão, fluxo salivar, concentração de proteína total, atividade da amilase salivar, atividade da peroxidase salivar, concentração de ácido siálico nas formas livres e concentração de íons de sódio, potássio, cloro, fósforo, zinco e magnésio em saliva total de indivíduos com SD. Foram estudados indivíduos de ambos os gêneros entre 1 e 25 anos, divididos em 5 faixas etárias. Foi diagnosticado que a diminuição do fluxo salivar ocorreu em todas as idades nos indivíduos com SD em relação ao grupo controle. As concentrações de proteína total e de sódio apresentavam-se aumentadas, e as de potássio diminuídas, assim como o pH em relação ao grupo controle. Outros íons como fósforo, cálcio, zinco e magnésio não apresentaram nenhuma alteração quando comparados aos indivíduos do grupo controle. A capacidade tampão foi mais eficiente em indivíduos com SD do que no grupo controle.

Chaushu et al. (2002), estudando as particularidades imunológicas da saliva de indivíduos com SD observaram redução dos índices de IgA, IgG e IgM na saliva, revelando associação com um alto índice de infecções

recorrentes, propondo que níveis de imunoglobulinas salivares podem servir como um marcador da susceptibilidade a infecções recorrentes.

Souza (2011), ao avaliar os parâmetros salivares de indivíduos com SD e sua relação com a doença periodontal através de testes rápidos, encontrou acentuada redução no fluxo salivar em cerca de 83% dos indivíduos com SD, apresentando esta associação significante com a alta prevalência (60%) de doença periodontal.

É evidente o aumento no interesse em estudar a saliva, seus componentes, FS, presença ou não de xerostomia e outras alterações dos pacientes com diagnóstico de SD. Embora muito já foi descoberto, existe uma grande lacuna em relação à saliva e marcadores biológicos nestes índividuos que possam ser relacionados as alterações bucais.

No nível molecular, são poucos os estudos que exploram as ciências ômicas para avaliar a saliva e correlacionar com a doença periodontal.

2.5. Metaboloma

O metaboloma é definido como a coleção qualitativa e quantitativa de todos os metabólitos de baixa massa molecular presentes nas células, que participam de reações metabólicas necessárias para a manutenção, crescimento e fisiologia celular. Desta forma, podemos dizer que a metabolômica é a área que monitora a quantidade de todos os metabólitos, como lipídios, açúcares, aminoácidos, com exceção apenas de DNA, RNA e proteínas, de uma determinada amostra, com o objetivo de delinear o processo bioquímico de sistemas a fim de ampliar o entendimento ou dinâmica de como as doenças se manifestam (Figura 2.1) (Daviss, 2005; Garcia;Tabak, 2008; Spielmann; Wong, 2011; Grant, 2012).

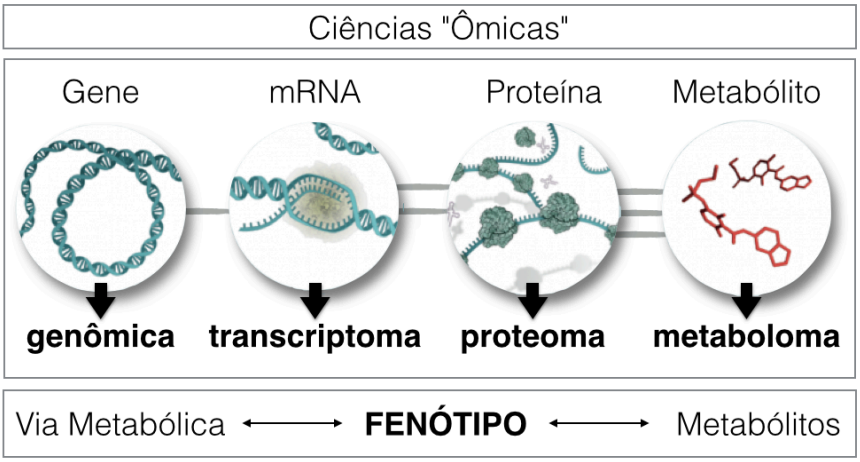


Figura 2.1 Uma visão geral das quatro principais áreas "ômicas", da genômica à metabolômica

A metabolômica pode ser utilizada para duas finalidades principais e próprias: a triagem para as diferenças entre *fingerprints* (impressões digitais) metabólicos globais de cortes de populações, ou para compreender a estrutura de regulação da via metabólica, sua conectividade, controle das concentrações celulares e fluxos de metabólitos, particionamento de produtos metabólicos e excreção. Decerto, qualquer biomarcador ou grandes diferenças que forem identificadas em *fingerprinting* metabólicos irão levar para o próximo nível de consulta: uma busca de um entendimento

mecanicista em profundidade, por exemplo, o porque de certos biomarcadores serem específicos para uma condição ou perturbação biológica. E isso ocorre em via dupla, uma vez que eventos metabólicos são entendidos de uma forma abrangente para um determinado sistema celular.

O seu inerente dinamismo, revela que os metabólitos são continuamente absorvidos, sintetizados, degradados e interagem com outras moléculas, dentro e entre os sistemas biológicos, e com o meio ambiente (Daviss, 2005). A figura 2.2 mostra algumas dessas reações dinâmicas.

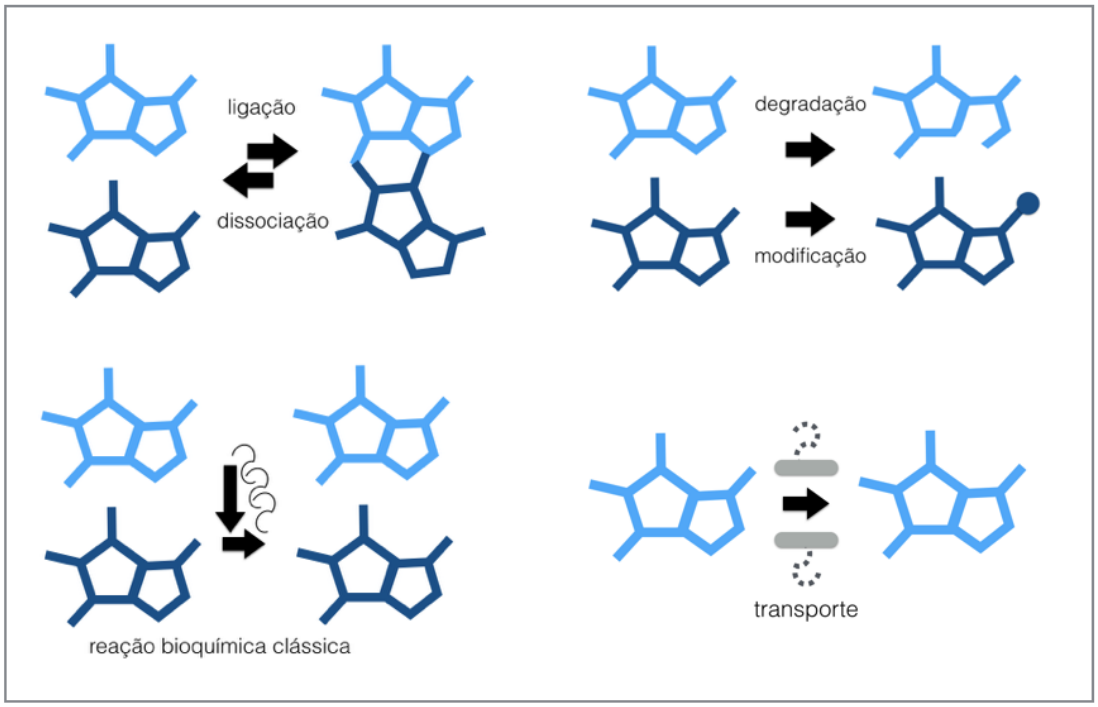


Figura 2.2 Diagrama dos principais tipos diferentes de reações metabólicas que ocorrem na célula. (Adaptado de http://www.ebi.ac.uk/training/online/course/introduction-metabolomics)

Essas séries de reações químicas são chamadas de vias metabólicas, que quando catalisadas por enzimas, geram um produto que irá ativar uma nova reação, ou seja o produto é também substrato para a reação seguinte, sejam elas anabólicas ou catabólicas. Desta forma, nos leva a uma compreensão de como a estrutura reguladora observada responde a estímulos externos e como a sua capacidade de resposta metabólica relaciona-se com a integração da regulação celular em sistemas de grande porte, sejam estes no nível de tecidos, órgãos ou o organismo (Lindon et al., 2011).

A origem desta metodologia surgiu no *Imperial College of London*, em parceria com cinco companhias farmacêuticas, com o objetivo de desenvolver metodologias de aquisição e avaliação da metabolômica do sangue e urina de ratos para testes toxicológicos, o qual deu origem ao *Consortium for Metabonomic Toxicology* (COMET) (Nicholson et al. 2002).

A análise quantitativa de biofluidos tornou-se mais conhecida em meados do século 19, quando alguns clínicos deram início a identificação e quantificação da composição de diversas substâncias, que foram associadas a várias condições médicas (Fidalgo, 2010).

Essa abordagem fornece ferramentas originais para aprimorar as informações biológicas relacionadas ao metaboloma e, mais usualmente, à genômica funcional (Nicholson et al., 2012). O seu tamanho e/ou quantidade varia de acordo com o organismo estudado, por exemplo, o *Saccharomyces cerevisiae*, contêm aproximadamente 600 metabólitos (Harrigan; Goodacre , 2003). Grande parte das plantas têm uma estimativa aproximada de 200 mil metabólitos primários e secundários (Fiehn et al., 2001); o que sugere que o metaboloma humano deva ser ainda maior.

Terabe et al., 2001, relatam cerca de 300 metabólitos principais em apenas uma célula, os quais podem ser classificados de acordo com sua estrutura química (Tabela 2.1).

Algumas tecnologias emergentes têm reforçado a viabilidade da aquisição de esclarecimentos no que diz respeito ao estado metabólico geral do organismo, seja ele de bactérias, plantas e também humanos. Estas técnicas focam no estudo de substratos e produtos de vias bioquímicas fundamentais, e são particularmente relevantes para a caracterização do estado metabólico de algumas doenças (Lameiras et al., 2015).

Tabela 2.1 Classificação dos principais metabólitos em uma célula de acordo com sua estrutura química. (Adaptado de Terabe et al., 2001)

Classes Químicas	Nº de Compostos	Exemplos típicos
Aminoácidos, aminas e derivados	54	L-glutamato, L-asparato
Àcidos Carboxílicos	35	Piruvato, 2-oxoglutarato
Álcoois	3	glicerol
Aldeídos	10	Acetaldeído, formaldeído
Ésteres fosfatados (com exceção dos nucleotídeos)	33	D-glucose, D-fosfato
Ácidos nucléicos e compostos relacionados	37	ATP, ADP
Carboidratos e compostos relacionados	16	D-glicose, D-frutose
Lipídios, esteróides e gorduras saturadas	19	Estrógeno, colesterol
Vitaminas e coenzimas	45	NAD^+, NADH
Íons inorgânicos	10	Fosfato, nitrato

As metodologias para avaliar o metaboloma estão em evolução, contudo, não existe ainda nenhuma técnica capaz de analisar todas as estruturas químicas. Portanto, as amostras devem ser analisadas por diversas técnicas, incluindo RMN/MS, MS associada à eletroforese capilar (CEMS), cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e a GCMS como as principais técnicas analíticas indicadas para a avaliação de biofluidos (Villas-Boas, 2013; Grant, 2012; Lameira et al., 2015).

O uso clínico do metaboloma para a investigação de biofluidos como saliva, urina e sangue está relacionado à possibilidade de processamento das amostras para a realização de diversas análises. Além disso, a coleta desses tipos de amostra é menos invasiva quando comparada à coleta de tecidos, principalmente a saliva (Fidalgo, 2010). A análise de biofluidos é feita, assumindo-se que as substâncias químicas encontradas refletem amplamente o estado fisiológico do órgão onde são produzidos, ou que são permeados por tal fluido (Rorchfort, 2005).

E é por isso que a análise de metaboloma não tem o objetivo apenas de caracterizar alguns compostos por vez, mas vários compostos de uma só vez, mostrando também suas correlações. Sendo possível a quantificação de vários metabólitos, pode-se ter uma melhor compreensão do que acontece em termos fisiológicos e metabólicos no paciente (Nicholson et al., 2012).

Há mais de uma década tem sido explorado através de pesquisas a área da metabolômica, e o número de publicações sobre este assunto é crescente, como pode ser observado no gráfico 2.1 abaixo.

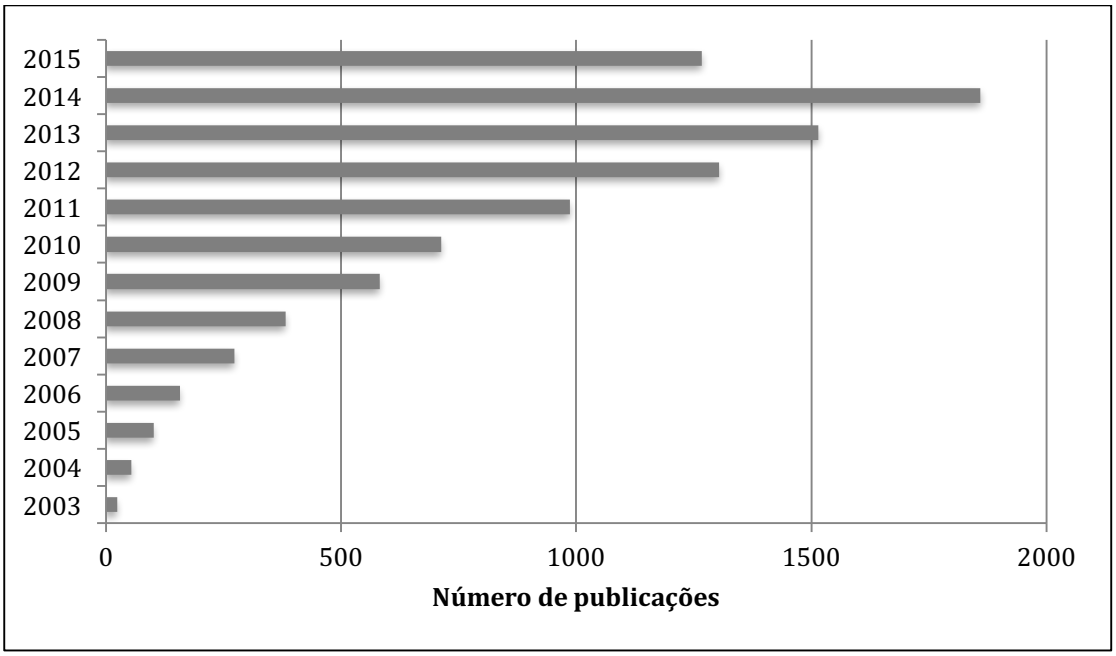


Gráfico 2.1 Evolução no número de artigos em ciências metabolômicas indexados e publicados nos últimos anos. (Gráfico produzido mediante busca na base de dados Scopus, http://www.scopus.com.br, pela palavra "metabolome")

Quando a pesquisa é direcionada para área de saúde bucal e metabolômica são cerca de 300 trabalhos publicados por ano, o que reflete o intenso interesse nas contribuições que a técnica pode oferecer (Gráfico 2.2).

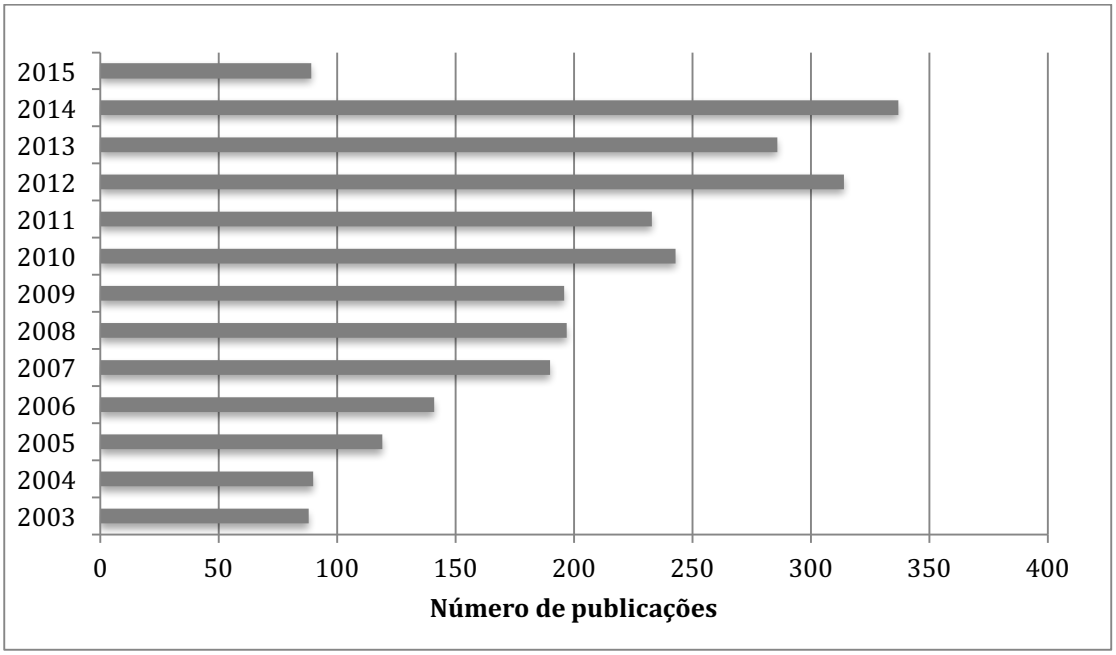


Gráfico 2.2 Evolução no número de artigos em ciências odontológicas e área "ômica" indexados e publicados nos últimos anos, até setembro 2015. (Gráfico produzido mediante busca na base de dados Scopus, http://www.scopus.com.br, através da estratégia de busca "oral health" e "*omics")

Muitos estudos na área da saúde utilizam os biofluidos como amostra, caso da urina e do fluido cerebroespinhal, que são essencialmente ausentes de proteínas, e podem ser utilizados para análise quase que imediatamente sem qualquer tipo de tratamento. Outros fluidos que possuem proteínas de alto peso molecular necessitam da extração desses componentes, a fim de que possam ser utilizados para a MS e RMN (Lutz et al, 2013).

Em Odontologia os estudos ainda são escassos, embora emergente, sendo já analisados o metaboloma salivar de crianças com cárie, metaboloma salivar relacionado ao câncer oral, líquen plano oral, leucoplasias e metaboloma salivar da doença periodontal (Fidalgo, 2010; Aimetti et. al, 2012; Barnes et al., 2009; 2011; 2014).

Desta forma, a necessidade de estudos que identifiquem e quantifiquem metabólitos presentes em saliva de pacientes comprometidos sistemicamente, tem aumentado nos últimos anos. Associado a isso, algumas patologias presentes na cavidade bucal podem ser consequência da interação de metabólitos produzidos pelo próprio organismo.

2.6. Metaboloma e a Doença Periodontal

Como explanado anteriormente, a exposição do hospedeiro aos microrganismos e seus subprodutos, provocam a expressão de mediadores inflamatórios e uma cascata de eventos que conduz à degradação de tecido periodontal. Esses produtos de degradação, devido interação hospedeiro-microbiota, ainda não estão totalmente identificados e aplicados as vias metabólicas. Os metabólitos da saliva e fluido gengival foram associados com a inflamação, o estresse oxidativo, a degradação de tecidos, e metabolismos bacterianos demonstraram ser significativamente aumentados em pacientes com periodontite em comparação com pacientes sem esta condição (Barnes et al., 2009; Marchesan et al., 2015).

Gronert et al. (2004) propôs avaliar os lipídios utilizando um tipo especial de metabolômica, e os resultados demonstraram uma deficiência na produção de diacilglicerol em neutrófilos de pacientes com periodontite agressiva localizada. Desta forma, os autores estabeleceram a relação de que o baixo nível dessa molécula pode levar a um aumento na produção de ânions superóxidos, contribuindo para a inflamação periodontal e perda óssea.

Barnes et al. (2009) determinaram o perfil do metaboloma do fluído crevicular gengival coletado de sítios saudáveis, com gengivite e com periodontite de 22 pacientes com periodontite crônica, através de cromatografia líquida e gasosa associada a espectrometria de massa. A análise permitiu a detecção de 103 metabólitos, sendo que aproximadamente 50% dos metabólitos apresentavam níveis alterados entre as três condições avaliadas. A via da degradação da purina, fonte de produção de espécies reativas de oxigênio, estava significativamente aumentada nos sítios periodontais, indicando que essa via pode ser a principal fonte do estresse oxidativo que ocorre na inflamação periodontal.

Ao expandirem a análise, Barnes et al. (2011) investigaram o impacto metabolômico global da periodontite sobre a saliva, acreditando que a integração metabólica destes 2 fluidos orais forneceriam uma base

bioquímica abrangente para a compreensão da patogênese da periodontite. Foram avaliadas 68 amostras de salivas de pacientes saudáveis e com doença periodontal, através de cromatografia líquida e gasosa associada à espectrometria de massas (UHPLC/MS/MS e GC/MS). Como resultados foram encontrados os metabólitos dipéptidos leucylisoleucine, fenilfenol, serylisoleucine, bem como o ácido araquidônico, ácidos graxos, araquidato, e di-homo-linolato como relevantes marcadores candidatos a associação com a doença periodontal. Porém, os autores ainda reforçam que mais estudo são necessários para validar e refinar a lista de biomarcadores.

Aimetti et al. (2012) realizaram um estudo para pesquisa de um modelo metabolômico relacionado a doença periodontal, sugerindo que os potenciais biomarcadores poderiam ser uma abordagem válida para a identificação, início ou estadiamento da doença periodontal. Neste estudo foram comparados espectros de saliva de indivíduos saudáveis e com doença periodontal crônica. Os autores observaram que o pacientes com doença periodontal são caracterizados por níveis mais baixos de piruvato e N-acetil, e níveis maiores de etil, c-aminobutirato, n-butirato, succinato, trimetilamina, propionato e valina.

Alguns estudos recentes apontam que por meio do metaboloma há a regulação do estresse oxidativo no microambiente das bolsas periodontais mediada pela microbiota periodontopatogênica, como a *Porphyromonas gingivalis* (Henry et al., 2012; McKenzie et al., 2015).

Diante disso, é possível estender o papel da ciência metabolômica, uma vez que seus achados complementam as informações obtidas por outras metodologias ômicas, adicionando importantes informações nas bases biológicas das doenças, principalmente no entendimento entre a expressão de genes e proteínas.

2.7. Identificação de microrganismos pela técnica *MALDI-TOF*

Tem sido estimado que aproximadamente 500 espécies diferentes de bactérias habitam a cavidade bucal (Haffajee; Socransky, 2000), sendo a maioria dos microrganismos comensais e uma pequena porção deles, patógenos oportunistas, causadores também de doenças sistêmicas (Paster et al., 2001).

O envolvimento de microrganismos na etiologia da doença periodontal está bem estabelecido, entretanto, a sua identificação em estudos clínicos se faz importante para que os dados possam ser interpretados de forma correlacionada aos periodontopatógenos presentes.

Uma metodologia que vem sendo amplamente utilizada para a identificação de bactérias é a espectrometria de massas *MALDI-TOF*, através de identificação por comparação com banco de dados. No que concerne à identificação de bactérias, esta tem sido apontada como a mais recente revolução para o diagnóstico de patógenos, que ocorre de forma rápida e precisa. Além disso, ela apresenta o potencial de caracterização de alto peso molecular (proteínas) e apresentar alta sensibilidade mesmo em reduzida quantidade de amostra (Yalcin; Monte, 2015).

A sigla *MALDI-TOF* significa *Matrix Assisted Laser Desorption-Ionization – Time of Flight* e consiste num sistema no qual o material biológico (por exemplo, uma colônia) é colocado em uma placa e sobre esta amostra coloca-se um reagente chamado de matriz, que irá ionizar a amostra para a análise posterior. Amostra e matriz são então irradiadas com um laser que vaporiza a mistura ocorrendo assim a ionização de várias moléculas, que são aceleradas e voam num tubo em alto vácuo são levadas ao detector: a massa molecular de cada componente de amostra é calculada de acordo com o tempo que a molécula leva para chegar ao detector, a partir do pulso de laser. Os íons são separados e detectados de acordo com sua razão massa molecular/ carga. A técnica permite análise de peptídeos e proteínas a partir de cultivos bacterianos ou extratos bacterianos (Pasternak, 2012).

Cada pico de massa corresponde a um composto (proteína) desprendido da superfície celular durante a dessorção à laser, obtendo-se

assim um espectro de massas de proteínas para cada microrganismo analisado. Este espectro de proteína é chamado de impressão digital do microrganismo. Para o processamento de dados pode ser utilizado o software *Biotyper* (Bruker Daltonics, EUA), no qual o funcionamento é específico para identificação de microrganismos por comparação com um banco de dados (Barreiro et al., 2010). Este *software* atualmente possui mais de 4 mil espectros referências, os quais abrangem a taxonomia proposta pelo NCBI (National Center for Biotechnology Information). Esta plataforma analítica permite também a criação de bancos de dados próprios do usuário ou permite que os microrganismos pouco representados no banco de dados do software sejam enviados à empresa *Bruker Daltonics* para a atualização do software, que ocorre a cada quatro meses (Benagli et al., 2011). Como pode ser visualizado no esquema abaixo.

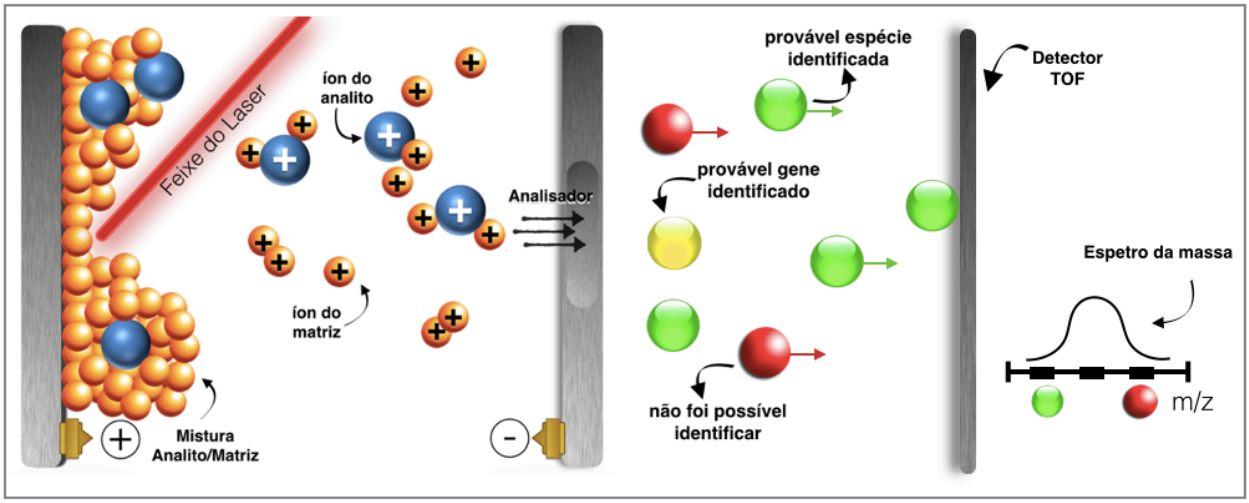


Figura 2.3 Diagrama esquemático que mostra o fluxo de trabalho de um MALDI-TOF/MS.

Para identificação de microrganismos através do *MALDI-Biotyper* algumas espécies podem ser identificados diretamente de colônias recém cultivadas (não mais que 24 horas) (perfis celular direto), enquanto outras é necessário que as proteínas sejam extraídas dos microrganismos, através de um simples processo de adição de ácido fórmico. No método de análise direta, uma pequena quantidade de microrganismo é aplicada diretamente sobre a placa de amostragem com o auxilio de uma cotonete ou mesmo de um palito de

dente e imediatamente coberta com a solução matriz, e após secagem em temperatura ambiente são analisadas (Barreiro et al., 2010).

O *Biotyper* incorpora funcionalidades para o processamento de espectros de massa, bem como para identificação e classificação. O *software* realiza a correspondência de padrões para a identificação de microrganismos desconhecidos por meio da comparação das listas de íons geradas por uma biblioteca de espectros armazenados, os quais contêm as informações de espectros característicos das espécies e subespécies. Os espectros de biblioteca são gerados por meio da combinação de espectros de massas de espécies e estirpes bacterianas de referência (ATCC) ou sequenciadas.

Assim, o programa computacional agrupa automaticamente listas de íons de todo o conjunto de espectros e extrai os íons típicos, que estão presentes em um certo número de espectros a partir de uma espécie. O calculo da similaridade de todos os espectros principais em uma biblioteca com cada um dos outros espectros neste conjunto de correspondência de padrão ou a similaridade pode ser avaliado com base nos resultados do dendrograma de similaridade. Com base nos componentes principais calculados, uma variedade de algoritmos de agrupamento e visualizações está disponível (La Scola; Raoult, 2009).

Os resultados são apresentados por meio de um valor ou escore na faixa de 0 – 3.0, como demonstra a Figura 4, calculado através da comparação da lista de íons para um isolado desconhecido com a referência no banco de dados. Um escore ≥ 1,7 é indicativo de identificação em nível de gênero e escore ≥ 2,0 é o limiar definido para uma identificação em nível de espécie (Saffert et al., 2011).

Meaning of Score Values

Range	Description	Symbols
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+++)
2.000 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(++)
1.700 ... 1.999	probable genus identification	(+)
0.000 ... 1.699	not reliable identification	(-)

Figura 2.4 - Valores por escore indicativos da identificação bacteriana.

Alguns autores identificaram microrganismos por *MALDI-TOF/MS* utilizando perfil celular direto, e encontraram bactérias gram-negativas como *Neisseria spp.* (Ilina et al., 2009), *Yersinia spp.* (Stephan et al., 2011), e *Vibrio spp.* (Eddabra et al., 2012).

Entretanto para algumas bactérias um melhor perfil de proteínas é alcançado quando as mesma são extraídas antes da análise. Essa extração realizada com ácido fórmico, melhora os resultados de identificação dos microrganismos. Saffert et al. (2011) relataram que a extração prévia se faz necessária para a identificação de bactérias Gram-positivas por *MALDI-TOF/MS*, mas não para as bactérias gram-negativas. A extração preparatória de microrganismos com ácido fórmico também foi utilizado para preparação de amostras de bactérias não fermentadoras de açúcar e *Staphylococcus spp.* (Dubois et al., 2010).

Muitos estudos têm mostrado que *MALDI-Biotyper* igualou ou mesmo ultrapassou os métodos convencionais de diagnóstico em velocidade e precisão na detecção de infecções da corrente sanguínea (La Scola e Raoult, 2009; Foster, 2013; Tadros; Petrich, 2013).

Independente das condições de cultivo, formulações de cultura, tempo de cultivo, quantidade de inóculo necessário para identificação, o *MALDI-Biotyper* é a técnica de escolha em laboratórios de microbiologia de rotina (Shingal et al., 2015.)

Diante do apresentado, a aplicação de MALDI na rotina clínica é viável, uma vez que as análises são rápidas, baratas e passíveis de serem feitas com quantidades mínimas de amostra. Quando bem aplicado, MALDI apresenta elevados níveis de padronização, robustez e acessibilidade podendo ser amplamente usada na pesquisa clínica (Barreiro et al., 2010).

3. PROPOSIÇÃO

Objetivo Geral

Analisar o metaboloma salivar de adolescentes e adultos jovens com síndrome de Down e estabelecer sua associação com a presença da doença periodontal.

Objetivos Específicos

- Identificar possíveis metabólitos endógenos inerentes da síndrome de Down.
- Identificar possíveis biomarcadores relacionados com o desenvolvimento da doença periodontal em indivíduos com e sem síndrome de Down;
- Identificar microrganismos associados a doença periodontal presentes em indivíduos com síndrome de Down;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia - FOUSP (Anexo A) sob protocolo 658.979 e a coleta dos dados teve início somente após a autorização dos responsáveis dos sujeitos envolvidos na pesquisa, por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B).

4.1. Descrição Geral e Seleção da Amostra

Realizamos um estudo transversal analítico a partir de uma amostra de conveniência composta por 30 indivíduos com diagnóstico definitivo de síndrome de Down e 30 indivíduos clinicamente saudáveis, sem diagnóstico de doença sistêmica, ambos com idade entre 12 e 21 anos selecionados de forma não aleatória.

Foram contatados e convidados a participar todos os pacientes com SD cadastrados no CAPE (Centro de atendimento a Pacientes Especiais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo) até dezembro de 2013 entre 12 e 21 anos, que estivessem dentro dos critérios de inclusão, como pode ser observado na Figura 6 na sessão de resultados. Os critérios de inclusão para o grupo de indivíduos com SD foram: diagnóstico confirmado de SD por meio de cariótipo de trissomia simples do 21 (mosaicos foram excluídos).

Foram critérios de exclusão a presença de outra síndrome associada e/ou comprometimento neurológico ou motor que impossibilitasse a cooperação durante os exames e coletas, diabetes mellitus ou de qualquer outra doença inflamatória crônica ou infecções; gravidez ou amamentação; presença de lesões de cáries > 3, uso de antimicrobianos e antiinflamatórios nos 3 meses anteriores à avaliação e coleta, tratamento periodontal prévio nos últimos 3 meses á coleta, uso de aparelho ortodôntico e tabagistas.

4.2. Grupos Experimentais

Os sujeitos do grupo experimental incluídos foram distribuídos em 2 subgrupos, a saber: síndrome de Down sem doença periodontal e síndrome de Down com doença periodontal.

O grupo controle foi composto por pacientes da Clínica de Adolescentes da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Os critérios de exclusão adotados foram os mesmos definidos paras os sujeitos com SD. Este grupo também foi dividido em dois subgrupos: controle sem doença periodontal e controle com doença periodontal.

Os grupos e subgrupos estão abaixo identificados e apresentam o número de participantes da pesquisa (Quadro 4.1).

Grupo SD (30)	SD-DP	Pacientes com síndrome de Down sem doença periodontal (15)
	SD+DP	Pacientes com síndrome de Down com doença periodontal (15)
Grupo Controle (30)	C-DP	Pacientes normoreativo sem doença periodontal (15)
	C+DP	Pacientes normoreativo com doença periodontal (15)

Quadro 1. Divisão dos grupos e subgrupos da pesquisa.

Aos participantes do estudo foram realizados encaminhamentos ou tratamento odontológico, quando indicado, conforme as necessidades encontradas, na Clínica de Odontologia, CAPE da FOUSP pelo pesquisador e por demais integrantes do Projeto de Pesquisa.

A coleta dos dados clínicos foi realizada por dois examinadores (RCS e LACA), previamente calibrados. Uma calibração inter e intra-examinador foi realizada através de um estudo piloto, para verificar a concordância. Foram examinadas 10 crianças da clínica de Odontopediatria da FOUSP e reexaminadas após um intervalo de 10 dias. As variáveis mensuradas foram

índice de placa, índice cálculo e profundidade de sondagem, e os valores de concordância Kappa intra-examinador obtidos foram 0,89; 0,73 e 0,82, respectivamente. Os valores de concordância Kappa inter-examinador foram de 0,85; 0,78 e 0,78, respectivamente.

4.3. Anamnese e Exame Clínico

Nesta sessão os indivíduos com SD que necessitaram, receberam técnicas de manejo comportamental/condicionamento. Ainda nesta sessão, todos os indivíduos ou responsáveis foram orientados sobre as coletas, que seriam realizadas em outra sessão.

Os dados foram coletados por meio de anamnese e prontuário médico (quando aplicável), exame clínico odontológico, coleta de saliva não estimulada, coleta de fluído crevicular gengival conforme descrição nos itens a seguir.

Aplicamos um questionário previamente à avaliação bucal, na forma de entrevista (AS), aos responsáveis e pacientes maiores de idade que tiverem condições neurológicas de assim o fazer. Foram obtidas informações referentes à identificação do paciente, história médica pregressa e uso de medicamentos. Todos os dados coletados foram registrados em ficha específica (Anexo C).

Em ambos os grupos, realizamos o exame clínico em cadeira odontológica com uso do refletor, espelho bucal, sonda exploradora WHO (OMS) e sonda periodontal milimetrada (PCP 15, Hufriedy®, Universidade da Carolina do Norte, EUA). As superfícies dentárias foram secas com gaze estéril para facilitar a visualização. Todas as normas de biossegurança foram seguidas rigorosamente, assim como o uso de equipamentos individuais de proteção.

No exame clínico, para a avaliação de cárie dentária utilizamos o índice segundo os critérios propostos pela Organização Mundial de Saúde. Desta forma, avaliamos o número de dentes cariados, extraídos ou obturados para a dentição decídua (ceo-d) e número de dentes cariados, perdidos ou

obturados para a dentição permanente (CPOD). Estes dados foram utilizados como critério para excluir pacientes dos grupos da pesquisa, não sendo utilizados para o desfecho deste estudo.

4.4. Índice de placa e cálculo

Realizamos a avaliação utilizando o Índice de Higiene Oral Simplificado (IHO-S), preconizado por Greene e Vermillion (1964) adaptado às condições da pesquisa, sendo utilizada as superfícies vestibulares do primeiro molar superior direito, primeiro molar superior esquerdo, incisivo central superior direito e as superfícies linguais do primeiro molar inferior direito, primeiro molar inferior esquerdo e incisivo central inferior esquerdo. O IHOS é a combinação do índice de placa e do índice de cálculo. A quantidade de placa e cálculo é medida numericamente, variando de 0 a 3, de acordo com os seguintes critérios:

Índice de placa:

- grau zero (0) – ausência de placa ou mancha extrínseca;
- grau um (1) – presença de placa cobrindo não mais de 1/3 da superfície examinada, ou ausência de placa, mas presença de mancha extrínseca;
- grau dois (2) – presença de placa cobrindo mais de 1/3, mas não mais de 2/3 da superfície examinada, poderá haver ou não presença de mancha extrínseca;
- grau três (3) – presença de placa cobrindo mais de 2/3 da superfície examinada (terço gengival, médio e oclusal).

Obtivemos o índice de placa através da soma dos valores encontrados dividido pelo número de superfícies avaliadas.

Índice de cálculo:

- grau zero (0) – ausência de cálculo supra ou subgengival;
- grau um (1) – presença de cálculo supragengival cobrindo não mais de 1/3 da superfície examinada;

- grau dois (2) – presença de cálculo supragengival cobrindo mais de 1/3 da superfície, mas não mais de 2/3 da superfície examinada, ou presença de pequenas porções de cálculo subgengival em torno da área cervical do dente;
- grau três (3) – presença de cálculo supragengival cobrindo mais de 2/3 da superfície examinada ou uma faixa contínua de cálculo subgengival ao longo da região cervical do dente, ou ambos.

O índice de cálculo foi obtido através da soma dos valores encontrados, dividido pelo número de superfícies avaliadas.

O IHOS é determinado pela soma dos índices de placa e cálculo, atribuindo um código final (média). Este código quando avaliado entre 0 e 1,5 representa boa higiene bucal, entre 1,6 e 2,5, higiene bucal regular e maior que 2,6, higiene bucal ruim.

4.5. Índice de Sangramento

Realizamos o índice de sangramento (IS) por meio da verificação de presença de sangue visível nos pontos sondados até 15 segundos após. A sondagem foi realizada na gengiva marginal após serem secas com jatos de ar e isoladas com roletes de algodão, contemplando a vestibular, ligual/palatina, mesial e distal. Dividimos o número de faces dentais sangrantes pelo número total de faces dentais, obtendo o resultado, que foi anotado e avaliado por meio do teste de Ainamo e Bay (1975), avaliando a presença ou ausência de inflamação em um padrão binomial (contagem dicotômica). Nesse sistema, o sangramento da margem gengival recebeu “1”, enquanto a ausência de sangramento recebeu marcação “0”.

4.6. Avaliação Periodontal

Para a avaliação periodontal, a boca foi dividida em seis sextantes compreendendo os dentes 17-14; 13-23; 24-27; 37-34; 33-43 e 44-47 e as medições foram realizadas percorrendo-se o sulco gengival de todos os dentes com a sonda em uma posição paralela ao longo eixo das unidades dentais, sendo o maior escore do sextante anotado. Definimos a doença periodontal com base na profundidade de sondagem e sangramento a sondagem: quando houvesse pelo menos 1 sítios por sextante com profundidade de sondagem igual ou maior que 4mm e pelo menos 50% com sangramento a sondagem (adaptado de Marchesan et al., 2015).

4.7. Preparo das amostras

Preparamos e analizamos as amostras no Laboratório de Controle e Simulação de Processos do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP (PQI-EPUSP), como descritas nos itens a seguir.

Para a análise do metaboloma coletamos amostras de saliva e para análise microbiológica utilizamos amostras de saliva e fluido crevicular gengival. Os mesmos examinadores (RCS e LACA) realizaram os preparos das amostras, após receberem treinamento de uso dos equipamentos laboratoriais.

4.7.1. Saliva

Coleta

A coleta salivar foi realizada com os participantes de ambos os grupos, controle e experimental, em jejum por um período mínimo de 2 horas, no

horário preconizado às entre 8h e 10 horas, devido ao ritmo circadiano. Os pacientes foram orientados a não higienizar os dentes na manhã prévia a coleta. Posicionamos os indivíduos de maneira sentada e relaxada, em ambiente calmo e arejado.

Coletamos a saliva total dos indivíduos de forma não estimulada, ou seja sem estímulos mecânicos, por meio de expectoração. O paciente foi orientado a ficar com a cabeça inclinada para baixo e boca aberta, toda a saliva produzida nos primeiros trinta segundos foi desprezada (deglutida ou expelida), em seguida iniciamos a coleta. A saliva foi expelida em um tubo Falcon estéril descartável de 15 mL (Falcon®, Rio de Janeiro) de acordo com o método modificado de Navazesh (Navazesh; Kumar, 2008), até que atingíssemos um mínimo de 3 mL.

Após a coleta, fechamos os tubos hermeticamente e os transportamos em bolsa térmica com gelo por um período de no máximo 1 hora até o laboratório e armazenamos a -80°C até o momento da análise.

Nos indivíduos que apresentaram dificuldade na realização do teste devido à falta de maturidade intelectual ou dificuldade para cuspir a saliva, utilizou-se roletes de algodão estéril amarrados a um fio dental, que foram introduzidos na boca, e trocados quando imersos por saliva. A saliva colhida através dos roletes de algodão foi espremida em um tubo Falcon estéril 15 mL (Souza, 2011).

Análise Metabolômica da Saliva

O preparo de cada amostra ocorreu em duplicata e iniciamos com o descongelamento das amostras à temperatura ambiente, por meio de uma micropipeta automática (Biobit, 100 a 1000 µL), 300 µL de saliva foram transferidos para um tubo plástico de 1,5 mL (Axygen, Nova York, Estados Unidos) e foram secas em aparelho Speed Vac (Centrivap Concetrator, Labcono) por um período de 2h ou até secagem completa. Após o processo de secagem realizamos a extração dos compostos em uma etapa.

Adicionamos 300 µL de metanol em tubo plástico contendo a amostra seca, então procedemos com a agitação em agitador tipo vortex (modelo AP59, Phoenix Luferco, 3800 rpm) por 2 minutos seguido de centrifugação

(modelo 800-1, 13000 rpm) por 2 minutos. Desta reação, 150 µL foram transferidos para dois novos tubos plásticos e novamente submetidos ao processo de secagem em aparelho SpeedVac.

Seguido ao processo de extração, realizamos a derivatização, adicionando a cada tubo plástico 150 µL de partes iguais de uma solução de bistrimetil-silil-trifluoroacetamida e uma mistura de solventes, acetonitrila: diclorometano: ciclohexano - (v/v 5:4:1) com 5% de trietilamina, seguido de agitação em agitador do tipo vortex novamente por 2 segundos e mantido em banho térmico a 60°C durante 1 hora. As amostras foram retiradas do banho térmico, agitadas e centrifugadas (13000 rpm por 2s). O sobrenadante foi transferido para um frasco de vidro de 2mL transparente com tarja (CMS 123TAT, Brasil) e insert, por meio de uma micropipeta eletrônica, com posterior injeção de 1 µL da amostra em cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa (GC-MS, QP2010 Plus, Shimadzu do Brasil), coluna DB-1, 50 m de comprimento, diâmetro interno de 0,32 mm e espessura de filme de 1,20 µm.

As amostras foram analisadas sob as seguintes condições dispostas no Quadro 4.2.

Temperatura do injetor	280ºC
Temperatura inicial da coluna	50ºC
Taxa de aquecimento	5°C por min até 300°C, permanecendo a essa temperatura por 10 min.
Tempo total de corrida	60 minutos
Temperatura de ionização	300ºC
Corte de solvente	5 minutos
Temperatura de interface	290ºC
Módulo de injeção	Splitless

Quadro 4.2 Condições de análise determinadas do GC-MS

Para cada amostra analisada obtivemos um cromatograma de íons total (TIC) com intervalo de massa de 40 a 600 DA.

Avaliação Microbiológica da Saliva

Após o descongelamento das amostras de saliva à temperatura ambiente, à semeamos com alça bacteriológica estéril descartável em uma placa contendo meio AGAR BHI (Brain Heart Infusion) e foram à colocamos em estufa bacteriológica a 37ºC por 48h, repicadas até a obtenção de colônias isoladas de uma única bactéria. Após o crescimento nas placas, realizamos a extração com ácido fórmico 70% para identificação dos microrganimos através do método *MALDI-TOF* (Bruker Daltonik GmbH, Alemanha), segue a descrição da extração a seguir.

Com auxilio de uma espátula estéril descartável, coletamos uma pequena porção de bactérias e transferimos para um tubo plástico contendo 300µL de água Milli-Q, e então procedemos uma agitação em vortex por 1 minuto e adicionamos 900µL metanol. O conteúdo foi novamente agitado em vortex e centrifugado a 13000 rpm por 2 minutos. Cuidadosamente descartamos o sobrenadante desta reação e adicionamos 50µL de ácido fórmico 70% no precipitado e realizamos nova agitação em vortex durante 1 minuto. Este preparado recebeu 50µL de acetonitrila e realizamos uma nova agitação vortex e centrifugação a 13000 rpm durante 2 minutos. O sobrenadante obtido foi analisado através do sistema *MALDI-Biotyper software* (version 2.0; Bruker Daltonics, Alemanha). Para realizar esta análise, pipetamos 1µL do sobrenadante e transferimos para placa de MALDI; o mesmo foi seco em temperatura ambiente, e coberto com 1,0 µL de solução de matriz, composta de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico saturado 10mg/ml – acetonitrila 50% e ácido trifluoracetico 2,5%. Após a secagem em temperatura ambiente, realizamos a análise para identificação morfológica dos microrganismos através do método *MALDI-TOF*. Os espectros obtidos foram em seguida analisados pelo programa *MALDI Biotyper* 2.0 (Bruker Daltonics, EUA) com as configurações padrão para obtenção da identificação bacteriana.

Esta metodologia pode ser verificada de modo simplificado na Figura 5. O algoritmo utilizado pelo *MALDI Biotyper* confronta os espectros da

amostra desconhecida com amostras referência contidas em um banco de dados de referência. O procedimento de análise leva em consideração as massas e as intensidades relativas dos espectros desconhecidos (Lartigue et al., 2009). Neste estudo consideramos somente os espectros de bactéria com escore acima de 2,0.

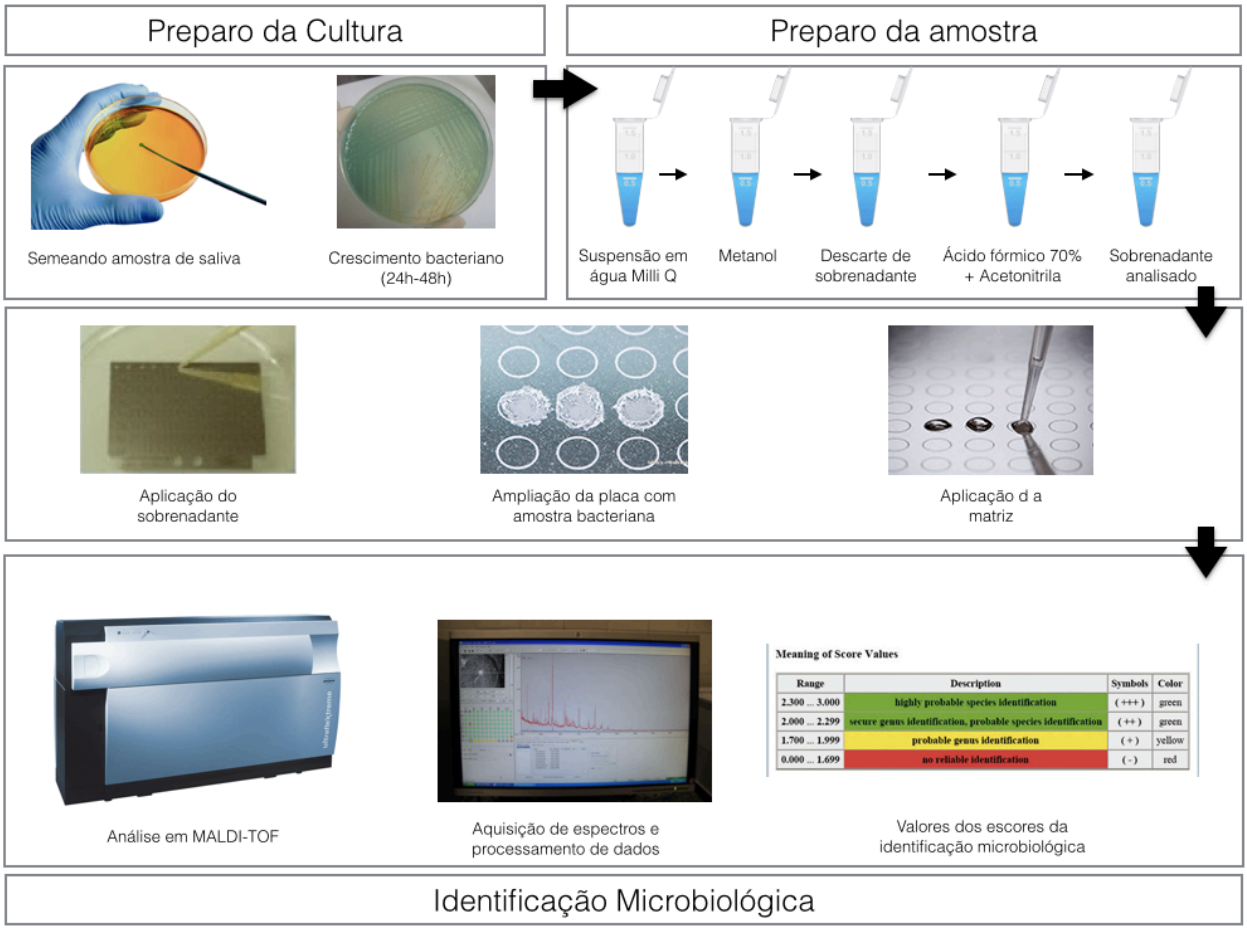


Figura 4.1 Esquema de análise microbiológica utilizando o *MALDI-Biotyper* preconizado para este estudo.

4.7.2. Fluido Crevicular Gengival (FCG)

Coleta

Para a avaliação microbiológica do FCG seguimos as mesmas recomendações da coleta salivar. O mesmo foi coletado após isolamento das regiões com gaze estéril para prevenir a contaminação salivar e o biofilme supragengival foi removido com bolinha de algodão estéril.

Para os grupo SD-DP e C-DP, obtivemos as amostras de 4 regiões sadias (ausência de bolsa periodontal) para cada individuo; para o SD+DP e C+DP obtivemos as amostras de 4 regiões com doença periodontal (bolsa periodontal acima de 4mm) para cada individuo, sendo considerados os sítios com maior profundidade de sondagem na boca do paciente (Barnes et al., 2009; Marinho et al., 2012). Coletamos o material por meio de cones de papel absorvente estéreis nº 20 (Dentsply, Brasil), que foram inseridos gentilmente no interior da bolsa até sentir resistência, 1mm a 2mm, e permaneceram no local por 20 segundos. Após esse procedimento, as amostras de cada categoria foram reunidas (pool) e armazenadas em tubos tipo plástico -80ºC para posterior cultura. Descartamos as amostras visivelmente contaminadas com sangue e após 3 minutos, repetimos o procedimento de coleta (Marinho et al., 2012).

Avaliação Microbiológica do Fluído Crevicular

Para análise microbiológica submetemos os cones de papéis referentes a cada paciente ao cultivo em placas contendo o meio Agar BHI, através do auxilio de uma alça estérial descartável, e posteriormente incubados em estufa bacteriológica a 37ºC por 48h, repicadas até a obtenção de colônias isoladas de uma única bactéria. Após o crescimento das colônias

realizamos a extração e análise sob as mesmas condições descritas para as amostras de saliva.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para responder aos objetivos do estudo utilizamos, além de técnicas básicas de análise exploratória como média, mediana, desvio padrão, frequência absoluta e relativa, outras quatro metodologias de análise estatística: o teste do Qui-Quadrado, a Análise de Componentes Principais, os testes de Kruskal-Wallis e os de Mann-Withney.

O teste Qui-quadrado foi utilizado para verificar se havia diferença estatística entre as bactérias identificadas nos grupos estudados, tanto para as amostras de saliva, como para amostras de fluido crevicular gengival.

A Análise de Componentes Principais geram modelos usados a principio porque a partir deles é possível obter um resumo dos dados multivariados. Tal resumo revela agrupamentos, tendências de separações, *outliers*, relação entre variáveis e amostras. Desta forma, foi possível analisar os indivíduos segundo esses componentes encontrados através da análise do primeiro plano fatorial, relacionando ainda essa estrutura de correlações com a separação entre os quatro grupos de estudo.

Já os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Withney foram utilizados para avaliar, estatisticamente, a diferença da presença/ausência de SD, da presença/ausência de periodontite na SD, da presença de SD nos indivíduos com e sem SD e, também, para os quatro grupos de estudo em relação ao percentual da área de cada um dos metabólitos não exclusivos. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado quando a variável segmentadora foi o grupo (mais de 2 categorias) e o teste de Mann-Withney foi utilizado quando as variáveis segmentadoras foram a SD e a DP (apenas 2 categorias cada).

Todos os testes de hipóteses desenvolvidos nesse trabalho consideraram uma significância de 5%, ou seja, a hipótese nula foi rejeitada quando p-valor foi menor ou igual a 0,05.

6. RESULTADOS

6.1. Dados Demográficos e Clínicos

O presente estudo foi conduzido com pacientes com síndrome de Down, provenientes do Centro de Atendimento ao Paciente Especial da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (CAPE-FOUSP). Solicitamos uma lista de indivíduos com SD cadastrados no CAPE com idades entre 12 e 21, sendo obtido 108 indivíduos até a data de Novembro de 2013. Todos foram contatados por telefone e email, obtendo sucesso no contato com 88 indivíduos (81%). O fluxograma abaixo (Figura 6.1) revela o desdobramento do recrutamento dos indivíduos da pesquisa. Isto posto, os indivíduos foram avaliados clinicamente e alocados para os subgrupos com ou sem doença periodontal, através do critérios já descritos até que preenchessem a amostra proposta.

Recrutamos os indivíduos do grupo controle na Clínica Odontológica do departamento de Ortodontia e Odontopediatria da FOUSP, segundo os mesmos critérios, sendo pareados em relação à idade dos indivíduos com DP.

Os grupos estudados se apresentaram de forma homogênea em relação a faixa etária, apresentando idade média dos indivíduos com SD de 15.7 (DP± 2.46), enquanto que para os indivíduos do grupo controle, 15.2 (DP± 2.17). O mesmo ocorreu quando avaliamos os subgrupos, podendo ser verificado na Tabela 6.1. Ao se avaliar o sexo, é possível notar maior prevalência do gênero masculino em ambos os grupos, porém, não apresentando significância estatística ($p = 0.4409$).

Ainda na Tabela 6.1, é possível observar os valores do IP para todos os grupos, com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.0001$). É possível notar que nos indivíduos com SD, com e sem doença periodontal o IP se apresenta elevado quando comparado aos grupos controles, também sendo significante quando analisados de forma isolada $P = 0.0439$. Ou seja, independente de ter ou não doença periodontal, indivíduos com SD

apresentam maior índice de placa do que pacientes normorreativos sem e com doença periodontal (Tabela 6.1).

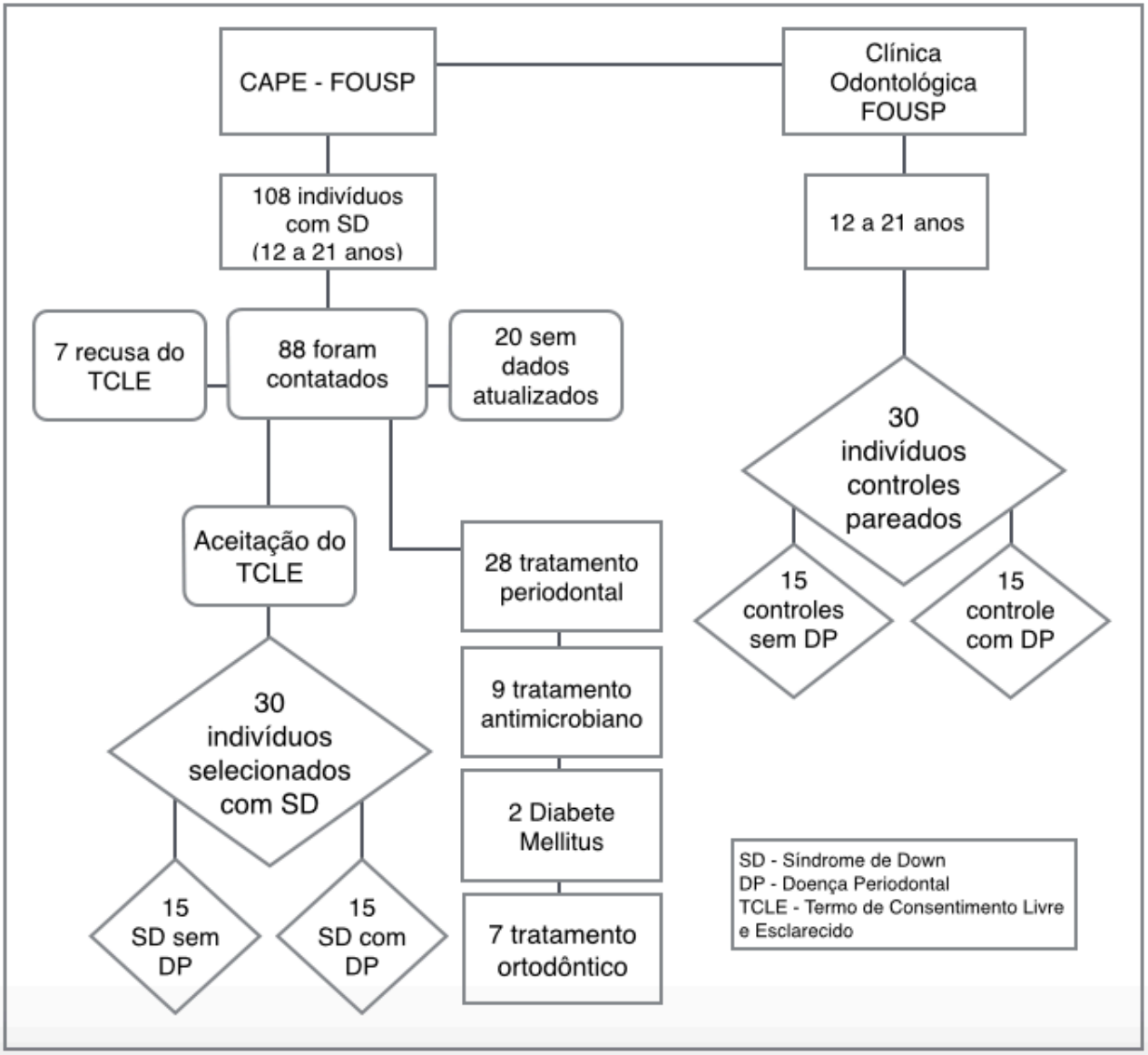


Figura 6.1 Fluxograma do recrutamento de pacientes para pesquisa

Tabela 6.1 Distribuição e Frequência das variáveis clínicas do estudo

Variável	Síndrome de Down		Controle		p valor
	Sem DP n (%)	Com DP n (%)	Sem DP n (%)	Com DP n (%)	
Sexo					
Masculino	10 (66.7)	12 (80.0)	8 (53.3)	11 (73.3)	P = 0.4409
Feminino	5 (33.3)	3 (20.0)	7 (46.6)	4 (26.6)	
Idade (média±DP)	14.73±2.01	16.73±2.52	14.40±2.22	16.00±1.85	-
Índice de Placa					
Baixo	3 (5)	2 (3.3)	11 (18.3)	3 (5)	
Moderado	10 (16.6)	2 (3.3)	4 (6.6)	4 (6.6)	P < 0.0001
Grave	2 (3.3)	11 (18.3)	0	8 (13.3)	
Índice de Cálculo					
Ausente	11 (19.3)	5 (8.7)	15 (26.3)	5 (8.7)	P = 0.0002
Presente	1 (1.7)	10 (17.5)	0	10 (17.5)	
Sangramento a Sondagem					
Ausente	6 (10)	0	12 (20)	0	P < 0.0001
Presente	9 (15)	15 (25)	3 (5)	15 (25)	
Profundidade de Sondagem					
< 3 mm	13 (21.6)	1 (1.7)	13 (21.6)	1 (1.7)	
3 a 4 mm	2 (3.3)	9 (15)	2 (3.3)	10 (16.6)	P < 0.0001
> de 5mm	0	5 (8.3)	0	4 (6.6)	

* estatisticamente significante; [1]Teste do Qui-quadrado.

O índice de cálculo também foi observado, e encontramos valores homogêneos para grupos com e sem doença periodontal, independente da SD. Importante observar que a diferença entre grupos apresentou significância (p = 0.0002), uma vez que indivíduos sem doença periodontal, independe do grupo apresentaram o índice de cálculo muito baixo.

Todos os indivíduos com DP, independente do grupo, apresentaram sangramento a sondagem. Porém, 60% dos indivíduos com SD sem a DP também apresentaram sangramento a sondagem, contra 30% dos controles

sem a doença. Quando comparamos os subgrupos entre eles foi possível observar que a diferença entre os eles foi estatisticamente significante ($p < 0.0001$).

As amostras foram pareadas em relação ao número de indivíduos de cada grupo e subgrupos, sendo que os critérios de inclusão de cada grupo, principalmente os adotados para a definição do diagnóstico de doença periodontal, revelaram grupos homogêneos em relação a profundidade de sondagem. É possível observar valores de frequência muito próximos, que claramente apresentam significância estatística ($p < 0.0001$) quando comparado entre indivíduos com e sem DP, independente de ter ou não SD.

A Tabela 6.2 revela a variável profundidade de sondagem quando avaliada em relação ao grupo, onde percebemos que o grupo SD, independente da condição periodontal, apresenta valores maiores – o que pode ser relacionado a severidade da doença periodontal ($P = 0.03551$).

Tabela 6.2 Distribuição dos Índice de Placa e Profundidade de Sondagem entre indivíduos com e sem síndrome de Down.

Variável	0	1	2	Total
Índice Placa				
Controle	14	8	8	P = 0.4292
SD	5	12	13	
Profundidade de Sondagem				
SD	11	9	10	P = 0.03551
Controle	15	13	2	

* estatisticamente significante; [1]Teste do Qui-quadrado.

6.2. Metaboloma Salivar

Inicialmente, desenvolvemos o Diagrama de Venn, avaliando a distribuição dos metabólitos entre os grupos, de forma a representar os metabólitos e as diferentes relações existentes entre metabólitos e grupos. Feito isso, desenvolvemos a Análise de Componentes Principais e correlação entre metabólitos. Por fim, avaliamos estatisticamente a quantificação relativa

dos metabólitos entre grupos em relação ao percentual da área (presentes no cromatograma de íons totais - TIC) de cada um dos metabólitos comuns a todos os grupos. Apresentamos uma tabela descritiva também demonstrando a frequência de metabólitos exclusivos de cada grupos (ANEXO F).

Observamos pelo diagrama de Venn (Figura 6.2) que o grupo C-P (controle sem doença periodontal) foi o que apresentou a maior quantidade de metabólitos exclusivos (349), seguido do grupo C+P (199), SD-DP (81) e SD+DP (70). Os grupos que mais compartilham metabólitos entre si são os grupos C-P e C+P, com 191 metabólitos. Temos ainda que 155 metabólitos são compartilhados por todos os quatro grupos.

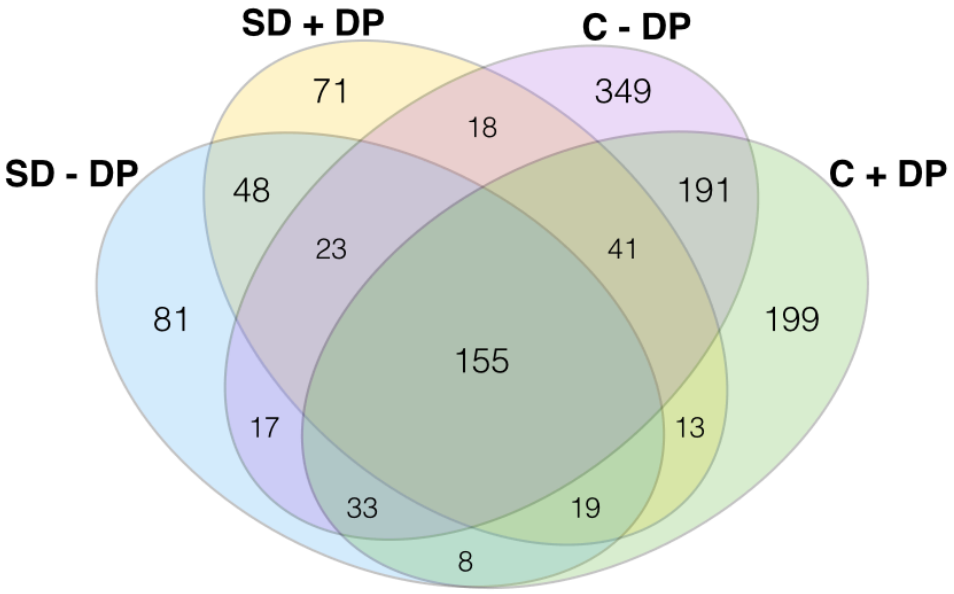


Figura 6.2 Diagrama de Venn dos metabólitos salivares

Conduzimos um modelo de PCA preliminar com aplicação de um filtro de 20% para os metabólitos encontrados em todos os grupos. Considerando o número de componentes igual a quantidade de autovalores maiores que 1, observamos que 32 componentes principais explicam 95% da variabilidade dos dados, sendo que os dois primeiros componentes explicam, juntos, 35% da variabilidade dos dados. Esses resultados são apresentados na Tabela 6.3 e no Gráfico 6.1.

Tabela 6.3 Autovalores e % de variabilidade explicada para PCA dos metabólitos de saliva presentes em pelo menos 20% da amostra

Componente	Autovalor	% variabilidade explicada
1	43,97	0,30
2	7,60	0,35
3	7,03	0,40
4	6,35	0,44
5	5,49	0,48
6	5,31	0,51
7	4,92	0,55
8	4,64	0,58
9	4,41	0,61
10	4,13	0,63
11	3,78	0,66
12	3,51	0,68
13	3,08	0,70
14	3,01	0,72
15	2,90	0,74
16	2,72	0,76
17	2,53	0,78
18	2,38	0,80
19	2,31	0,81
20	2,28	0,83
21	2,18	0,84
22	2,04	0,86
23	1,88	0,87
24	1,71	0,88
25	1,65	0,89
26	1,43	0,90
27	1,41	0,91
28	1,26	0,92
29	1,22	0,93
30	1,10	0,93
31	1,07	0,94
32	1,00	0,95

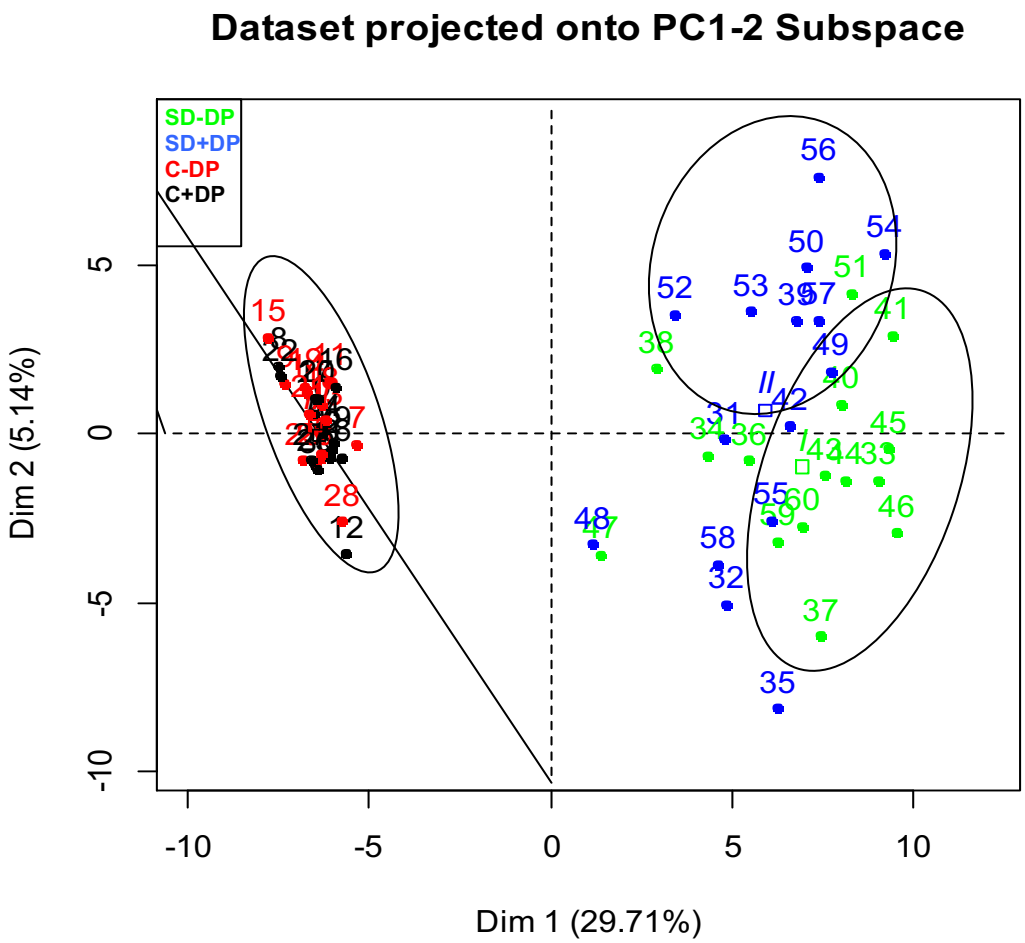


Gráfico 6.1 Primeiro plano fatorial dos metabólitos da saliva (20%)

No Gráfico 6.1, observamos que o primeiro componente está separando os grupos com SD dos indivíduos controles. Vemos ainda que para os indivíduos com síndrome de Down (SD-DP e SD+DP) há uma melhor separação entre presença e ausência de doença periodontal, ou seja, seus metabólitos são mais distintos do que no caso dos indivíduos controles (C-DP e C+DP). Avaliando o grupo com SD+DP, observamos uma maior heterogeneidade de metabólitos, uma vez que estes estão apresentados menos concentrados no gráfico.

Conduzimos outra análise de PCA com aplicação de um filtro de 70% para poder entender qual a relação entre metabólitos e grupos, quando avaliados os metabólitos com menor variabilidade entre grupos. A aplicação do filtro também contribuiu para facilitar a visualização do resultado, uma vez

que existem muitos metabólitos em análise e a plotagem de todos eles torna a interpretação inviável.

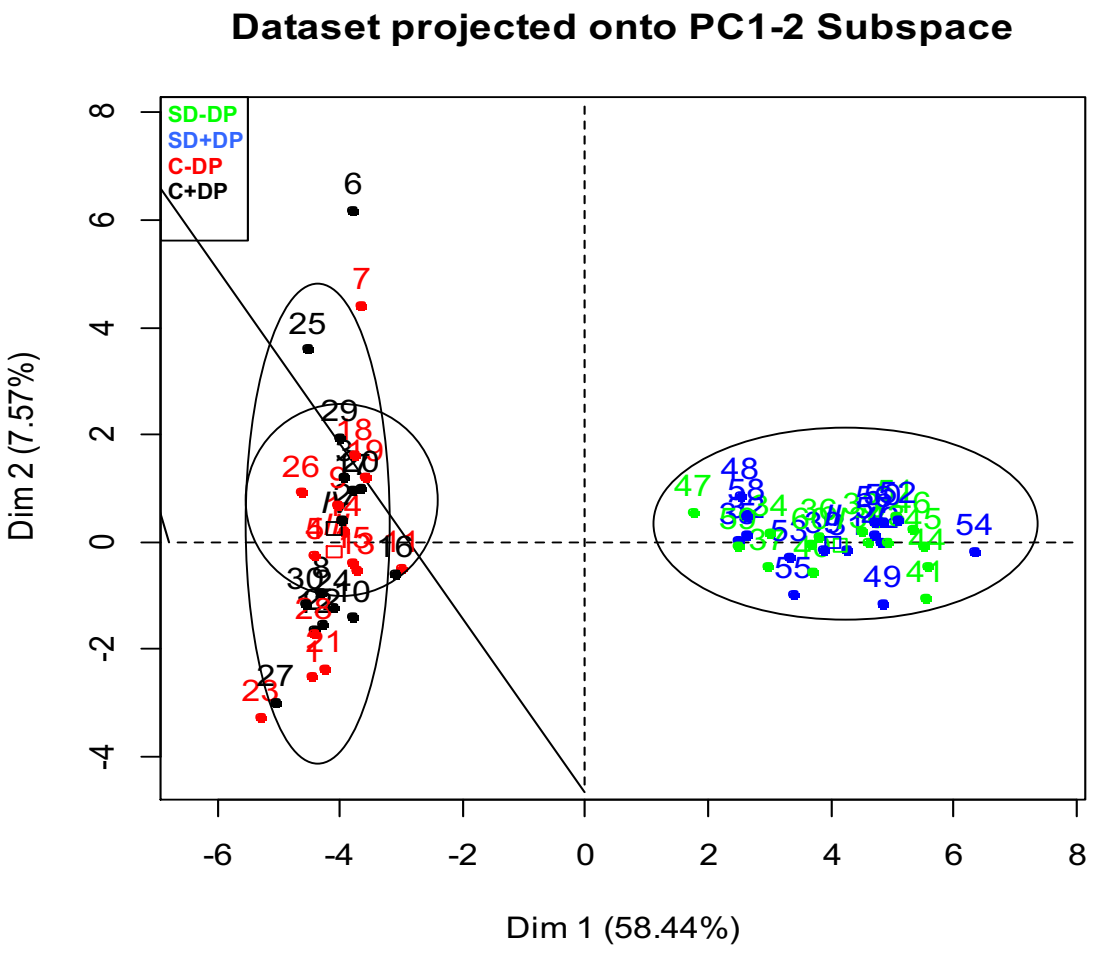


Gráfico 6.2 Primeiro plano fatorial dos metabólitos da saliva (70%).

Neste segundo gráfico (Gráfico 6.2), o modelo de PCA ainda separa os componentes principais dos grupos com e sem a SD. Isso demonstra uma tendência de metabólitos diferentes entre estes grupos. Verificamos também que os grupos com SD-DP e SD+DP estão mais agrupados, e pode ser devido a aplicação do filtro, que gerou uma diminuição de metabólitos menos significativos.Os metabólitos presentes sugerem uma maior relação dos metabólitos da DP, mesmo em índividuos que não apresentam esta condição. Podemos observar que quando avaliados os grupos com doença periodontal (C+DP e SD+DP) os mesmos não compartilham do mesmo plano

fatorial. Esta separação pode sugerir que a correlação de metabólitos nestes grupos se diferem.

A partir deste modelo de PCA realizamos uma análise de correlação entre metabólitos através do mapa de fatores para as variáveis (Gráfico 6.3), em que os metabólitos foram plotados também no primeiro plano fatorial. O mapa fator variáveis apresenta a quantidade de variância de cada parâmetro na variância total no PCA. Quando a seta é mais longa, o valor do desvio total é maior. Para isso, cada metabólito foi codificado e constam na tabela do anexo D.

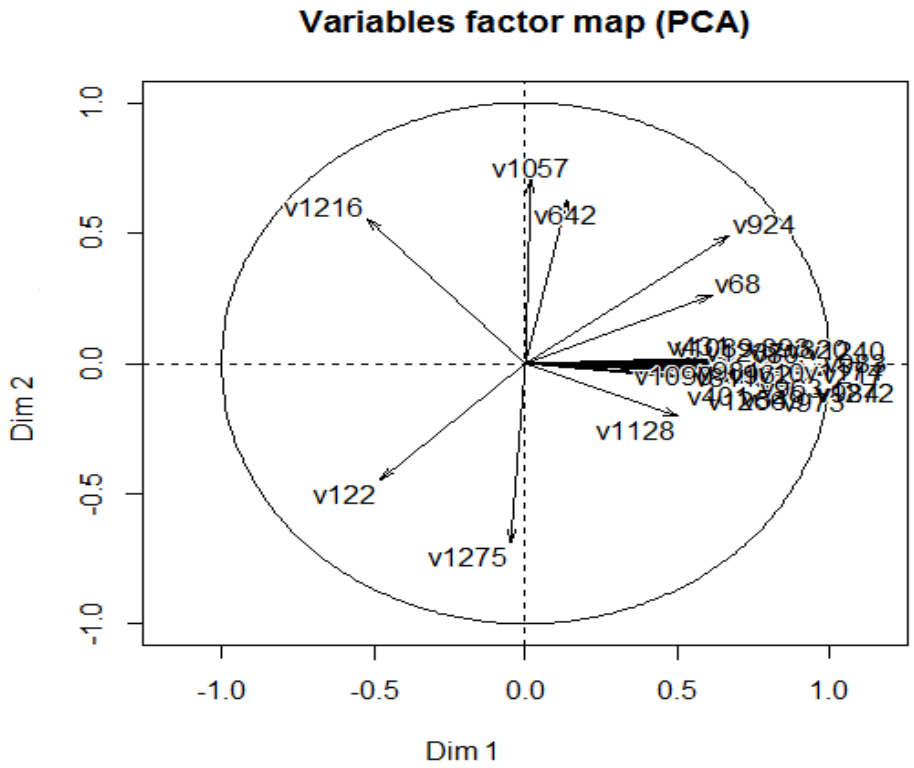


Gráfico 6.3 Projeção bidimensional dos metabólitos da saliva em comum a todos os grupos, e a correlação em função dos componentes principais.

Na análise de correlações, observamos que, dentre os metabólitos salivares presentes, os metabolitos *Octadecanoic acid* (v1057) e *Benzonitrile (*v642) são altamente correlacionados, os metabólitos *Cyanuric acid* (v122) e *Urea* (v1275) são altamente correlacionados, *Palmitic acid* (v924) e *D-Mannopyranose* (v68) também são altamente correlacionados e o metabóltito *Phosphate* (v1216) é com menor relação aos outros metabólitos. Também é

possível visualizar um feixe de linhas a direita no meio da projeção, indicando que estes demais metabólitos são altamente correlacionados.

Como esperado, as amostras de saliva não foram bem separadas com esse método estatístico, ao avaliar os quatro grupos simultâneos. Então, procedemos a novos modelos de PCA para melhor avaliar se houve separação entre os grupos SD-DP e SD+DP, e também entre SD+DP e C+DP. Para isso, geramos novas tabelas de autovalores.

Na tabela 6.4, é possível perceber que 12 componentes explicam 84% da variabilidade dos dados, sendo que os dois primeiros componentes explicam, juntos, 31% da variabilidade dos dados.

Tabela 6.4 Autovalores e % de variabilidade explicada para PCA dos metabólitos de saliva dos grupos SD-DP e SD+DP

Componente	Autovalor	% variabilidade explicada
1	8,78	21
2	4,26	31
3	3,64	40
4	3,35	48
5	2,80	54
6	2,60	61
7	2,25	66
8	1,92	70
9	1,88	75
10	1,49	79
11	1,19	81
12	1,10	84

Com o modelo de dados obtidos (Gráfico 6.4), observamos uma leve separação entre os grupos SD-DP e SD+DP no primeiro plano fatorial. O grupo SD-DP está mais aglutinado a direita, enquanto o grupo SD+DP está mais a esquerda, apresentando uma tendência de maiores outliers do que o grupo SD-DP. A sobreposição no centro da figura entre os grupos, propõe que existam metabólitos cujas áreas são comuns entre os dois grupos. Desta forma, podemos sugerir que índividuos com SD sem DP compartilham alguns metabólitos da doença periodontal. Uma leve separação ocorre no grupo SD+DP, sugerindo que poucos metabólitos exclusivos da doença periodontal nestes indivíduos tenham sua concentração alterada.

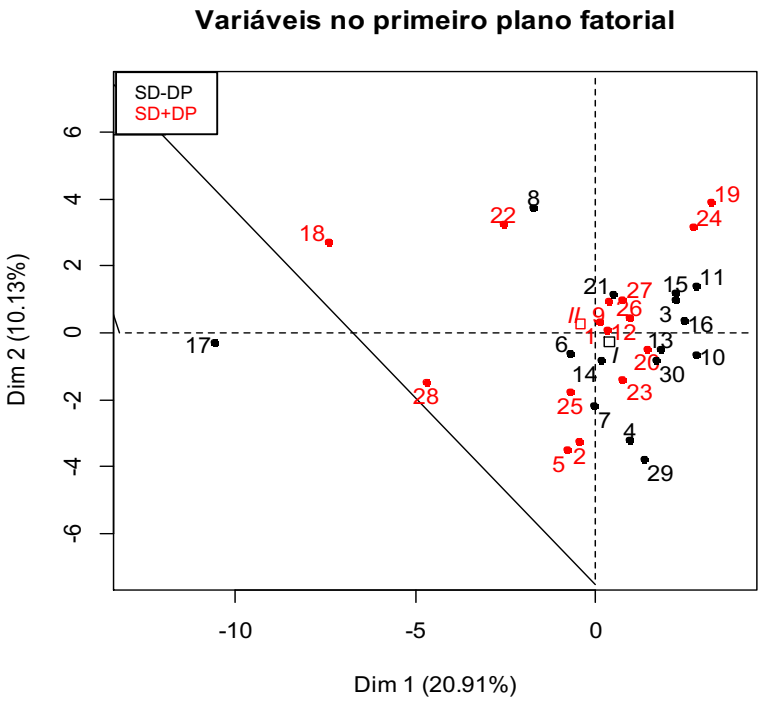


Gráfico 6.4 Primeiro plano fatorial dos metabólitos da saliva dos grupos SD-DP e SD+DP

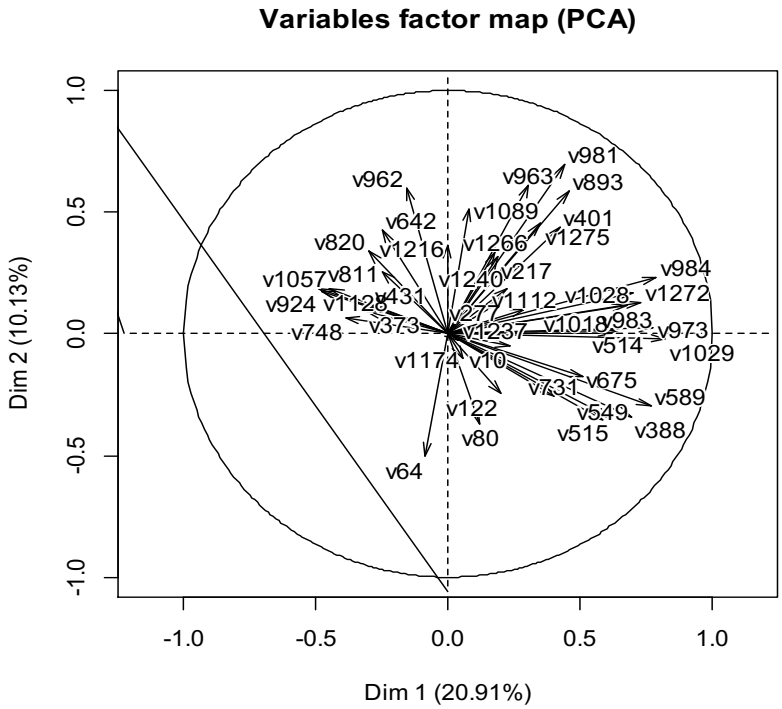


Gráfico 6.5 Projeção bidimensional dos diferentes metabólitos da saliva dos grupos SD-DP e SD+DP

O Gráfico 6.5 revela a análise de correlação deste modelo, demonstrando 3 grandes grupos que se correlacionam. O primeiro grupo no primeiro quadrante da figura, o segundo no segundo quadrante e o terceiro no terceiro quadrante. Vemos o metabólito *Benzoic acid* (v64) um pouco mais separado destes blocos porém próximo dos metabólitos *Cyanuric acid* (v122), *1-(4-Isopropylphenyl)-3-(2-furyl)propane* (v80) e *Silanamine* (v1174).

A análise de PCA para os grupos SD+DP e C+CP, apresenta um número reduzido de metabólitos em comum entre estes grupos, o que gerou uma redução dos componentes principais (Tabela 6), sendo apresentado 6 componentes que juntos explicam 85% da variabilidade dos dados, os dois primeiros componentes explicam, juntos, 68% da variabilidade dos dados.

Tabela 6.5 Autovalores e % de variabilidade explicada para PCA dos metabólitos de saliva dos grupos SD+DP e C+DP.

Componente	Autovalor	% variabilidade explicada
1	17,70	59
2	2,63	68
3	1,77	74
4	1,40	78
5	1,17	82
6	0,97	85

Ao avaliarmos o primeiro plano fatorial observamos que há uma clara separação entre os grupos SD+DP e C+DP quando analisamos o percentual da área dos metabólitos presentes (Gráfico 6.6). A separação é feita primordialmente na primeira dimensão que explica 58% dos dados.

Quanto à análise de correlação dos metabólitos, neste modelo observamos que há um grande grupo,no lado direito, composto pela maioria dos metabólitos analisados (Gráfico 6.7). Vemos ainda dois pequenos grupos, um composto pelos metabólitos *Phosphoric Acid* (v1216), *Octadecanoic acid* (v1057) e *Benzonitrile* (v642) e outro composto pelos metabólitos *Cyanuric acid* (v122) e *Urea* (v1275).

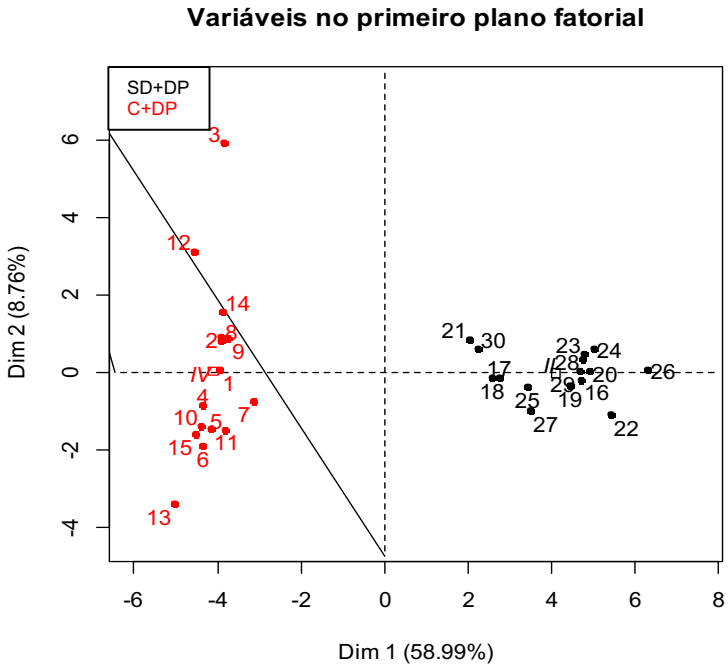


Gráfico 6.6 Primeiro plano fatorial dos metabólitos da saliva dos grupos SD+DP e C+DP.

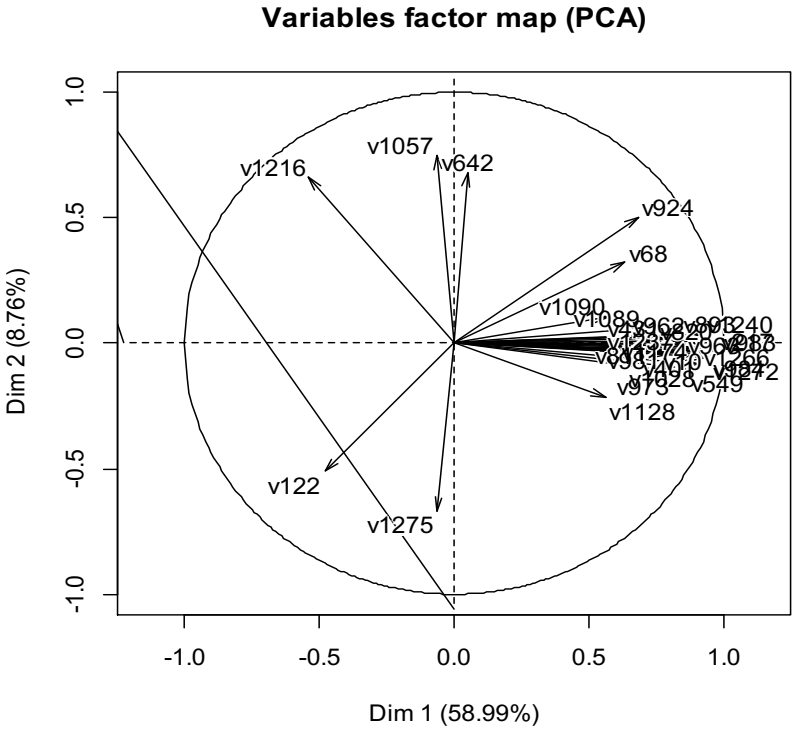


Gráfico 6.7. Projeção bidimensional dos diferentes metabólitos da saliva dos grupos SD+DP e C+DP.

Em seguida avaliamos a quantificação relativa de metabólitos em comum para os todos os grupos e também para análises de grupos separados. Um filtro foi aplicado para permitir buscar metabólitos presentes em 70% das amostras de um mesmo grupo. Assim, apenas os compostos que estavam presentes em 70% dos indivíduos de um mesmo grupo foram considerados válidos. Os resultados revelam somente os metabólitos que tiveram diferença estatística. Os demais resultados podem ser podem consultados no Anexo E, porém, não revelam grande importância para o objetivo deste estudo, uma vez que aparecem em todos os grupos e sem alteração de sua quantidade significativa.

As Tabelas 6.6 e 6.7 apresentam, respectivamente, os resultados dos testes de Mann-Withney para síndrome de Down e doença periodontal, enquanto os resultados dos testes para os grupos sem DP, comparando indivíviduos com SD e controle estão expressos na Tabela 6.8. Todos esses resultados são ordenados em ordem crescente pelo p-valor, ou seja, pelas diferenças que apresentaram maior significância estatística (menor p-valor).

Tabela 6.6 Média, mediana e desvio padrão dos metabólitos em comum nos índividuos com SD com e sem DP seguido do p-valor do teste de Mann-Withney

Metabólito	Grupo						p-valor
	SD-DP			SD+DP			
	Média	Mediana	Desvio Padrão	Média	Mediana	Desvio Padrão	
L-phenylalanine	4,13	4,06	1,34	3,31	3,53	1,49	0,0343
Disiloxane	4,42	3,96	1,71	5,76	5,19	2,15	0,0380

Tabela 6.7 Média, mediana e desvio padrão dos metabólitos em comum nos índividuos com SD com DP e controle com DP seguido do p-valor do teste de Mann-Withney

Metabólito	Grupo						
	S+DP			C+DP			
	Média	Mediana	DP	Média	Mediana	DP	p-valor
Glycine	6,91	7,44	2,94	1,23	0,59	1,36	<.0001
Palmitic Acid	2,83	2,84	0,09	1,61	1,37	0,99	<.0001
I-Trimethylsiloxy-2-aminoethane	7,12	6,56	2,51	0,97	0,38	1,66	<.0001
(R,S)-5-Ethyl-6-methyl-3E-hepten-2-one	3,33	3,26	1,12	0,13	0,14	0,09	<.0001
l-Alanine	8,45	8,96	3,09	1,11	0,66	1,48	<.0001
Silanamine, 1,1,1-trimethyl-N	4,37	4,15	1,68	0,25	0,27	0,13	<.0001
1-Nonadecene	4,71	4,38	0,93	0,09	0,09	0,08	<.0001
Glycerol	8,07	8,35	3,2	0,17	0,13	0,19	<.0001
3,6-Dioxa-2,7-disilaoctane, 2,2,4,7,7-pentamethyl-	4,13	3,19	2,64	0,22	0,19	0,24	<.0001
L-Serine	3,69	3,84	1,17	0,11	0,09	0,12	<.0001
Tetrasiloxane, decamethyl-	5,22	5,37	1,43	0,3	0,16	0,34	<.0001
Tyrosine	3,28	3,49	0,96	0,15	0,14	0,15	<.0001
Disiloxane, triethyltrimethyl-	5,76	5,19	2,15	0,28	0,11	0,32	<.0001
Phosphoric acid	5,44	5,33	1,5	13,44	10,01	8,45	0,0002
L-threonine	3,56	3,89	1,51	0,1	0,06	0,11	0,0002
Acetic acid	2,88	3,28	1,2	0,11	0,06	0,14	0,0003
Tetradecanoic acid	3,34	3,78	1,41	0,17	0,18	0,11	0,0007
Propanoic acid	11,37	11,05	2,28	5,25	4,2	5,08	0,0009
L-Proline	5,68	6,08	2,76	1,09	0,18	2,06	0,0010
L-Leucine	3,37	3,72	1,88	0,38	0,24	0,39	0,0029
Dihydrocoumarin, 4,4,5,7,8-pentamethyl	2,52	3,1	1,31	0,33	0,25	0,32	0,0029
3-Methyl-1,3-bis(trimethylsilyloxy)butane	3,08	3,62	2,18	0,1	0,11	0,09	0,0120
Pentanoic acid	3,1	3,48	2,55	0,35	0,12	0,58	0,0154
D-Mannopyranose	2,88	3,85	1,82	0,76	0,3	0,86	0,0247
2,4,6-Trioxy -1,3,5-Triazine	3,15	3,14	0,21	11,08	8,1	11,3	0,0309

Os resultados apresentados nesta tabela apontam para o aumento de diversos metabólitos nos indivíduos com SD e DP, estando com concentração relativamente mais baixa apenas *Phosphoric acid* e *1,3,5-2,4,6-Trioxy-1,3,5-Triazine.*

Tabela 6.8. Média, mediana e desvio padrão dos metabólitos em comum nos índividuos com e sem SD sem DP seguido do p-valor do teste de Mann-Withney.

Metabólito	Grupo						p-valor
	SD-DP			C-DP			
	Média	Mediana	DP	Média	Mediana	DP	
(R,S)-5-Ethyl-6-methyl-3E-hepten-2-one	3,58	3,37	0,7	0,14	0,12	0,1	<.0001
Silanamine, 1,1,1-trimethyl-N-(trimethylsilyl)-	4,43	4,16	0,91	0,3	0,32	0,12	<.0001
Glycine	7,59	7,93	4,04	0,81	0,39	0,95	<.0001
l-Trimethylsiloxy-2-trimethylsilyl-aminoethane	6,68	7,37	2,17	0,57	0,42	0,49	<.0001
l-Alanine	8,6	9,84	4,1	0,36	0,3	0,3	<.0001
1-Nonadecene	4,44	4,27	0,66	0,14	0,13	0,1	<.0001
Glycero	8,38	8,32	2,67	0,75	0,24	1,92	<.0001
Tetradecanoic acid	3,64	3,63	1,08	0,17	0,21	0,14	<.0001
L-Serine	3,89	4,06	1,12	0,1	0,06	0,11	<.0001
Tyrosine	3,27	3,61	0,95	0,17	0,11	0,19	<.0001
Tetrasiloxane, decamethyl-	4,69	4,35	1,82	0,2	0,16	0,26	<.0001
Disiloxane, triethyltrimethyl-	4,42	3,96	1,71	0,37	0,5	0,36	<.0001
1-(4-Isopropylphenyl)-3-(2-furyl)propane	3,72	3,98	1,11	0,42	0,54	0,43	<.0001
L-phenylalanine	4,13	4,06	1,34	0,13	0,03	0,2	<.0001
3,5-Disilaheptane, 3,3,5,5-tetramethyl-	3,42	3,96	1,4	0,07	0,03	0,09	0,0002
5-Phenyl-piperonylic acid	3,4	3,82	1,41	0,33	0,06	0,4	0,0002
Benzene, 1,2,3-trimethyl-	5,59	6,61	2,46	0,19	0,1	0,21	0,0002
Pentanoic acid	3,11	3,45	1,32	0,23	0,17	0,26	0,0003
L-Leucine	3,68	3,87	1,6	0,36	0,34	0,34	0,0004
Acetic acid	3,5	3,29	2,09	0,08	0,06	0,07	0,0004
3,6-Dioxa-2,7-disilaoctane, 2,2,4,7,7-pentamethyl-	4,35	3,26	3,24	0,37	0,19	0,47	0,0005
L-Proline	6,17	7,48	2,47	1,46	0,89	2,46	0,0005
Palmitic acid	2,86	2,83	0,23	1,5	1,68	1,17	0,0007
Phosphoric acid	5,12	5,18	1,03	10,03	8,19	5,46	0,0021
Butanoic acid	2,52	3,37	1,62	0,07	0,05	0,09	0,0091
Propanoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-	11,45	10,35	4,68	5,96	3,77	6,15	0,0101
D-Galactose	2,67	3,25	2,48	0,12	0,04	0,16	0,0481

Nesta tabela, é possível observar que somente o metabólito *Ethanolamine* se apresenta diminuído nos indivíduos com SD, os outros metabólitos se apresentam com valor aumentado ou não tiveram significância estatística.

A seguir a Tabela 6.9 e o Gráfico 6.8 mostram os resultados do teste de Kruskal-Wallis para avaliação da quantificação relativa dos metabólitos presentes em todos os grupos.

Tabela 6.9 Média e variação dos metabólitos em comum em todos os grupos seguido do p-valor do teste de Kruskal-Wallis

Metabólito	Grupo								p-valor
	SD-DP		SD+DP		C-DP		C+DP		
	Média	V	Média	V	Média	V	Média	V	
Phosphoric acid	5,12	↓	5,44	↓	10,03	↓	13,44	↑	<.0001
Glycine	7,59	↑	6,91	↑	0,81	↓	1,23	↓	<.0001
(R,S)-5-Ethyl-6-methyl-3E-hepten-2-one	3,58	↑	3,33	↑	0,14	↓	0,13	↓	<.0001
Palmitic acid	2,86	↑	2,83	↑	1,5	↓	1,61	↓	<.0001
Ethanolamine	6,68	↑	7,12	↑	0,57	↓	0,97	↓	<.0001
Silanamine, 1,1,1-trimethyl-N	4,43	↑	4,37	↑	0,3	↓	0,25	↓	<.0001
l-Alanine	8,6	↑	8,45	↑	0,36	↓	1,11	↓	<.0001
1-Nonadecene	4,44	↑	4,71	↑	0,14	↓	0,09	↓	<.0001
Glycerol	8,38	↑	8,07	↑	0,75	↓	0,17	↓	<.0001
Tetradecanoic acid	3,64	↑	3,34	↑	0,17	↓	0,17	↓	<.0001
3,6-Dioxa-2,7-disilaoctane	4,35	↑	4,13	↑	0,37	↓	0,22	↓	<.0001
L-Leucine	3,68	↑	3,37	↑	0,36	↓	0,38	↓	<.0001
L-Serine	3,89	↑	3,69	↑	0,1	↓	0,11	↓	<.0001
Acetic acid	3,5	↑	2,88	↑	0,08	↓	0,11	↓	<.0001
Tetrasiloxane, decamethyl-	4,69	↑	5,22	↑	0,2	↓	0,3	↓	<.0001
Tyrosine	3,27	↑	3,28	↑	0,17	↓	0,15	↓	<.0001
L-Proline	6,17	↑	5,68	↑	1,46	↓	1,09	↓	<.0001
1,2-Propylene glycol	4,42	↑	5,76	↑	0,37	↓	0,28	↓	<.0001
1-(4-Isopropylphenyl)-3-(2-furyl)propane	3,72	↑	2,96	↑	0,42	↓	0,32	↓	<.0001
Dihydrocoumarin, 4,4,5,7,8-pentamethyl	2,53	↑	2,52	↑	0,23	↓	0,33	↓	0,0001
Pentanoic acid	3,11	↑	3,1	↑	0,23	↓	0,35	↓	0,0003
Propanoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-	11,45	↑	11,37	↑	5,96	↓	5,25	↓	0,0006
3-Methyl-1,3-bis(trimethylsilyloxy)butane	2,93	↑	3,08	↑	0,1	↓	0,1	↓	0,0180

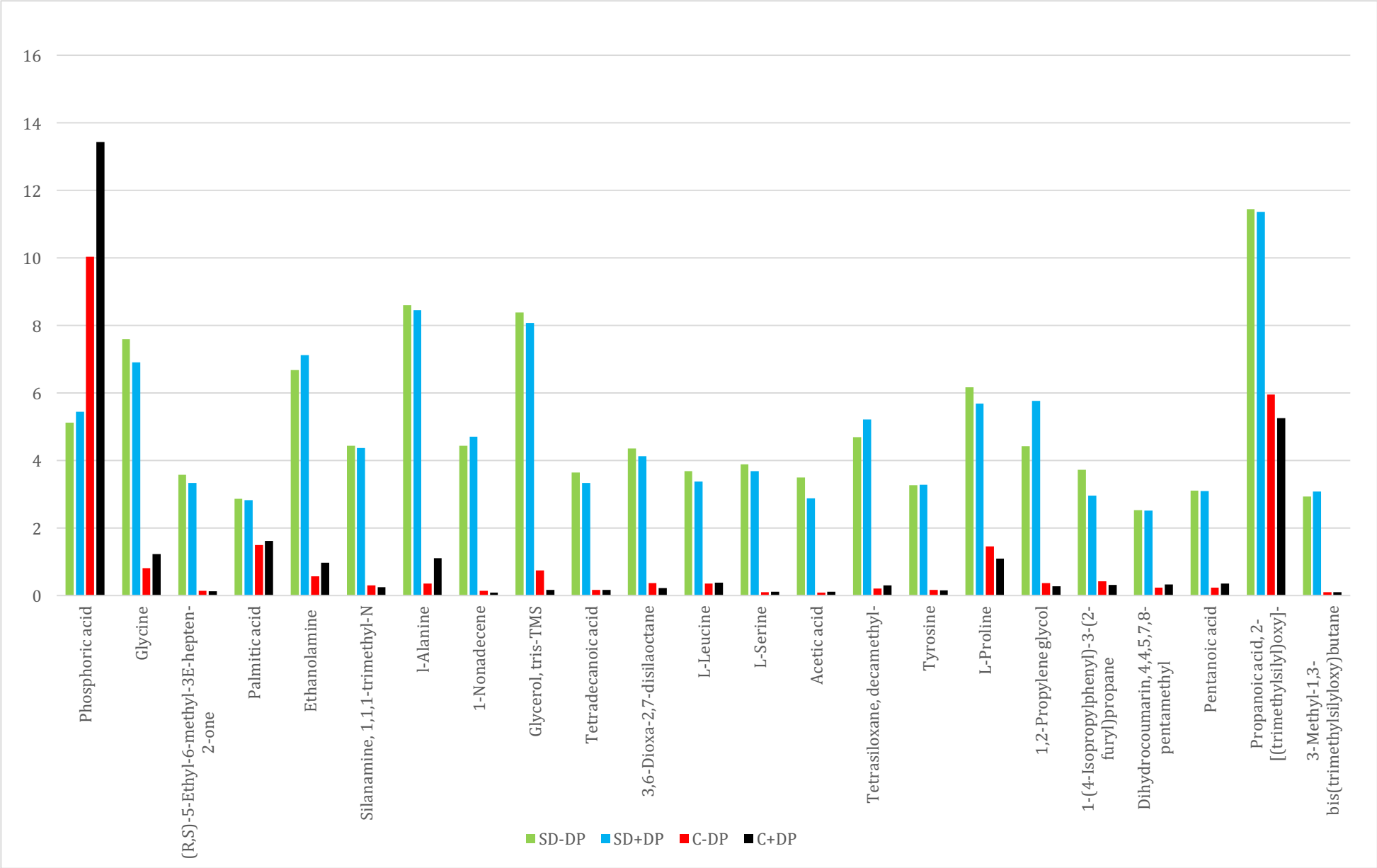


Gráfico 6.8 Quantificação relativa dos metabólitos entre os grupos de estudo

É possível observar que os metabólitos que apresentaram aumento significativo nos grupos SD-DP e SD+DP foram *Glicyne; (R,S)-5-Ethyl-6-methyl-3E-hepten-2-one; Palmitic acid; Ethanolamine; Silanamine; l-Alanine; 1-Nonadecene; Glycerol; Tetradecanoic acid; 3,6-Dioxa-2,7-disilaoctane; L-Leucine; L-Serine; Acetic acid; Tetrasiloxane, decamethyl-; Tyrosine; L-Proline; 1,2-Propylene glycol; 1-(4-Isopropylphenyl)-3-(2-furyl)propane; Dihydrocoumarin, 4,4,5,7,8-pentamethyl; Pentanoic acid, 5-[bis(trimethylsilyl)amino]-; Propanoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-; 3-Methyl-1,3-bis(trimethylsilyloxy)butane.*

Enquanto apenas o metabólito *Phosphoric acid* estava diminuído neste grupo, com diferença estaticamente significante. O grupo SD+DP ainda apresentou valores elevados de *Ethanolamine, Tetrasiloxane, decamethyl- e 1,2-Propylene glycol* em relação aos demais grupos. No grupo C+DP os metabólitos *Glicyne, Ethanolamine e l-Alanine* se apresentaram aumentados em relação ao grupo C-DP.

6.3. Identificação Bacteriana Através do MALDI-Biotyper

A tabela 6.10 apresenta os resultados para identificação da microbiota na saliva analisada pela técnica MALDI-Biotyper. Verificou-se 23 espécies de microrganismos possíveis de identificação de acordo com a banco de dados analisados.

Tabela 6.10 Frequência de microrganismos isolados e identificados pelo método MALDI-Biotyper das amostras de salivas dos grupos estudados

Microrganismos Identificados	Síndrome de Down		Controle		p-valor[1]
	Sem DP n(%)	Com DP n(%)	Sem DP n(%)	Com DP n(%)	
A. actinomycetemcomitans	-	2 (3,3)	-	1 (1,6)	-
Corynebacterium argentoratense	-	-	-	1 (1,6)	-
Corynebacterium durum	1 (1,6)	-	1 (1,6)	-	-
Neisseria flavescens	-	2 (3,3)	-	-	-
Neisseria mucosa	-	-	1 (1,6)	1 (1,6)	-
Neisseria sicca	-	-	1 (1,6)	-	-
Neisseria subflava	-	-	2 (3,3)	1 (1,6)	-
Nocardia yamanashiensis	-	-	1 (1,6)	-	-
Prevotella intermedia	-	1 (1,6)	-	1 (1,6)	-
Pseudomonas muciddens	-	-	1 (1,6)	-	-
Ralstonia pickettii	-	-	-	1 (1,6)	-
Rothia aeria	2 (3,3)	1 (1,6)	1 (1,6)	1 (1,6)	0,8833
Rothia dentocariosa	4 (6,6)	4 (6,6)	-	-	0,0264*
Staphylococcus aureus	8 (13,3)	6 (10)	6 (10)	10 (16,6)	0,4020
Staphylococcus epidermidis	1 (1,6)	7 (11,6)	-	-	0,0002*
Staphylococcus lugdunensis	-	1 (1,6)	-	-	-
Staphylococcus pasteuri	2 (3,3)	-	-	-	-
Staphylococcus succinus	-	-	1 (1,6)	-	-
Streptococcus oralis	1 (1,6)	1 (1,6)	-	-	-
Streptococcus salivarius	-	-	4 (6,6)	3 (5)	0,0412*
Streptococcus sanguinis	1 (1,6)	-	-	1 (1,6)	-
Tannerella forsythia	1 (1,6)	5 (8,3)	-	-	0,0056*
Treponema denticola	-	1 (1,6)	-	-	-

* estatisticamente significante; [1]Teste do Qui-quadrado.

Foram encontrados diferenças estatísticas entre os grupos SD com e sem DP para *Rothia dentocariosa* (p = 0,0264), entre os grupos SD com DP em relação aos demais grupos para *Staphylococcus epidermidis* (p = 0,0002) e *Tannerella forsythia* (p=0,0056). Enquanto, somente a espécie *Streptococcus salivarius* foi mais prevalente para o grupo Controle com e sem doença (p=0,0412). Os outros diversos microrganismos identificados nas amostras não apresentaram diferença estatisticamente significante.

As análises microbiológicas também foram conduzidas para o fluído crevicular gengival, que após a cultura e identificação através da mesma técnica podem ser observadas na Tabela 6.11.

Tabela 6.11 Frequência de microrganismos isolados e identificados pelo método MALDI-Biotyper das amostras de fluído crevicular gengival dos grupos estudados

Microrganismos Identificados	**Síndrome de Down**		**Controle**		**p-valor**[1]
	Sem DP n(%)	**Com DP** n(%)	**Sem DP** n(%)	**Com DP** n(%)	
A. actinomycetemcomitans	-	4 (6,6)	-	1 (1,6%)	0.0246*
Acinetobacter junii	-	1 (1,6)	-	-	-
Aspergillus terréus	1 (1,6)	-	-	-	-
Bacillus amyloliquefaciens	1 (1,6)	-	-	-	-
Bacillus cereus	1 (1,6)	2 (3,3)	-	-	-
Bacillus pumilus	1 (1,6)	-	-	-	-
Candida dubliniensis	-	1 (1,6)	-	-	-
Enterobacter asburiae	2 (3,3)	1 (1,6)	-	-	-
Enterobacter kobei	1 (1,6)	-	-	-	-
Micrococcus luteus	1 (1,6)	4 (6,6)	-	-	0,0245*
Neisseria flavescens	-	3 (5)	1 (1,6)	1 (1,6)	0,2462
Neisseria mucosa	-	1 (1,6)	-	-	-
Neisseria perflava	1 (1,6)	-	-	-	-
Neisseria subflava	-	-	1 (1,6)	2 (3,3)	-
Nocardia yamanashiensis	-	-	1 (1,6)	-	-
Porphyromonas gingivalis	-	1 (1,6)	-	1 (1,6)	-
Prevotella denticola	-	-	-	2 (3,3)	-
Pseudomonas aeruginosa	1 (1,6)	2 (3,3)	-	-	-
Pseudomonas muciddens	-	-	1 (1,6)	-	-
Pseudomonas pertucinogena	-	-	1 (1,6)	1 (1,6)	-
Pseudomonas stutzeri	-	1 (1,6)	-	-	-
Rhizopus oryzae	1 (1,6)	-	-	-	-
Rothia aeria	5 (8,33)	1 (1,6)	-	-	0,0056*
Rothia dentocariosa	1 (1,6)	2 (3,3)	1 (1,6)	-	0,5433
Rothia mucilaginosa	1 (1,6)	-	-	-	-

Staphylococcus aureus	8 (13,3)	7 (11,6)	11 (18,3)	8 (13,3)	0,4856
Staphylococcus capitis	-	1 (1,6)	1 (1,6)	-	-
Staphylococcus epidermidis	-	2 (3,3)	1 (1,6)	-	-
Staphylococcus pasteuri	-	-	-	1 (1,6)	-
Staphylococcus sanguinis	1 (1,6)	1 (1,6)	-	-	-
Staphylococcus succinus	-	-	1 (1,6)	-	-
Streptococcus hominis	-	1 (1,6)	-	-	-
Streptococcus oralis	1 (1,6)	1 (1,6)	-	-	-
Streptococcus salivarius	-	-	2 (3,3)	4 (6,6)	0,0430*
Streptococcus sanguinis	1 (1,6)	-	1 (1,6)	1 (1,6)	-
Tannerella forsythia	-	-	-	2 (3,3)	-
Treponema denticola	-	5 (8,33)	-	1 (1,6)	0,0056*

* estatisticamente significante; [1]Teste do Qui-quadrado.

Foram encontrados e identificados ao todo 37 microrganismos nas amostras de fluido crevicular gengival através do MALDI-Biotyper. Dentre essas, *Staphylococcus aureus* foi o microganismo mais prevalente em todos os grupos, presente em aproximadamente 25% dos indivíduos com SD e 31,6% nos indivíduos controle (p=0,4856). O Grupo com SD sem DP apresentou uma maior prevalência de *Rothia aeria* (p = 0,0056), enquanto o grupo SD com DP apresentou uma maior prevalência de *Micrococcus luteus* (p = 0,0245), *Treponema denticola* (p = 0,0056) e *A. Actinomycetemcomitans* (p= 0.0246). Os grupos controles, com e sem DP, apresentaram uma maior prevalência de *Streptococcus salivarius* (p= 0,0430). Outros diversos microrganismos foram encontrados nas amostras de fluido crevicular gengival, porém, não apresentaram significância estatística. Um deles é importante ressaltar pois apresenta repercussões importantes no corpo humano, o *A. Junii,* que foi presente em um indivíduo (1,6%) do grupo SD com DP. Este patógeno oportunista geralmente acomete pacientes que tiveram tratamento prévio de antimicrobianos, procedimentos invasivos, ou malignidade.

Dos 37 microrganismos identificados em ambos os grupos, 28 (75,6%) foram identificados nos grupos de indivíduos com SD, sendo que 19 (51,3%) estavam presentes exclusivamente nestes grupos e destes 5 (13%) espécies nos indivíduos com SD e DP. Os indivíduos do grupo controle sem DP, apresentaram 12 (37%) espécies de microrganismos identificados nas amostras de fluído crevicular gengival.

7. DISCUSSÃO

Diversos estudos têm fornecido uma contribuição significativa para a compreensão detalhada da rede e via bioquímica da DP, apontando para uma bateria de supostos biomarcadores de diagnóstico e dentre eles: enzimas do hospedeiro ou de origem bacteriana (Perinetti et al., 2008), peptídeos (Pisano et al., 2005), mediadores inflamatórios (Pradeep et al., 2009), produtos de degradação de colágeno (Aimetti et al., 2015), e DNA do hospedeiro (Thaweboon et al., 2010) ou de origem bacteriano (Nabors et al., 2010).

A presente pesquisa considerou analisar amostras de saliva, devido a capacidade de prover metabólitos detectados por espectrometria de massas, sejam eles a partir de alimentos, produtos de cuidados de saúde oral e medicamentos (Lynch et al, 1999).

Diversos metabólitos salivares já foram identificados com sucesso (Grootveld; Silwood, 2005; Walsh et al., 2006; Barnes et al., 2009, 2011; Marchesan et al., 2015; Aimetti et al., 2015), porém a intervariabilidade individual foi apontada por alguns estudos (Silwood et al., 1999; Walsh et al., 2006). Embora apresentem intervariabilidade individual, no entanto, a variabilidade intra-individual é menor observada para a saliva (Freitas-Fernandes et al., 2013), o que instigou a realização deste estudo.

Apresentamos o resultado de metabólitos presentes em saliva de indivíduos com e sem SD associados a doença periodontal. A identificação de metabólitos salivares e a quantificação dos mesmos são dados importantes, pois podem servir como biomarcadores da suscetibilidade dos pacientes a uma condição genética ou mesmo uma doença, neste caso, doença periodontal (Barnes et al., 2009).

Este é o primeiro estudo até o presente momento que revela os resultados sobre metaboloma de indivíduos com SD, o que enfatiza a importância desta pesquisa.

Enquanto para DP, os estudos ainda são iniciais e as evidências escassas, demonstrando a carência científica sobre esta área na odontologia

(Gronert et al., 2004; Barnes et al., 2009, 2011; Marchesan et al., 2015; Aimetti et al., 2015).

Neste estudo, foi possível traçar com sucesso o perfil bioquímico diferencial para avaliar o metabolismo global da doença periodontal através da saliva em uma população com e sem SD. Alterações metabólicas foram encontradas e podem ser associadas tanto a SD, como à DP.

Um avaliação metabolômica salivar não específica, identificou um total de 1292 metabólitos presentes nos indivíduos estudados. Destes 81 se apresentaram exclusivamente nos indivíduos com SD sem DP, enquanto, indivíduos controle sem DP apresentaram quatro vezes mais metabólitos exclusivos. Isso talvez possa ser atribuído, a uma maior variabilidade de rotina e perfis metabólicos que estes grupos apresentam (Wishart et al., 2007). Este padrão se repetiu na presença de DP, uma vez que indivíduos com SD apresentaram cerca de 71 metabólitos exclusivos e indivíduos sem a síndrome quase três vezes mais (199). Estes metabólito exclusivos são relativos, uma vez que podem ser isômeros, e nenhum deles apresentou uma frequência significante, estes podem ser consultados no Anexo F. Em comum, todo os grupos apresentaram cerca de 155 metabólitos.

Os resultados de Barnes et al. (2009) encontraram 250 metabólitos, porém em amostra de FCG através de cromatografia líquida e gasosa associada a espectrometria de massa. Sendo que, aproximadamente 50% dos metabólitos apresentavam níveis alterados em sujeitos com doença periodontal, o que será discutido adiante. Continuando os estudos, Barnes et al. (2011), ao analisar perfis metabolômicos não específico de saliva de indivíduos com DP, encontraram 390 metabólitos no grupo estudado.

As diferenças da quantidade de metabólitos, em relação ao nosso estudo provavelmente, seja decorrente da metodologia da pesquisa, uma vez que neste estudo a preparação foi feita com amostra derivatizada e análise em GC/MS. A derivatização é uma técnica utilizada em química para transformar uma substância em outra de estrutura semelhante (um isômero), por meio de reação química, essas novas propriedades resultantes podem facilitar processos de quantificação, separação entre outros (Prestes et al., 2007).

Wishart et al. (2015) ao relatar os dados do banco de metaboloma salivar, encontrou 1233 metabólitos com possível identificação em amostras de

saliva. Nosso estudo embora tenha encontrado 1292 metabólitos no total, apresenta compostos isômeros, o que aumenta a quantidade de metabólitos devido a alteração de estrutura química de um mesmo metabólito.

Ao avaliar o perfil completo de metabólitos salivares de baixo peso molecular em indivíduos com e sem SD, foram observadas diferenças significantes. Nitidamente se observou a formação de agrupamentos e separações entre grupos quando os dados foram submetidos à análise por meio do método multivariado dos modelos de PCA.

No primeiro modelo de PCA, esse fato demonstra que um número grande de metabólitos é responsável pelas alterações em indivíduos com SD, isto se confirma com visualização da separação dos indivíduos controle, e também é possível notar que indivíduos com SD sem DP também se agrupam separadamente, compartilhando pouco os seus metabólitos. Observamos que os grupos de indivíduos controles são representados agrupados próximo ao eixo Dim2 do gráfico, não demonstrando grande diferença entre eles.

Porém, como citado acima a variabilidade inter-individuo é muito grande, dadas as particularidades de nosso organismo. Por isso, foi aplicado um filtro para que somente os metabólitos principais, ou seja, que participam das reações metabólicas em pelo menos 70% do grupo estudado, fossem avaliados.

Através do segundo modelo de PCA, construído com filtro de 70%, manteve-se a separação de índividuos com SD dos índividuos controles, independente da DP. Enquanto os índividuos controles com e sem doença periodontal se apresentaram de maneira mais dispersa, com leve tendência de separação.

Em relação a doença periodontal, os dados encontrados corroboram com os achados prévios de Barnes et al. 2009, onde o PCA demonstra uma discreta separação entre indivíduos com e sem DP em indivíduos normorreativos. Essa separação é evidente também quando se avalia a DP em indivíduos com e sem SD, mostrando que a relação dos metabólitos da SD é maior para mânte-los separados, do que os metabólitos da doença periodontal para agrupá-los. Entretanto, os grupos de indivíduos com SD se

apresentaram agrupados, revelando uma tendência de perda de componentes relacionados a DP nesta análise.

Decorrente desta perda, novas análises de PCA entre grupos foram realizadas para confirmar os achados acima e facilitar a interpretação dos dados, para isso os grupos foram avaliados separadamente.

Os achados no Gráfico 6.3, sugerem que a sobreposição de componentes nos indivíduos com SD com e sem DP, confirma um perfil metabolômico independente da doença periodontal, mesmo sofrendo leve separação em algumas delas. Porém é de grande importância relatar que a correlação entre os metabólitos nestes dois grupos é bastante grande e ocorrem pelo menos em três clusters principais.

Quando analisamos indivíduos com SD com DP e controles com DP, no Gráfico 6.4, revelam uma grande separação entre os metabólitos e agrupamentos diferentes entre os grupos. Isso demonstra que os metabólitos em indivíduos com SD e doença periodontal são menos correlacionados com os metabólitos de indivíduos controle com DP. O que adiante será explicado pela diferença de concentração entre os metabólitos de cada grupo.

Uma vez que os metabólitos candidatos à biomarcadores da condição SD não foram previamente determinado, se optou por avaliá-los isoladamente dos demais componentes, através da quantificação relativa da percentagem de área, que foi realizada todos os grupos.

Embora os mesmos metabólitos possam ser encontrados em todos os grupos, a quantificação relativa demonstrou que indivíduos com SD apresentam muitos metabólitos com maior concentração em relação a indivíduos controles, independente da DP. O aumento de concentração também ocorreu em diversos metabólitos quando comparamos os resultados para grupo controle com e sem DP.

Para discutir estes dados realizamos um agrupamento para facilitar de forma didática a compressão da função destes metabólitos, sendo eles divididos em: aminoácidos (*Glycine, l-Alanine, L-Serine, Tyrosine, L-Proline, L-Leucine, L-phenylalanine*), monossacarídeos (*D-Mannopyranose*), ácidos graxos (*Palmitic Acid, Pentanoic acid, Tetradecanoic acid*), álcoois (*Glycerol),* hidrocarbonetos *(1-Nonadecene, Tetrasiloxane, decamethyl-)* e outros

(*Silanamine, Disiloxane*). Dentre estes, discutiremos os mais relevantes para a doença periodontal.

Quando realizamos a quantificação relativa dos metabólitos dos grupos com SD (Tabela 6.6), apenas dois deles são significativos. *L-phenylalanine* apresentou-se em maior concentração nos índividuos com SD sem a doença periodontal (p = 0,0343). *L-phenylalanine* ou fenilalanina é um aminoácido essencial e o precursor para o aminoácido tirosina, sendo precursor das catecolaminas no corpo (tiramina, dopamina, epinefrina e norepinefrina (Ormstad et al., 2015). A fenilalanina endógena é altamente concentrada no cérebro e no plasma humano (Psychogios et al. 2011; Wishart et al., 2008), sendo um achado interessante nas amostras de saliva. Ou ainda resíduos de trocas bacterianas de cepas gram-negativas, geralmente *Pseudomonas aeruginosa* (Modi et al., 2015). Esta espécie foi encontrada em apenas 1 (1,6%) índividuo deste grupo, e embora outras cepas possam liberar outros substratos, somente avaliando a via metabólica das bactérias encontradas poderíamos afirmar este fato.

Drogas psicotrópicas (morfina, codeína e papaverina) também contém fenilalanina como um constituinte e metabólitos como subprodutos (Huo *et al*., 2015). O que provavelmente justifique a presença elevada no grupo de indivíduos com SD, que são sabidamente mais assistidos por medicações diversas. Ressaltamos que a fenilalanina já considerada como um biomarcador de condições neurológicas, incluindo o AVC isquêmico agudo, podendo ser um importante metabólito para ser estudado mais aprofundado na SD (Ormstad et al., 2015).

Metabólitos exógenos também foram identificados tanto em amostras de saliva de SD como controle. Apesar dos voluntários terem sido instruídos a abster-se de atividades orais, foi identificado o composto *Disiloxane,* significativamente maior nos indivíduos com SD e doença periodontal (p = 0,0380). *Disiloxane* ou Disiloxano faz parte dos organosilicones, compostos orgânico que contêm ligações carbono-silício . Na área de saúde, não é um metabólito pertencente ao *The Human Metabolome Database* e não se encontram artigos relatando alguma relação no metabolismo humano. Embora o mesmo seja utilizado como aditivo em produtos cosméticos, incluindo o dentifrício (Leatherman et al., 2013). Provavelmente, este

composto foi encontrado em maior proporção em indivíduos SD com DP devido à maior adsorção desse composto às irregularidades da superfície dental e periodontal. Ademais, não se observou diferença deste composto entre os grupos controles,

Quando comparamos o grupo controle com DP em relação ao controle sem a DP, é possível notar aumento de glicina, l-alanina, l-serina, manopiranose e phosporic acid. A mesma quantificação relativa foi realizada comparando os grupos SD x controle com DP e SD x controle sem DP.

No presente estudo verificou-se a quantificação relativa de *l-Alanine* significativamente aumentada em indivíduos com SD com e sem DP e também em indivíduos controle com DP (p <.0001, Tabela 6.8], em comparação com os controles sem DP, demonstrando, assim, que a atividade salivar do metabólito *l-Alanine* reflete a inflamação e destruição do tecido periodontal, sugerindo um possível biomarcadores clinicamente útil. Estes resultados são consistentes com os estudo de Yoshie et al. (2007) e Todorovic et al. (2006).

Segundo Todorovic et al. (2006), o aumento de L-Alanine é um indicador de níveis mais elevados de danos celulares e a sua atividade aumentada em fluido crevicular gengival é uma consequência do seu aumento de libertação a partir das células danificadas dos tecidos moles do periodonto, e é um reflexo das alterações metabólicas na inflamação gengival.

A L-proline ou l-prolina é um aminoácido não essencial que faz parte do colágeno que é um componente importante da dentina (Fidalgo, 2010; Todorovic et al., 2006). No presente estudo, similar a l-alanina, individuos com DP apresentaram níveis mais elevados de prolina do que indivíduos controle, provavelmente porque na presença de doença periodontal há o rearranjo de colágeno, devido a reabsorção, levando à presença de níveis elevados de prolina na cavidade oral. Fidalgo (2010) ao avaliar o metaboloma de crianças saudáveis em diferentes faixas etárias, encontrou maiores níveis de prolina em crianças com dentiçãoo mista, atribuindo este fator a reação dos dentes decíduos e a degradaçnao de colágeno que há neste processo.

A glicina foi encontrada em ambos os grupos, porém, a quantificação foi maior nos grupos com SD. O grupo controle com DP apresentou também

níveis maiores quando comparado com o controle sem DP. Nosso estudo vai de encontrou com o de Takeda et al. (2009), que ao avaliar o metaboloma salivar humano, também encontrou a glicina como parte do metaboloma salivar de homens e mulheres em diferentes idades, porém, associou o seu aumento às diferenças hormonais ou até mesmo a flora bacteriana bucal.

Este aminoácido quando acumulado em líquidos biológicos, principalmente sangue, urina e líquido cefalorraquidiano, caracteriza a doença hiperglicinemia não cetótica (HNC), uma doença genética. A glicina aumenta significativamente os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e induz dano oxidativo lipídico e aumento nas atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) (Schwartz et al., 2008; Huang et al., 2014).

É sabido que indivíduos com SD apresentam aumento das enzimas SOD (Komatsu et al., 2013), o que pode sugerir que o aumento de glicina seja por este motivo. Entretanto, Rausch-Fan et al. (2005) revelou que a glicina estimula a produção de prostaglandina E2 e ciclooxigenases-2 que estimulam a interleucina-1β nos fibroblastos gengivais humanos, sugerindo o seu envolvimento na patogénese da periodontite.

Desta forma, acreditamos que a glicina é um possível marcador da doença periodontal para indivíduos controle, e que nos indivíduos com SD apresentam altos níveis de glicina independente da DP.

Serina é um aminoácido não essencial derivado de glicina, todavia, pode tornar-se essencial em determinadas condições, e é portanto importante na manutenção da saúde e prevenção de doenças. Serina é altamente concentrada em todas as membranas celulares e pode ser derivada a partir de quatro possíveis fontes: ingestão alimentar; biossíntese do intermediário glicolítico 3-fosfoglicerato; de glicina; e por degradação da proteína e fosfolipido. Existem poucos dados disponíveis sobre as contribuições relativas de cada uma dessas fontes em relação a homeostase (de Koning et al., 2003). A serina possui um papel importante em uma variedade de redes metabólicas, incluído as que envolvem as purinas (Sugimoto et al., 2010). Barnes et al. (2009) relataram que os metabólitos provenientes da via de degradação da purina, fonte de produção de espécies

reativas de oxigênio, estava, significativamente aumentados nos sítios periodontais, indicando que essa via pode ser a principal fonte de estresse oxidativo que ocorre na inflamação periodontal.

Em nosso estudo a serina foi encontrada em concentrações aumentadas no grupo controle com DP em relação ao grupo controle sem DP. E em relação aos grupos SD em relação aos controles.

Níveis aumentados de *Tyrosine* ou tirosina também foram encontrados com grande aumento nos grupos com SD, independente da DP. Este aminoácido essencial é precursor para os neurotransmissores dopamina, norepinefrina e epinefrina, assim como a fenilalanina. Normalmente, a tirosina não é encontrada em concentrações elevadas em todo o corpo, provavelmente porque é rapidamente metabolizada, tendo como cofator destas reações o ácido fólico, cobre e vitamina C (Tamijani et al. 2015). Por ser um precursor de hormônios da tireoide, é também sintetizada e veiculada como medicamento para doenças da tireoide.

O hipotireoidismo é uma das patologias mais comuns em pessoas com SD, com uma prevalência entre 30 e 40%. O tratamento preferencial nos casos de hipotireoidismo associados à SD é a terapia substitutiva com levotiroxina sódica por via oral (Abanto et al., 2011).

Embora estudos de metaboloma salivar apontam que a tirosina quando aumentada está associada câncer oral (Sugimoto et al., 2010), este metabólito encontrado na saliva pode ser de origem endógena e subprodutos de medicações, uma vez que 50% dos indivíduos com SD relataram o uso de medicamentos para tireoide neste estudo.

Ácido palmítico, ácido pentanóico e ácido tetradecanóico são ácidos graxos saturados comuns, que podem ser de origem alimentar ou endógenos, e apontados como precursores de moléculas de inflamação, tais como eicosanóides. Assim como o ácido acético, outro ácido graxo, porém, de cadeia curta e fraco. Este metabólito já foi apontado como subproduto da fermentação de bactérias degradantes de colágenos e aminoácidos (Niederman et al., 1997).

Nosso estudo encontrou um aumento de ácidos graxos na população com SD com e sem DP em relação aos controles com e sem DP. Enquanto,

indivíduos controle com DP não apresentaram aumento significativo em relação os controles sem a doença.

Estes resultados discordam de Barnes et al. (2011) e Aimetti et al. (2012), que encontram níveis de ácidos graxos em indivíduos com DP.

Como a DP se manifesta na SD de modo mais grave e agressivo, a identificação de ácidos graxos na saliva, pode mostrar ainda em estágios iniciais a alteração em relação aos indivíduos controles.

Em relação ao aumento da concentração do Glycerol ou glicerol, o mesmo também ocorreu nos indivíduos com SD em relação aos indivíduos controle e também quando avaliado indivíduos com SD e DP em relação aos indivíduos controle com DP. O glicerol é um componente importante de triglicéridos (ou seja, gorduras e óleos) e de fosfolípidos. O glicerol após a degradação de triglicerídeos pode ser oxidado pela glicólise e, dependendo das condições fisiológicas, é convertido em glicerol-3-fosfato.

Barnes et al. (2011) revelaram que na presença de DP, os níveis metábolomicos de glicerol-3-fosfatos se encontram aumentados, demonstrando uma a degradação macromolecular que pode ser identificada na saliva. Nosso estudo não encontrou níveis aumentados de glicerol nos indivíduos controle com doença periodontal, pelo contrário, foi o grupo com menor concentração deste metabólito. Este achado concorda com os achados de Gronert et al. (2004) e Fidalgo (2010), que encontraram valores mais baixo deste metabólito em indivíduos com DP.

Uma hipótese para os níveis aumentados nos indivíduos com SD, pode ser o aumento da atividade de lípase, que é codificada pelo gene LIPI mapeado no cromossomo 21 (Wen et al., 2003). Ou seja, devido a trissomia, o material genético contido neste cromossomo é aumentado e pode repercutir no metabolismo celular periférico. Nestes contexto, Muchová et al. 2014 relatou que devido o estresse oxidativo que ocorre na SD, radicais livres e metabólitos reativos podem tornar-se tóxicos durante a formação descontrolada causando danos aos lípidos.

O *Phosphoric acid* ou ácido fosfórico foi encontrado diminuído nos grupos com SD em relação ao grupos controles, entretanto, controles com DP apresentaram níveis ainda mais aumentados. Embora seja um composto químico utilizado na industria alimentar, quando encontrado de forma

endógena, aponta para um subproduto do metabolismo bacteriano. Sua participação está inserida na via glicolítica, para produção de energia. Estudos também apotam a presença de ácido fosfórico no cálculo supragengival, devido ao seu depósito juntamento com cálcio, que se acumula no biofilme e tem como manifestação a inflamação gengival (Gronert et al., 2004; Barnes et al., 2009).

A presença de determinadas moléculas em determinado nível de concentração depende, em muitos casos, de sua produção e de seu transporte até a cavidade oral. Contudo, tanto o transporte quanto a produção podem ser comprometidos com alterações no metabolismo, tornando o monitoramento desses metabólitos potenciais biomarcadores para indicar não apenas desordens bucais, mas também sistêmicas (Fidalgo, 2010).

As diferenças apontadas entre indivíduos com SD e controles, demonstram que um diferente perfil metabolômico salivar entre eles. Diversos metabólitos aumentados nos controles com DP, se apresentaram aumentados nos indivíduos com SD, independente da manifestação da DP. O que pode justificar o curso desta doença nestes indivíduos, com instalação precoce e alta severidade. Isso pode ser devido ao aumento do stress oxidativo, que resulta na disrupção da estrutura de biomoléculas importantes, tais como proteínas, lípidos e ácidos nucleicos (Huang et al., 2014; de Souza et al., 2015). Este fato, é de grande importância uma vez que estas alterações podem levar a disfunções dos órgãos e a patofisiologia de todo o organismo nestes indivíduos.

Em particular, salientamos que os indivíduos com SD apresentaram maior concentração relativa de aminoácidos e ácidos graxos na saliva.

Como limitações deste estudo podemos referir o fato de estes indivíduos terem um baixo fluxo salivar e a coleta de salivar não puder ser estimulada, sendo de maior dificuldade para este grupo e levando maior tempo. Outra limitação refere-se ao fato de indivíduos não terem seguido o jejum proposto e as condições de higiene, ou mesmo, não terem relata o uso de medicamentos. Este fato pode ter alterado metabólitos salivares, uma vez que está técnica é muito sensível e detecta rapidamente mudanças no organismo.

Mais dados são necessários para complementar o entendimento dos metabólitos em indivíduos com SD, como o estudo de outros biofluidos e da microbiota.

Este estudo ainda observou que indivíduos SD com e sem doença periodontal apresentaram diversas espécies de microrganismos periodontopatógenos em ambos os fluídos bucais avaliados. Não houve relação de equivalência entre os resultados de saliva e fluido crevicular gengival, entretanto o objetivo do estudo não foi estabelecer essa correlação, uma vez que é sabido que diferentes espécies estão presentes neste fluídos e os mesmos se complementam (Barr-Agholme et al. 1998; Navazesh; Kunor, 2008; Nabors et al., 2010).

Indivíduos saudáveis de todos os subgrupos exibiram percentagens estatisticamente significantes mais elevadas de detecção de Streptococcus salivarius. Estes resultados estão de acordo com a saúde periodontal ou inflamação gengival menor observada principalmente neste grupo de indivíduos (tabela 6.10 e 6.11).

Sobretudo, indivíduos com SD e doença periodontal apresentaram maior prevalência de bactérias patogênicas em comparação aos indivíduos SD saudáveis, e ainda exibindo maior patologia periodontal que indivíduos controles sem DP, produzindo perfis microbiológicos salivares e subgengivais semelhantes aos encontrados em pacientes normoreativos com periodontite crônica (Amano et al., 2000). Foram identificadas na saliva 23 espécies bacterianas e 37 no fluido crevicular gengival através da técnica MALDI-Biotyper, incluindo os principais patógenos periodontais A. actinomycetemcomitans, P. gingivalis , T. forsythia, de acordo com estudos baseados em culturas anteriores (Reuland-Bosma et al., 2001).

Entre as poucas espécies de bactérias encontradas para expor diferenças significativas entre os grupos, indivíduos com SD apresentaram proporções mais elevadas de Rothia dentocariosa, Staphylococcus epidermidis, Tannerella forsythia presentes na saliva, enquanto no fluido crevicular foi possível identificar níveis aumentados de A. Actinomycetemcomitans, Micrococcus luteus, Rothia aeria, Treponema denticola em comparação com sujeitos do estudo não-SD.

A presença de Rothia Detocariosa em amostras de placa supragengival já foi relatada por diversos estudos (Barksdale., 1979; Lesher et al., 1977; Fujinaka et al., 2013). Também tem sido identificado Rothia em amostras de placa bacteriana subgengival de bolsas periodontais de pacientes com periodontite refratária (Fujinaka et al., 2013; Colombo et al., 2009). Além disso, tem sido demosntrado que Rothia, juntamente com Streptococcus e Neisseria são os organismos predominantes na formação de placa supragengival, contribuindo para o início da doença periodontal (Colombo et al., 2009; Kataoka et al., 2014). O estudo de Kataoka et al. (2014) demonstrou que Rothia dentocariosa é capaz de induzir no hospedeiro TNF-α por um mecanismo dependente de TLR2 (Toll-like receptor 2), comprovando sua participação no desenvolvimento da doença periodontal.

A bactéria gram-positiva Staphylococcus epidermidis é responsável pela causa mais comum de infecções associadas a cateteres e outros dispositivos médicos residentes, e embora faça parte da flora bucal, esta mais relacionada aos processos de periimplantite do que periodontite (Rams et al., 1990).

Bactérias periodontopatogênicas, como Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythia e Treponema denticola (juntas são chamadas de “red complex”), promovem uma reação inflamatória intensa. (Feng; Weinberg, 2000; Halfajee, Socransky, 2000). Os microrganismos do “red complex” já foram associados com periodontites em indivíduos com SD e foram encontrados mais frequentemente em crianças com SD em idade mais precoce do que o observado nos controles (Amano et al., 2000).

Nosso estudo avaliou adolescentes de 12 a 21 anos, por crer que é nesta faixa etária que muitos desenvolvem a doença periodontal com curso mais agressivo. Encontramos diferenças significativas em relação a microbiota utilizando a técnica do MALDI-Biotyper. Alguns estudos encontraram resultados similares aos nossos, em diferentes populações com SD (Cichon et al., 1998; Amano et al., 2000; Sakellari et al., 2005).

Cichon et al. (1998), ao avaliar o fluido crevicular gengival de crianças com SD de 2 a 4 anos, através da técnica de PCR, encontrou 9 de 10 espécies de periodontopatógenos de placa subgengival, com significativa

diferença em relação ao grupo controle (sem SD). Tannerella forsythensis, Bacteroides forsythus e Treponema denticola, são considerados importantes na periodontite do adulto e foram encontrados em crianças com SD desde os 2 anos de idade. Isto sugere que a destruição periodontal severa que ocorre nos indivíduos com SD é consonante com o padrão de periodontite agressiva. Da mesma forma, foi possível observar aumento dos níveis de A. actinomycetemcomitans em crianças com SD em estudo conduzido por Sreedevi e Munshi (1998).

Sakellari et al. (2005) encontraram diversos patógenos periodontais, em colonização precoce de adolescentes com SD, dentre eles *P. gingivalis, A. actinomycetemcomitans, T. forsythensis, C. rectus, P. intermedia, C. sputigena and A.naeslundii II*, em que os níveis se apresentavam mais elevados do que nos indivíduos sem a síndrome ou pessoas com paralisia cerebral.

Embora, alguns estudos relacionem a severidade da doença periodontal à fatores imunológicos ou inerentes da anomalia cromossômica, a identificação da microbiota se faz importante. Novas ferramentas que facilitem este processo e com melhor custo-benefício devem ser exploradas. Desta forma, foi possível realizar a análise bacteriana dos fluidos bucais em pacientes SD com e sem DP através da técnica de MALDI-Biotyper.

Posteriormente, daremos sequência nos estudos para avaliar a via metabólica das bactérias identificadas com significância relacionando ao perfil metabôlomico traçado nos indivíduos com e sem SD. Salientamos que este estudo fez parte de uma pesquisa maior, que analisou também o metaboloma da urina, porém, estes dados não serão apresentadas nesta pesquisa. Futuramente, poderam acrescentar novas informações para estabelecer uma via metabólica em indivíduos com SD e o impacto da doença periodontal.

8. CONCLUSÃO

- Diversos metabólitos associados à inflamação, estresse oxidativo, degradação tecidual e pertencentes ao metabolismo bacteriano foram encontrados sigficantemente aumentados nos indivíduos com DP. Os principais metabólitos envolvidos neste processo foram glicina, l-alanina, l-serina e manopiranose.

- Indivíduos com SD apresentaram perfil metabolômico distinto dos indivíduos controles, com significante aumento de metabólitos de aminoácidos e ácidos graxos.

- A doença periodontal nos indivíduos com SD não apresentou perfil metabolômico diferente daqueles saudáveis, e somente os níveis de fenilalanina se encontram diminuídos neste grupo. Isso sugere que a sucetibilidade a doença periodontal é maior nos indivíduos com SD, e mesmo em estágios iniciais pode ser identificadas através da análise em GC/MS.

- As alterações do perfil metabolômico salivar sugerem que análises metabolômicas possam ser uma abordagem válida para a identificação de condições genéticas e de doença periodontal. Além disso, juntamente com os achados microbiológicos, foi possível elucidar melhor o curso e severidade da doença nos individuos com SD.

- Estes resultados sugerem que diversos periodontopatógenos podem colonizar precocemente indivíduos SD em relação aos grupos controles, incluindo *Tannerella forsythia, A. Actinomycetemcomitans, Treponema denticola,* que desempenham um papel importante na inflamação periodontal, corroborando para os achados de metaboloma salivar. Além disso, a identificação de bactérias periodontopatogênicas pelo método MALDI *Biotyper* é altamente confiável em diferentes tipos de fluídos bucais.

REFERÊNCIAS[1]

Abanto J, Ciamponi AL, Francischini E, Murakami C, de Rezende NP, Gallottini M. Medical problems and oral care of patients with Down syndrome: a literature review. Spec Care Dentist. 2011 Nov; 31(6):197-203.

Aimetti M, Cacciatore S, Graziano A, Tenori L. Metabonomic analysis of saliva reveals generalized chronic periodontitis signature. Metabolomics. 2012;8(3):465-74.

Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. Int Dent J. 1975 Dec;25(4):229-35.

Al-Maweri SA, Tarakji B, Al-Sufyani GA, Al-Shamiri HM, Gazal G. Lip and oral lesions in children with Down syndrome. A controlled study. J Clin Exp Dent. 2015 Apr 1;7(2):e284-8.

Alves RD, Silveira EJD, Lins RDAU. Doença periodontal x Síndrome de Down. RBPO. Rev Bras Patol Oral. 2004;3(3):119-22.

Amano A, Kishima T, Akiyama S, Nakagawa I, Hamada S, Morisaki I. Relationship of periodontopathic bacteria with early-onset periodontitis in Down's syndrome. J Periodontol. 2001 Mar;72(3):368-73.

Amano A, Kishima T, Kimura S, Takiguchi M, Ooshima T, Hamada S, Morisaki I. Periodontopathic bacteria in children with Down syndrome. J Periodontol. 2000 Feb;71(2):249-55.

Amaral Loureiro AC, Oliveira Costa F, Eustáquio da Costa J. The impact of periodontal disease on the quality of life of individuals with Down syndrome. Downs Syndr Res Pract. 2007 Jul;12(1):50-4.

Amaral Loureiro AC, Oliveira Costa F, Eustáquio da Costa J. The impact of periodontal disease on the quality of life of individuals with Down syndrome. Downs Syndr Res Pract. 2007 Jul;12(1):50-4.

[1] De acordo com o Estivo Vancouver.

Antonaccio RA. Achados clínicos e citológicos de patologias bucais em línguas de pacientes com síndrome de Down. [dissertação] São Paulo: Universidade Paulista, Faculdade de Odontologia; 2009.

Areias CM, Sampaio-Maia B, Guimaraes H, Melo P, Andrade D. Caries in Portuguese children with Down syndrome. Clinics (Sao Paulo). 2011;66(7):1183-6.

Bagić I, Verzak Z, Cuković-Cavka S, Brkić H, Susić M. Periodontal conditions in individuals with Down's syndrome. Coll Antropol. 2003;27 Suppl 2:75-82.

Barksdale L. Identifying Rothia dentocariosa. Ann Intern Med. 1979 Nov;91(5):786-8.

Barnes VM, Ciancio SG, Shibly O, Xu T, Devizio W, Trivedi HM, Guo L, Jönsson TJ. Metabolomics reveals elevated macromolecular degradation in periodontal disease. J Dent Res. 2011 Nov;90(11):1293-7.

Barnes VM, Kennedy AD, Panagakos F, Devizio W, Trivedi HM, Jönsson T, Guo L, Cervi S, Scannapieco FA. Global metabolomic analysis of human saliva and plasma from healthy and diabetic subjects, with and without periodontal disease. PLoS One. 2014 Aug 18;9(8):e105181.

Barnes VM, Teles R, Trivedi HM, Devizio W, Xu T, Mitchell MW, Milburn MV, Guo L. Acceleration of purine degradation by periodontal diseases. J Dent Res. 2009 Sep;88(9):851-5.

Barr-Agholme M, Dahllöf G, Modéer T, Engström PE, Engström GN. Periodontal conditions and salivary immunoglobulins in individuals with Down syndrome. J Periodontol. 1998 Oct;69(10):1119-23.

Barreiro JR, Ferreira CR, Sanvido GB, Kostrzewa M, Maier T, Wegemann B, Böttcher V, Eberlin MN, dos Santos MV. Short communication: Identification of subclinical cow mastitis pathogens in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. J Dairy Sci. 2010 Dec;93(12):5661-7.

Benagli C, Rossi V, Dolina M, Tonolla M, Petrini O. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. PLoS One. 2011 Jan 25;6(1):e16424.

Bilgili SG, Akdeniz N, Karadag AS, Akbayram S, Calka O, Ozkol HU. Mucocutaneous disorders in children with down syndrome: case-controlled study. Genet Couns. 2011;22(4):385-92.

Bizzini A, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. Clin Microbiol Infect. 2010 Nov;16(11):1614-9.

Bravo-Valenzuela NJM, Passarelli MLB, Coates MV, Nascimento LFC. Recuperação pôndero-estatural em crianças com síndrome de Down e cardiopatia congenital. Rev Bras Cir Cardiovasc. 2011; 26(1), 61-8.

Buckley S, Sacks B. Oral health problems and quality of life. Downs Syndr Res Pract. 2007 Jul;12(1):17.

Cavalcante LB, Pires JR, Scarel-Caminaga RM. Doença periodontal em indivíduos com Síndrome de Down: enfoque genético. RGO. 2009;57(4):134-7.

Cavalcante LB, Tanaka MH, Pires JR, Apponi LH, Aparecida Giro EM, Valentini SR, Palomari Spolidório DM, Capela MV, Rossa C Jr, Scarel-Caminaga RM. Expression of the interleukin-10 signaling pathway genes in individuals with Down syndrome and periodontitis. J Periodontol. 2012 Jul;83(7):926-35.

Chaushu S, Yefenof E, Becker A, Shapira J, Chaushu G. A link between parotid salivary Ig level and recurrent respiratory infections in young Down's syndrome patients. Oral Microbiol Immunol 2002;17(3):172-6.

Cichon P, Crawford L, Grimm WD. Early-onset periodontitis associated with Down's syndrome--clinical interventional study. Ann Periodontol. 1998 Jul;3(1):370-80.

Colombo AP, Boches SK, Cotton SL, Goodson JM, Kent R, Haffajee AD, Socransky SS, Hasturk H, Van Dyke TE, Dewhirst F, Paster BJ. Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis,

severe periodontitis, and periodontal health using the human oral microbe identification microarray. J Periodontol. 2009 Sep;80(9):1421-32.

Daviss B. Growing pains for metabolomics. The Scientist. 2005; 19(8):25-8.

de Koning TJ, Snell K, Duran M, Berger R, Poll-The BT, Surtees R. L-serine in disease and development. Biochem J. 2003 May 1;371(Pt 3):653-61.

de Sousa MC, Vieira RB, Dos Santos DS, Carvalho CA, Camargo SE, Mancini MN, de Oliveira LD. Antioxidants and biomarkers of oxidative damage in the saliva of patients with Down's syndrome. Arch Oral Biol. 2015 Apr;60(4):600-5.

Demmer RT, Desvarieux M. Periodontal infections and cardiovascular disease: the heart of the matter. J Am Dent Assoc. 2006 Oct;137 Suppl:14S-20S; quiz 38S. Review. Erratum in: J Am Dent Assoc. 2008 Mar;139(3):252.

Desai SS. Down syndrome: a review of the literature. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1997 Sep;84(3):279-85.

Dubois D, Leyssene D, Chacornac JP, Kostrzewa M, Schmit PO, Talon R, Bonnet R, Delmas J. Identification of a variety of Staphylococcus species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2010 Mar;48(3):941-5.

Eddabra R, Prévost G, Scheftel JM. Rapid discrimination of environmental Vibrio by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Microbiol Res. 2012 Apr 20;167(4):226-30.

Faria PF, Nicolau JA, Melek MZ, de Oliveira NS, Bermudez BE, Nisihara RM. Association between congenital heart defects and severe infections in children with Down syndrome. Rev Port Cardiol. 2014 Jan;33(1):15-8.

Feng Z, Weinberg A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. Periodontol 2000; 40:50–76.

Fidalgo TKS. Análise do metaboloma salivar de crianças por meio da ressonância magnética nuclear. [dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia, 2010.

Fiehn O, Kloska S and Altmann T. Integrated studies on plant biology using multiparallel techniques. Curr Opin Biotechnol. 2001; 12(1):82–6.

Finoti LS, Corbi SC, Anovazzi G, Teixeira SR, Capela MV, Tanaka MH, Kim YJ, Orrico SR, Cirelli JA, Mayer MP, Scarel-Caminaga RM. Pathogen levels and clinical response to periodontal treatment in patients with Interleukin 8 haplotypes. Pathog Dis. 2013; 69(1); 21–28.

Foster AG. Rapid Identification of microbes in positive blood cultures by use of the vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system. J. Clin. Microbiol. 2013; 51:3717–3719.

Freeman SB, Bean LH, Allen EG, Tinker SW, Locke AE, Druschel C, Hobbs CA, Romitti PA, Royle MH, Torfs CP, Dooley KJ, Sherman SL. Ethnicity, sex, and the incidence of congenital heart defects: a report from the National Down Syndrome Project. Genet Med. 2008 Mar;10(3):173-80.

Freitas-Fernandes LB, Albernaz F, Valente AP, Almeida F. Análise do pH da saliva total em pacientes com doença periodontal por RMN. Revista Virtual da AcBO. 2013: 1(2):2316-7262.

Fujinaka H, Takeshita T, Sato H, Yamamoto T, Nakamura J, Hase T, Yamashita Y. Relationship of periodontal clinical parameters with bacterial composition in human dental plaque. Arch Microbiol. 2013 Jun;195(6):371-83.

Garcia I, Tabak LA. Beyond the "omics": translating science into improved health. J Am Dent Assoc. 2008; 139: 392-395.

Garlet TR, Parisotto EB, de Medeiros Gda S, Pereira LC, Moreira EA, Dalmarco EM, Dalmarco JB, Wilhelm Filho D. Systemic oxidative stress in children and teenagers with Down syndrome. Life Sci. 2013 Oct 11;93(16):558-63.

Grant MM. What do ‘omic’ technologies have to offer periodontal clinical practice in the future? J Periodontal Res. 2012; 47: 2-14.

Greene JC, Vermillion JR. The simplified oral hygiene index. J Am Dent Assoc 1964; 68:7-13.

Gronert K, Kantarci A, Levy BD, Clish CB, Odparlik S, Hasturk H, Badwey JA, Colgan SP, Van Dyke TE, Serhan CN. A molecular defect in intracellular lipid signaling in human neutrophils in localized aggressive periodontal tissue damage. J Immunol. 2004 Feb 1;172(3):1856-61.

Grootveld M, Silwood CJ. 1H NMR analysis as a diagnostic probe for human saliva. Biochem Biophys Res Commun. 2005 Apr 1;329(1):1-5.

Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontol 2000. 1994 Jun;5:78-111.

Harrigan GG, Goodacre R. First book on metabolomics — Metabolic Profiling: Its Role in Biomarker Discovery and Gene Function Analysis. Kluwer Academic; 2003.

Henry, L.G., McKenzie, R.M., Robles, A. and Fletcher, H.M. Oxidative stress resistance in Porphyromonas gingivalis. Future Microbiol 2012; 7: 497–512.

Huang Y, Zhu M, Li Z, Sa R, Chu Q, Zhang Q et al. Mass spectrometry-based metabolomic profiling identifies alterations in salivary redox status and fatty acid metabolism in response to inflammation and oxidative stress in periodontal disease. Free Radic Biol Med. 2014 May;70:223-32.

Huo T1, Xiong Z, Lu X, Cai S. Metabonomic study of biochemical changes in urinary of type 2 diabetes mellitus patients after the treatment of sulfonylurea antidiabetic drugs based on ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry. Biomed Chromatogr. 2015 Jan;29(1):115-22.

IBGE − Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Demográfico 2010 - Características da população e dos domicílios: resultados do universo. Rio de Janeiro: IBGE, 2011.

Ilina EN, Borovskaya AD, Malakhova MM, Vereshchagin VA, Kubanova AA, Kruglov AN, Svistunova TS, Gazarian AO, Maier T, Kostrzewa M, Govorun VM. Direct bacterial profiling by matrix-assisted laser desorption-

ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of pathogenic Neisseria. J Mol Diagn. 2009 Jan;11(1):75-86.

Kataoka H, Taniguchi M, Fukamachi H, Arimoto T, Morisaki H, Kuwata H. Rothia dentocariosa induces TNF-alpha production in a TLR2-dependent manner. Pathog Dis. 2014 Jun;71(1):65-8.

Khocht A, Yaskell T, Janal M, Turner BF, Rams TE, Haffajee AD, Socransky SS. Subgingival microbiota in adult Down syndrome periodontitis. J Periodontal Res 2012; 47(4):500–507.

Komatsu T, Duckyoung Y, Ito A, Kurosawa K, Maehata Y, Kubodera T, Ikeda M, Lee MM. Increased oxidative stress biomarkers in the saliva of Down syndrome patients. Arch Oral Biol. 2013 Sep;58(9):1246-50.

La Scola B, Raoult D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. PLoS One. 2009 Nov 25;4(11):e8041.

Lameiras F, Heijnen JJ, van Gulik WM. Development of tools for quantitative intracellular metabolomics of Aspergillus niger chemostat cultures. Metabolomics. 2015;11(5):1253-1264.

Laroca LM, Piantelli M, Valitutti S, Castelino F, Maggiano N, Musiani P. Alterations in thyrocyte subpopulation in Down's syndrome (trissomy 21). Clin Immunol Immunopathol 1988; 49: 175-86.

Lartigue MF, Hery-Arnaud G, Haguenoer E, Domelier AS, Schmit PO, Van Der Mee-Marquet N, Lanotte P, Mereghetti L, Kostrzewa M, Quentin R. Identification of Streptococcus agalactiae isolates from various phylogenetic lineages by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol 47(7):2284-2287, 2009.

Leatherman MD, Policello GA, Rajaramaran SK. Cosmetic compositions comprising hydrolysis resistant organomodified disiloxane surfactants. U.S. Patent n. 8,491,876, 23 jul. 2013.

Lesher RJ, Gerencser VF, Morrison DJ. Presence of Rothia dentocariosa strain 477 serotype 2 in gingiva of patients with inflammatory periodontal disease. J Dent Res. 1977 Feb;56(2):189.

Lindon JC, Nicholson, JK, Holmes E. The handbook of metabonomics and metabolomics. Elsevier, 2011.

Lutz NW, Sweedler JV, Wevers RA. Methodologies for metabolomics: experimental strategies and techniques. Cambridge; New York: Cambridge University Press, 2013.

Lynch E, Sheerin A, Silwood CJ, Grootveld M. Multicomponent evaluations of the oxidising actions and status of a peroxoborate-containing tooth-whitening system in whole human saliva using high resolution proton NMR spectroscopy. J Inorg Biochem. 1999 Jan-Feb;73(1-2):65-84.

Määttä T, Tervo-Määttä T, Taanila A, Kaski M, Iivanainen M. Mental health, behaviour and intellectual abilities of people with Down syndrome. Downs Syndr Res Pract. 2006 Aug;11(1):37-43.

Macho V, Coelho A, Areias C, Macedo P, Andrade D. Craniofacial features and specific oral characteristics of Down syndrome children. Oral Health Dent Manag. 2014 Jun;13(2):408-11.

Macho V, Palha M, Macedo AP, Ribeiro O, Andrade C. Comparative study between dental caries prevalence of Down syndrome children and their siblings. Spec Care Dentist. 2013 Jan-Feb;33(1):2-7.

Marchesan JT, Morelli T, Moss K, Barros SP, Ward M, Jenkins W, Aspiras MB, Offenbacher S. Association of Synergistetes and Cyclodipeptides with Periodontitis. J Dent Res. 2015 Oct;94(10):1425-31.

Marinho ES, Santos MPM, Regueira L, Gomes MA, Jamelli SR, Cimões R. Avaliação periodontal clínica e microbiológica em mães de prematuros: estudo caso-controle. Pesqui. bras. odontopediatria clín. Integr. 2012; 12(4): 112-13.

Martinez-Martinez RE, Loyola-Rodriguez JP, Bonilla-Garro SE, Patiño-Marin N, Haubek D, Amano A, Poulsen K. Characterization of periodontal biofilm in Down syndrome patients: a comparative study. J Clin Pediatr Dent. 2013 Spring;37(3):289-95.

McKenzie RM, Aruni W, Johnson NA, Robles A, Dou Y, Henry L, Boskovic DS, Fletcher HM. Metabolome variations in the Porphyromonas gingivalis

vimA mutant during hydrogen peroxide-induced oxidative stress. Mol Oral Microbiol. 2015 Apr;30(2):111-27.

Mitchell RB, Call E, Kelly J. Ear, nose and throat disorders in children with Down syndrome. Laryngoscope. 2003 Feb;113(2):259-63.

Modi N, Ganguly S, Bárcena-Uribarri I, Benz R, van den Berg B3, Kleinekathöfer U. Structure, Dynamics, and Substrate Specificity of the OprO Porin from Pseudomonas aeruginosa. Biophys J. 2015 Oct 6;109(7):1429-38.

Moraes MEL, Tanaka JLO, Moraes LC, Medici Filho E, Castilho JCM. Skeletal age of individuals with Down syndrome. Spec Care Dentist. 2008;28(3): 101-6.

Morgan J. Why is periodontal disease more prevalent and more severe in people with Down syndrome? Spec Care Dentist. 2007 Sep-Oct;27(5):196-201.

Muchová J1, Žitňanová I, Ďuračková Z. Oxidative stress and Down syndrome. Do antioxidants play a role in therapy? Physiol Res. 2014;63(5):535-42.

Mustacchi Z. Sindrome de Down. In: Genética Baseada em Evidências, Síndromes e Heranças. Cap. 21, CID. Editora ltda. São Paulo, 1ª edição, 2000; 817 a 887.

Nabors TW, McGlennen RC, Thompson D. Salivary testing for periodontal disease diagnosis and treatment. Dent Today. 2010 Jun;29(6):53-4.

Navazesh M, Kumar SK; University of Southern California School of Dentistry. Measuring salivary flow: challenges and opportunities. J Am Dent Assoc. 2008 May; 139:35-40.

Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, Holmes E. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. Nat Rev Drug Discov. 2002 Feb;1(2):153-61.

Nicholson JK, Holmes E, Kinross JM, Darzi AW, Takats Z, Lindon JC. Metabolic phenotyping in clinical and surgical environments. Nature. 2012 Nov 15;491(7424):384-92.

Niederman R, Buyle-Bodin Y, Lu BY, Robinson P, Naleway C. Short-chain carboxylic acid concentration in human gingival crevicular fluid. J Dent Res. 1997 Jan;76(1):575-9.

Oliveira AC, Luz CLF, Paiva SM. The meaning of the oral health in the quality of life of the individual with down syndrome. Arq. Odontol.. 2007;43(04):162-168.

Oliveira AC, Paiva SM, Campos MR, Czeresnia D. Factors associated with malocclusions in children and adolescents with Down syndrome. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2008 Apr;133(4):489.e1-8.

Oredugba FA. Oral health condition and treatment needs of a group of Nigerian individuals with Down syndrome. Downs Syndr Res Pract. 2007 Jul;12(1):72-6.

Ormstad H, Verkerk R, Sandvik L. Serum Phenylalanine, Tyrosine, and their Ratio in Acute Ischemic Stroke: on the Trail of a Biomarker? J Mol Neurosci. 2015: 1-7.

Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. J Bacteriol. 2001 Jun;183(12):3770-83.

Pasternak, J. Novas metodologias de identificação de micro-organismos: MALDI-TOF. Einstein 2012; 10(1) 37-38.

Perinetti G, Paolantonio M, Femminella B, Serra E, Spoto G. Gingival crevicular fluid alkaline phosphatase activity reflects periodontal healing/recurrent inflammation phases in chronic periodontitis patients. Journal of Periodontology 2008; 79:1200–1207.

Petersen PE, Ogawa H. Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. J Periodontol 2005; 76(12):2187-93.

Pisano E, Cabras T, Montaldo C, Piras V, Inzitari R, Olmi C, Castagnola M, Messana I. Peptides of human gingival crevicular fluid determined by HPLC-ESI-MS. Eur J Oral Sci. 2005 Dec;113(6):462-8.

Pradeep AR, Daisy H, Hadge P. Gingival crevicular fluid levels of monocyte chemoattractant protein-1 in periodontal health and disease. Arch Oral Biol. 2009 May;54(5):503-9.

Prestes OD, Presta MA, Kolberg DIS, Zanella RR, Simone B, Penna NG, Hecktheuer LHR. Desenvolvimento e validação de um método analítico para a determinação de histamina em vinhos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. Quím Nova. 2007; 30(1):18-21.

Psychogios N, Hau DD, Peng J, Guo AC, Mandal R, Bouatra S, Sinelnikov I, Krishnamurthy R, Eisner R, Gautam B, Young N, Xia J, Knox C, Dong E, Huang P, Hollander Z, Pedersen TL, Smith SR, Bamforth F, Greiner R, McManus B, Newman JW, Goodfriend T, Wishart DS: The human serum metabolome. PLoS One. 2011 Feb 16;6(2):e16957.

Rams TE, Feik D, Slots J. Staphylococci in human periodontal diseases. Oral Microbiol Immunol. 1990 Feb;5(1):29-32.

Rasmussen SA, Wong LY, Correa A, Gambrell D, Friedman JM. Survival in infants with Down syndrome, Metropolitan Atlanta, 1979-1998. J Pediatr. 2006 Jun;148(6):806-812.

Rausch-Fan X, Ulm C, Jensen-Jarolim E, Shcedle A, Boltz-Nitulescu G, Rausch WD. Interleukin-1beta-induced prostaglandin E2 production by human gingival fibroblasts is up-regulated by glycine. J Periodontol 2005; 76: 1182 -1188

Rochfort S. Metabolomics reviewed: a new "omics" platform technology for systems biology and implications for natural products research. J Nat Prod. 2005 Dec;68(12):1813-20.

Saffert RT, Cunningham SA, Ihde SM, Jobe KE, Mandrekar J, Patel R. Comparison of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometer to BD Phoenix automated microbiology system for identification of gram-negative bacilli. J Clin Microbiol. 2011 Mar;49(3):887-92.

Sakellari D, Arapostathis KN, Konstantinidis A. Periodontal conditions and subgingival microflora in Down syndrome patients. A case-control study. J Clin Periodontol. 2005 Jun; 32(6):684-90.

Saxen L, Aula S. Periodontal bone loss in patients with Down's syndrome: a follow-up study. J Periodontol. 1982; 53(3):158-162.

Schwartz IV, Souza CFM, Giugliani M. Treatment of inborn errors of metabolism. J Pediatr. 2008; 84(4): S8-S19.

Shapira J, Stabholz A, Schurr D, Sela M, Mann J. Carie levels, Streptococcus mutans counts, salivary pH, and periodontal treatment needs of adult Down syndrome patients. Spec Care Dentist 1991;11(6):248-51.

Silwood CJ, Lynch E, Claxson AW, Grootveld MC. 1H and (13)C NMR spectroscopic analysis of human saliva. J Dent Res. 2002 Jun;81(6):422-7.

Silwood CJ, Lynch EJ, Seddon S, Sheerin A, Claxson AW, Grootveld MC. 1H-NMR analysis of microbial-derived organic acids in primary root carious lesions and saliva. NMR Biomed. 1999 Oct;12(6):345-56.

Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Virdi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. Front Microbiol. 2015 Aug 5;6:791.

Siqueira WL, Oliveira E, Mustacchi Z, Nicolau J. Electrolyte concentrantions in saliva of children age 6-10 years with Down syndrome. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radio Endod. 2004, 98: 76-9.

Souza RC, Lima FF, Faraco-Schwed FN, Alegretti CE, Scabar LF, Martins RB, Giovani, EM. Use of photodynamic therapy as an adjuvant to periodontal treatment in patients with Down syndrome: case report. J. Health Sci. Inst. 2011; 29(2): 96-9.

Souza RC. Associação entre indicadores salivares e o risco de cárie e doença periodontal na Síndrome de Down por meio de testes salivares rápidos. [dissertação]. São Paulo: Universidade Paulista, Faculdade de Odontologia; 2011.

Spielmann N, Wong DT. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. Oral Dis. 2011; 17: 345-354.

Srikanth R, Cassidy G, Joiner C, Teetuckdharry S. Osteoporosis in people with intellectual disabilities: a review and a brief study os risk factors for osteoporosis in a community sample os people with intellectual disabilities. J Intellect Disabil Res. 2011;55:55-62.

Stephan R, Cernela N, Ziegler D, Pflüger V, Tonolla M, Ravasi D, Fredriksson-Ahomaa M, Hächler H. Rapid species specific identification and subtyping of Yersinia enterocolitica by MALDI-TOF mass spectrometry. J Microbiol Methods. 2011; 87: 150–153.

Sugimoto M, Wong DT, Hirayama A, Soga T, Tomita M. Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. Metabolomics. 2010 Mar; 6(1): 78–95.

Tadros M, Petrich A. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry and Sepsityper KitTM for the direct identification of organisms from sterile body fluids in a Canadian pediatric hospital. Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol. 2013; (24):191–194.

Takeda I, Stretch C, Barnaby P, Bhatnager K, Rankin K, Fu H, Weljie A, Jha N, Slupsky C. Understanding the human salivary metabolome. NMR Biomed. 2009 Jul;22(6):577-84.

Tamijani SM, Karimi B, Amini E, Golpich M, Dargahi L, Ali RA, Ibrahim NM, Mohamed Z, Ghasemi R, Ahmadiani A. Thyroid hormones: Possible roles in epilepsy pathology. Seizure. 2015 Sep;31:155-64.

Tanaka MH, Giro EM, Cavalcante LB, Pires JR, Apponi LH, Valentini SR, Spolidório DM, Capela MV, Rossa C Jr, Scarel-Caminaga RM. Expression of interferon-γ, interferon-α and related genes in individuals with Down syndrome and periodontitis. Cytokine. 2012;60(3):875-81.

Terabe S, Markuszewski MJ, Inoue N, Otsuka K, Nishioka T. Capillary electrophoretic techniques toward the metabolome analysis. Pure App Chem. 2001; 73(10):1563-1572.

Thaweboon B, Laohapand P, Amornchat C, Matsuyama J, Sato T, Nunez PP, Uematsu H, Hoshino E. Host beta-globin gene fragments in crevicular fluid as a biomarker in periodontal health and disease. J Periodontal Res. 2010 Feb;45(1):38-44.

Todorovic T, Dozic I, Vicente-Barrero M, Ljuskovic B, Pejovic J, Marjanovic M, Knezevic M. Salivary enzymes and periodontal disease. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2006 Mar 1;11(2):E115-9.

Tonetti MS, D'Aiuto F, Nibali L, Donald A, Storry C, Parkar M, Suvan J, Hingorani AD, Vallance P, Deanfield J. Treatment of periodontitis and endothelial function. N Engl J Med. 2007 Mar 1;356(9):911-20.

Uppal H, Chandran S, Potluri R. Risk factors for mortality in Down syndrome. J Intellect Disabil Res. 2015 Sep;59(9):873-81.

Villas-Boas SG. Analytical techniques & applications of metabolomics in systems medicine and systems biotechnology. Comput Struct Biotechnol J. 2013 Feb 18;4:e201301001.

Walsh MC, Brennan L, Malthouse JP, Roche HM, Gibney MJ. Effect of acute dietary standardization on the urinary, plasma, and salivary metabolomic profiles of healthy humans. Am J Clin Nutr. 2006 Sep;84(3):531-9.

Wen XY, Hegele RA, Wang J, Wang DY, Cheung J, Wilson M, Yahyapour M., Bai Y, Zhuang L, Skaug J, Young TK, Connelly PW, Koop BF, Tsui LC, Stewart AK. Identification of a novel lipase gene mutated in lpd mice with hypertriglyceridemia and associated with dyslipidemia in humans. Hum. Molec. Genet. 2003;12: 1131-1143.

Winer RA, Chauncey HH. Parotid saliva enzymes in Down's syndrome. J Dent Res. 1975; 54(1):62-4.

Wishart, DS et. al *The Human Saliva Metabolome.* Publication in progress.

Wishart DS, Lewis MJ, Morrissey JA, Flegel MD, Jeroncic K, Xiong Y, Cheng D, Eisner R, Gautam B, Tzur D, Sawhney S, Bamforth F, Greiner R, Li L: The human cerebrospinal fluid metabolome. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2008 Aug 15;871(2):164-173.

Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N, Cheng D, Jewell K, Arndt D, Sawhney S, Fung C, Nikolai L, Lewis M, Coutouly MA, Forsythe I, Tang P, Shrivastava S, Jeroncic K, Stothard P, Amegbey G, Block D, Hau DD, Wagner J, Miniaci J, Clements M, Gebremedhin M, Guo N, Zhang Y, Duggan GE, Macinnis GD, Weljie AM, Dowlatabadi R, Bamforth F, Clive D, Greiner R, Li L, Marrie T, Sykes BD, Vogel HJ, Querengesser L. HMDB: the Human Metabolome Database. Nucleic Acids Res. 2007 Jan;35(Database issue):D521-6.

Yalcin EB, de la Monte SM. Review of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Imaging Mass Spectrometry for Lipid Biochemical Histopathology. J Histochem Cytochem. 2015 Oct;63(10):762-71.

Yang Q, Rasmussen Sa, Friedman JM. Mortality associated with Down's syndrome in the USA from 1983 to 1997: a population-based study. Lancet. 2002; 359: 1019-25.

Yarat A, Akyuz S, Koc L, Erdem H, Emekli N. Salivary sialic acid, protein, salivary flow rate, pH, buffering capacity and caries indices in subjects with Down's syndrome. J Dent 1999;27(2):115-8.

Yoshie H, Tai H, Kobayashi T, Oda-Gou E, Nomura Y, Numabe Y, Ito K, Kurihara H, Kamoi K. Salivary enzyme levels after scaling and interleukin-1 genotypes in Japanese patients with chronic periodontitis. J Periodontol. 2007 Mar; 78(3):498-503.

Zhang Y, Liu Y, Ma Q, Song Y, Zhang Q, Wang X, Chen F. Identification of Lactobacillus from the saliva of adult patients with caries using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. PLoS One. 2014 Aug 28;9(8):e106185.

.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo do metaboloma de biofluidos em individuos com Síndrome de Down e sua associação com a doença periodontal
Pesquisador: Ana Lidia Ciamponi
Área Temática:
Versão: 4
CAAE: 20672213.6.0000.0075
Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 658.979
Data da Relatoria: 23/05/2014

Apresentação do Projeto:
O termo metaboloma, não é encontrado nos dicionários de português, surgiu com o objetivo de identificar e compreender os produtos metabólicos como nucleotídeos, aminoácidos, açúcares, lipídeos e outras moléculas de amostras biológicas.
Os metabólitos desempenham papel importante na conexão das diferentes vias metabólicas que operam dentro de uma célula viva e podem ser detectados por métodos como a espectrometria de massa (MS), cromatografia gasosa (CG) e a ressonância magnética nucelar.
Com o avanço da tecnologia, este campo de estudo tornou-se mais amplo, e novas metodologias que compreendem a era genomica vieram colaborar com o estudo das reações e produtos finais celulares, como o metaboloma.
Essa nova metodologia, permite desde análise de toxidade de drogas, biomarcadores, genoma funcional até a patologia molecular.
A Síndrome de Down (SD) é uma das doenças genéticas humanas mais comuns, causada pela presença de um cromossoma 21 extra. Indivíduos com SD diferem na sua condição bucal, quando comparados com a população saudável, principalmente pelo desenvolvimento de
doença periodontal com curso mais severo e rápido. A doença periodontal (DP) não tratada pode conduzir à destruição das estruturas de suporte periodontais e eventual perda dos dentes. Alguns

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

fatores estão relacionados com a DP nestes indivíduos, como o baixo fluxo salivar, apinhamentos dentários, higiene oral precária e alterações imunológicas.
Embora, algumas teorias tentem explicar como ocorre este processo inflamatório crônico e agressivo, ainda há uma lacuna aberta à esta pergunta.
As alterações do sistema imunológico nos indivíduos com SD, podem ter um efeito profundo sobre a sua saúde bucal, que pode afetar a sua aceitabilidade social e qualidade de vida.
Os pesquisadores avaliarão 60 pacientes, sendo 30 pacientes portadores de Síndrome de Down, 15 com e 15 sem doença periodontal, e 30 pacientes normoreativos, 15 com e 15 sem doença periodontal, com idade entre 12 e 21 anos de ambos os generos.
Todos os pacientes serão submetidos a anamnese e ao exame clínico, quando será realizada a avaliação odontológica, coleta de urina, coleta de fluído crevicular e biofilme.
No exame clínico odontológico, será avaliado o índice CPO-S, e realizado o exame periodontal simplificado.
As amostras coletadas de urina (UR), biofilme supragengival (BS) e fluído crevicular (FCG) para análise do metaboloma, serão preparadas e analisadas no Laboratório de Controle e Simulação de Processos do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica de Química da USP (EPUSP). A análise metabolomica sera realizada por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, e os resultados serão submetidos a análise estatística.

Objetivo da Pesquisa:
Analisar o metaboloma de bioflúidos (urina, saliva e fluido crevicular) de adolescentes e adultos jovens com Síndrome de Down e estabelecer uma associação com a presença de doença periodontal.
Identificar e interpretar a atividade e fluxo de metabólitos endógenos na urina, biofilme e fluído crevicular.
Identificar biomarcadores relacionados com o desenvolvimento de doença periodontal.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Os riscos são mínimos, inerentes ao tratamento odontológico, e como benefício após adequada avaliação odontológica os pacientes serão submetidos a tratamento profilático.
O maior benefício será o de se estabelecer a presença de metabólitos como marcadores da doença periodontal na Síndrome de Down.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
Pesquisa atual, dependendo dos resultados encontrados será de grande valia que se tenha mais

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 658.979

uma relação causal para a doença periodontal nos portadores de S. de Down, e como consequência inovações no tratamento da mesma.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

As cartas de autorização do CAPE da FOUSP e do CEAPE da UNIP foram apresentadas.

Os demais termos, TCLE e carta de autorização do Departamento de Engenharia Química da Escola Politéquinica foram apresentados, não havendo impedimento ético.

Recomendações:

Ver pendências.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Rever o cronograma.

Reconsiderar: os riscos são mínimos, inerentes ao tratamento odontológico que será realizado.

Situação do Parecer:

Pendente

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 23 de Maio de 2014

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TÍTULO DO ESTUDO: "ESTUDO DO METABOLOMA DE BIOFLUIDOS EM INDIVIDUOS COM SÍNDROME DE DOWN E SUA ASSOCIAÇÃO COM A DOENÇA PERIODONTAL

Prezado(a) Senhor(a):

Você e/ou seu filho (a) estão sendo convidados(as) a participar de forma **voluntária** da pesquisa **"Estudo do metaboloma de biofluídos em individuos com Síndrome de Down e sua associação com a doença periodontal.** Sob a orientação da Profa. Dra. Ana Lídia Ciamponi da Faculdade de Odontologia de São Paulo, o orientado, Dra. Rafael Celestino de Souza, aluno do Doutorado da Faculdade de Odontologia de São Paulo, realizará a pesquisa na Clínica Odontológica e na Clínica do Centro de Atendimento a Pacientes Especiais da FOUSP.

O objetivo desta pesquisa é estudar a doença periodontal em individuos com síndrome de Down, relacionando substancias eliminadas pela urina, a saliva e placa bacteriana dos dentes. Para isso, realizaremos uma coleta de urina, saliva e placa bacteriana, um exame nos dentes e uma avaliação na saúde geral com o preenchimento de um questionário, sem custo para o participante da pesquisa. Serão realizados em uma única sessão e poderá levar de 1 a 2 horas.

A coleta de urina poderá ser realizada no Centro de Atendimento a Pacientes Especiais (CAPE) da FOUSP ou na casa do participante, neste caso, será entregue um pote especifico que deverá ficar armazenado na geladeira até ser entregue ao pesquisador. Para coletar a saliva deverá o participante ficar sentado em uma cadeira e mastigar um bloco de cera, cuspindo a saliva quando solicitado em um pote. Para a coleta de placa bacteriana dos dentes será usado um instrumental em forma de colher sob os dentes e recolhido o material. O risco para a saúde é mínimo.

O exame dos dentes será realizado em uma cadeira odontológica com uso de instrumentos de rotina , com risco mínimo para o participante.

O questionário será preenchido na mesma sessão e tem como objetivo informar o estado de saúde geral do participante, sem prejuízo emocional ou psicológico ao participante.

Esta pesquisa poderá ajudar a conhecer melhor o curso da doença periodontal para propor melhores e também a ajudar outros estudos a trazer melhoria na qualidade de vida da população estudada. Individualmente, seu (a) filho (a) será examinado para identificar algum tipo de doença bucal, caso seja identificado com alguma alteração que envolva a saúde dos dentes, seu (sua) filho (a) será encaminhado (a) para possível atendimento no CAPE ou Clínica Odontológica da USP.

As informações fornecidas serão confidenciais, bem como os resultados dos exames do (a) seu (a) filho (a), sendo de conhecimento apenas dos pesquisadores envolvidos. Os participantes da pesquisa não serão identificados em nenhum momento.

Quanto a utilização dos dados , você (responsável) poderá optar em:

( ) SIM, autorizo a utilização dos dados para publicação em revistas científicas.

( ) Não autorizo a utilização dos dados para a publicação em revistas científicas.

Quanto a utilização dos dados em outra pesquisa, você (responsável) poderá optar em:

( ) NÃO autorizo a utilização dos dados em outra pesquisa.

( ) SIM, autorizo a utilização dos dados em outra pesquisa .

( ) NÃO quero ser consultado da utilização dos dados em outra pesquisa, desde que a nova pesquisa seja aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

( ) SIM quero ser consultado da utilização dos dados em outra pesquisa.

Contatos:

Orientado: Rafael Celestino de Souza (rafaelcsouza@usp.br) - Fone: (11)25031418

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lídia Ciamponi - Fone : (11)3091-7835

Local: Faculdade de Odontologia de São Paulo Universidade de São Paulo

Se houver dúvidas sobre a ética da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia (Av. Lineu Prestes 2227, 05508-000 São Paulo, Fone: 3091-7960 ou pelo e-mail cepfo@usp.br).

"Após ter sido informado e ter todas as minhas dúvidas esclarecidas pelo pesquisador, **autorizo o(a) meu (minha) filho(a)** a participar de forma voluntária desta pesquisa. Sem prejuízo na continuidade do tratamento que meu (minha) filho (a) tem direito. Podendo a qualquer momento interromper este consentimento sem nenhum prejuízo. Estou recebendo uma cópia deste termo".

São Paulo, _____ de _____ de 2013.

Nome do responsável (LEGAL) :_____
(por extenso)

Assinatura do responsável (LEGAL): _____

Número do RG (do responsável LEGAL) : _____

_____
Orientado : Rafael Celestino de Souza - CRO 96574

_____
Orientadora: Profa. Dra. Ana Lídia Ciamponi - CRO 57861

ANEXO C – Ficha Clínica

FICHA CLÍNICA

Nome:_____ Idade:_____ Gênero: M ( ) F ( )

Nome do Responsável: _____ Vínculo:_____

Endereço:_____ Bairro:_____

Telefone: _____ Cidade:_____ CEP:_____

Tipo da trissomia:_____ Institucionalizado:_____

Faz uso de algum medicamento? Qual?_____

_____

Sofre de alguma doença? Qual? _____

_____

Exame Clínico Extra-oral: _____

Exame Clínico Intra-oral: _____

Índice de Placa:

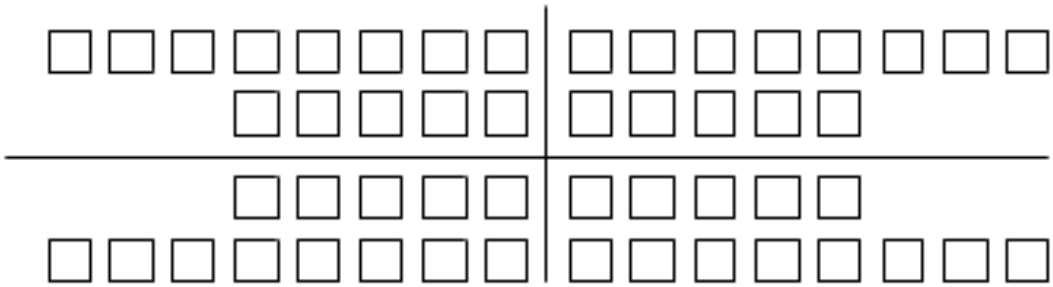
1ºMSD	1ºMSE	ICSD	1ºMID	1ºMIE	ICIE	TOTAL

Índice de Cálculo:

1ºMSD	1ºMSE	ICSD	1ºMID	1ºMIE	ICIE	TOTAL

Avaliação Periodontal:

Índice de Sangramento: _____% Classificação da DP (IPS):_____



Regiões de coleta de Fluído crevicular gengival:_____

Dia da 1º consulta: _____ Dia da 2º consulta: _____

Observação:

_____

_____

ANEXO D - Tabela de Código dos Metabólitos Identificados

Tabela de Código dos Metabólitos Identificados

Cód.	Metabólito
v1	(.+/-.)-2,3-Butanediol diTMS
v2	(1-Methoxymethoxy-but-2-enyl)-benzene
v3	(1R,3R,4R,5R)-(-)-Quinic acid
v4	(1S,17S)-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-Decaoxabicyclo[15.13.0]triacontane
v5	(2-Methyl-but-3-enyl-2-oxy)-dimethyl-silane
v6	(3-Methoxyphenyl)naphthalen-1-yldiazene
v7	(3-Oxo-2-pent-2-ynylcyclopentyl)thioacetic acid, S-t-butyl ester
v8	(4R,5S)Hept-1-yne-4,5-diol, 1-(2-methyl-1,3-dioxolan-2-yl)-
v9	(7-Isopropylidenebicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-ylidene)acetonitrile
v10	(R,S)-5-Ethyl-6-methyl-3E-hepten-2-one
v11	(R@,R@)-2,3-Dihydroxybutanoic acid, tri-TMS
v12	(R@,S@)-2,3-Dihydroxybutanoic acid triTMS
v13	(R@,S@)-3,4-Dihydroxybutanoic acid triTMS
v14	.alpha. Keto isovaleric acid enol di-TMS
v15	.alpha.-D-Erythro-Hexopyranoside, methyl 2,3-dideoxy-, diacetate
v16	.alpha.-D-Galactofuranose, 1,2,3,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-
v17	.alpha.-D-Galactopyranose, 1,2,3,4,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-
v18	.alpha.-D-Galactopyranose, 1,2,3-tris-O-(trimethylsilyl)-, cyclic methylboronate
v19	.alpha.-D-Galactopyranose, 2,3,4,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-, bis(trimethylsilyl) phosphate
v20	.alpha.-D-Galactopyranoside, methyl 2,3,4,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
v21	.alpha.-D-Galactopyranoside, methyl 2,3-bis-O-(trimethylsilyl)-, cyclic butylboronate
v22	.alpha.-D-Galactopyranoside, methyl 2,3-bis-O-(trimethylsilyl)-, cyclic methylboronate
v23	.alpha.-D-Galactopyranoside, methyl 2,3-bis-O-(trimethylsilyl)-, cyclic phenylboronate
v24	.alpha.-D-Galactopyranoside, methyl 2,6-bis-O-(trimethylsilyl)-, cyclic phenylboronate
v25	.alpha.-D-Galactoside, methyl tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
v26	.alpha.-D-Glucopyranose, 1,2,3,4,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-
v27	.alpha.-D-Glucopyranoside, 1,3,4,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-.beta.-D-fructofuranosyl 2,3,4,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
v28	.alpha.-D-Glucopyranoside, 1-O-methyl-2,3,4-tri-O-trimethylsilyl-
v29	.alpha.-D-Glucopyranoside, methyl 2-(acetylamino)-2-deoxy-3-O-(trimethylsilyl)-, cyclic butylboronate
v30	.alpha.-D-Glucopyranoside, methyl 2-(acetylamino)-2-deoxy-3-O-(trimethylsilyl)-, cyclic methylboronate
v31	.alpha.-D-Glucopyranoside, methyl 2,3,4,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
v32	.alpha.-D-Glucopyranosiduronamide, methyl 3-O-methyl-
v33	.alpha.-DL-Lyxofuranoside, methyl 2,3,5-tris-O-(trimethylsilyl)-
v34	.alpha.-D-Mannopyranoside, methyl 2,3-bis-O-(trimethylsilyl)-, cyclic butylboronate
v35	.alpha.-D-Xylofuranose, cyclic 1,2:3,5-bis(butylboronate)
v36	.alpha.-D-Xylofuranose, cyclic 1,2:3,5-bis(methylboronate)
v37	.alpha.-d-Xylopyranoside, 2,4-O-(ethylboranediyl)-1-O-methyl-
v38	.alpha.-Glycerophosphoric acid, tetrakis(trimethylsilyl)- ester
v39	.alpha.-L-Galactofuranose, 6-deoxy-1,2,3,5-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
v40	.alpha.-L-Galactopyranose, 6-deoxy-1,2,3,4-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
v41	.alpha.-L-Mannopyranose, 6-deoxy-1,2,3,4-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
v42	.alpha.-l-Mannopyranoside, methyl 6-deoxy-2,3,4-tris-O-(trimethylsilyl)-
v43	.beta. Hydroxybutyric acid di-TMS
v44	.beta.-Alanine, N-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester
v45	.beta.-Alanine, N,N-bis(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester
v46	.beta.-Amino isobutyric acid di-TMS
v47	.beta.-D-Erythro-Pentopyranose, 2-deoxy-, cyclic 3,4-(ethylboronate)
v48	.beta.-D-Fructopyranose, cyclic 2,3:4,5-bis(ethylboronate) 1-acetate
v49	.beta.-D-Galactofuranose, 1,2,3,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-
v50	.beta.-D-Galactopyranoside, methyl 2,3,4,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
v51	.beta.-D-Galactopyranoside, methyl 2,3-bis-O-(trimethylsilyl)-, cyclic butylboronate
v52	.beta.-D-Galactopyranoside, methyl 2,3-bis-O-(trimethylsilyl)-, cyclic methylboronate
v53	.beta.-D-Galactopyranoside, methyl 2,4-bis-O-(trimethylsilyl)-, diacetate
v54	.beta.-D-Galactopyranoside, methyl 3,4,6-tris-O-(trimethylsilyl)-, acetate
v55	.beta.-D-Glucopyranose, 1,2,3,4,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-
v56	.beta.-D-Glucopyranose, 3-O-methyl-1,2,4,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
v57	.beta.-D-Glucopyranose, 6-O-methyl-1,2,3,4-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
v58	.beta.-d-Glucopyranoside, methyl 2-amino-2-deoxy-3,4,6-tris-O-(trimethylsilyl)-
v59	.beta.-DL-Arabinopyranose, 1,2,3,4-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
v60	.beta.-DL-Lyxopyranose, 1,2,3,4-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
v61	.beta.-d-Mannofuranose, 2,3:5,6-di-O-ethylboranediyl-5-phenylpentyl-
v62	.beta.-d-Mannofuranoside, 2,3:5,6-di-ethylboranediyl-para-phenylbenzyl-
v63	.beta.-D-Mannopyranoside, methyl 2,3,4,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
v64	.beta.-D-Xylopyranose, 1,2,3,4-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
v65	.beta.-L-Arabinopyranose, 1,2,3,4-tetrakis-O-(trimethylsilo)-
v66	.beta.-L-Galactopyranose, 6-deoxy-1,2,3,4-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
v67	.beta.-L-Mannofuranose, 6-deoxy-1,2,3,5-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
v68	.beta.-L-Mannopyranose, 6-deoxy-1,2,3,4-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
v69	.gamma.-3,4,5,6-Tetrachlorocyclohexene
v70	.gamma.-Amino butyric acid di-TMS
v71	[1,2,4]Oxadiazin-6-one, 4,5-dihydro-5-(1-methylpropyl)-3-phenyl-
v72	[1,2]Azaborino[1,2-a][1,2]azaborine
v73	1-(3,4-Methylenedioxybenzylidene)semicarbazide

v74	1-(3-Aminopropyl)-2-pipecoline
v75	1-(3-Methylbutyl)-2,3,4,6-tetramethylbenzene
v76	1-(3-Methylbutyl)-2,3,4-trimethylbenzene
v77	1-(3-Methylbutyl)-2,3,5-trimethylbenzene
v78	1-(3-Methylbutyl)-2,3,6-trimethylbenzene
v79	1-(3-Methylbutyryl)pyrrolidine
v80	1-(4-Isopropylphenyl)-3-(2-furyl)propane
v81	1-(Trimethylsilylmethyl)dimethylsilyloxybutane
v82	1-(Trimethylsilylmethyl)dimethylsilyloxydecane
v83	1,1,1,3,5,5,5-Heptamethyltrisiloxane
v84	1,1,1,3,5,5,7,7,7-Nonamethyl-3-(trimethylsiloxy)tetrasiloxane
v85	1,1,1,3,5,7,7,7-Octamethyl-3,5-bis(trimethylsiloxy)tetrasiloxane
v86	1,1,1,5,7,7,7-Heptamethyl-3,3-bis(trimethylsiloxy)tetrasiloxane
v87	1,10-Dimethyl-4,7,13-trioxa-1,10-diazacyclopentadecane
v88	1,11,11-Trimethyl-3-azatricyclo[6.2.1.0(2,7)]undeca-2,4,6-triene
v89	1,13-Bis(trimethlysilyl)tridecane
v90	1,1-Cyclopropanedicarboxylic acid, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenyl methyl ester
v91	1,1-Dichloro-3-methyl-1-silacyclobutane
v92	1,1-Diethoxy-1-silacyclo-3-pentene
v93	1,1-Difluoro-2,2,3-trimethyl-cyclopropane
v94	1,2,3,3a-Tetrahydropentalene, 1,1-dimethyl-3-cyanomethylene-
v95	1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline, 6,7-dimethoxy-1-(3,4-dimethoxybenzyl)-2-nitroso-
v96	1,2,3-Benzenetriol
v97	1,2,3-Propanetricarboxylic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-, tris(trimethylsilyl) ester
v98	1,2,4-Benzenetricarboxylic acid, trimethyl ester
v99	1,2,5,6-Hexanetetrol, tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
v100	1,2:5,6-Di-O-ethylborandiyl-D-glycohexodialdose
v101	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(trimethylsilyl) ester
v102	1,2-Benzenedicarboxylic acid, dipropyl ester
v103	1,2-Benzenedicarboxylic acid, ditridecyl ester
v104	1,2-Bis(dimethylphenylsilyl)ethane
v105	1,2-Bis(trimethylsiloxy)cyclohexene
v106	1,2-Bis(trimethylsiloxy)ethane
v107	1,2-Bis(trimethylsilyl)benzene
v108	1,2-Bis[5-(4-chlorophenyl)furfuryl]ethylene
v109	1,2-Butanediol, di-TMS
v110	1,2-Cyclobutanedicarboxylic acid, trans-
v111	1,2-Dicarbadodecaborane(12)
v112	1,2-Dihydro-3-acetylquinolin-2-one
v113	1,2-Octadecanediol
v114	1,3,2-Benzoxazaborole, 2-ethyl-2,3-dihydro-
v115	1,3,2-Dioxaborinane, 2-(1-methylbutoxy)-
v116	1,3,2-Dioxaborinane, 2-ethyl-4-methyl-
v117	1,3,2-Dioxaborolane, 2-ethyl-4,5-dimethyl-
v118	1,3,2-Oxazaborolidine-4-carboxylic acid, 2-butyl-5-methyl-, methyl ester, cis-
v119	1,3,4,6-Hexanetetrone, 1,6-diphenyl-
v120	1,3,5-Cycloheptatriene, 2,5-diethyl-7,7-dimethyl-
v121	1,3,5-Cycloheptatriene, 7-ethyl-
v122	1,3,5-Triazine, 2,4,6-tris[(trimethylsilyl)oxy]-
v123	1,3,5-Trisilacyclohexane
v124	1,3-Bis(dimethyl-n-pentylsilyl)propene
v125	1,3-Bis-(methylthio)-2-methoxypropane
v126	1,3-Bis(trimethylsiloxy)benzene
v127	1,3-Bis(trimethylsilyloxy)pentane
v128	1,3-Bis[methyl(tetramethylene)silyloxy]propane
v129	1,3-Butadiene, 2-chloro-, dimer
v130	1,3-Dimethyl-5-pentamethyldisilyloxycyclohexane
v131	1,3-Dioxolan-4-one, 2-(2-naphthyl)-
v132	1,3-Dioxolan-4-one, 2-t-butyl-5-methyl-5-(4,4-dimethoxypentyl)-
v133	1,3-Dioxolane, 4-(2-furanyl)-2-phenyl-
v134	1,3-Dioxolane-4,5-dimethanol, 2,2-dimethyl-
v135	1,3-Dioxolane-4,5-dimethanol, 2,2-dimethyl-, (4R-trans)-
v136	1,3-Dioxolo[4,5-b]acridin-10(5H)-one, 11-hydroxy-4-methoxy-
v137	1,3-Dioxolo[4,5-g]isoquinolin-5-ol, 5,6,7,8-tetrahydro-6-methyl-
v138	1,3-Diphthalimido-2-propanol
v139	1,4,6-Androstatrien-3,17-dione
v140	1,4,7,15-Tetraoxa-10,12,18,20-tetraazacyclodocosane-11,19-dithione
v141	1,4-Benzenedimethanol, .alpha.,.alpha.'-dimethyl-
v142	1,4-Bis[(trimethylsilyl)ethynyl]benzene
v143	1,4-Dihydrophenacetic acid, 3,5-di-t-butyl-, ethyl ester
v144	1,4-Dioxane, 2,5-dihydroxy-3,6-bis(hydroxymethyl)tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
v145	1,4-Dioxaspiro[4.5]decan-8-ol, p-toluenesulfonate
v146	1,4-Eicosanediol
v147	1,5-Anhydro-3,6-di-O-acetyl-2,4-di-O-methyl-D-glucitol
v148	1,5-Cyclododecadien-9-yne, 2,5-dibromo-, (E,E)-
v149	1,5-Dimethyl-bicyclo[3.2.0]heptane-6-carboxylic acid
v150	1,7,7-Trimethyl-2-vinylbicyclo[2.2.1]hept-2-ene
v151	1,8-Dimethyl-1,8-diaza-cyclohexadecane-9,16-dione
v152	1-.beta.-d-Ribofuranosyl-s-triazolo[2,3-a]-s-triazin-5,7-dione
v153	1-[[3's-Hydroxy-2'R-butoxy]methyl]thymine, 1',3'-cyclic phenyl phosphonate
v154	10-Heneicosene (c,t)
v155	10-Octadecenal

v156	10-Uundecenamide, N-1-(2-naphthyl)ethyl-
v157	11-(Trimethylsilylmethyl)dimethylsilyloxy-1-undecene
v158	11H-Pyrido[3',2'-4,5]pyrrolo[3,2-c]quinoline
v159	11-trans-Octadecenoic acid, trimethylsilyl ester
v160	11-Undecanolide
v161	13-Tertadecen-1-ol acetate
v162	14-Aza-10,12-dioxatetracyclo[6.5.1.0(2,7).0(9,13)]tetradeca-2,4,6-triene, 14-methyl-11-oxo-
v163	15-Crown-5, [2-(diethylboryl)phenyl]-
v164	1a,6a-Dihydro-1H-6-azacyclopropa[a]indene-6-carboxylic acid, methyl ester
v165	1-Acetyl-3-(4-pyridyl)-pyrazoline
v166	1-Aza-2-sila-5-boracyclopent-3-ene, 1,2,2,3,4,5-hexamethyl-
v167	1-Azabicyclo[3.2.1]octane, 6-methyl-, exo-
v168	1-Bromo-2,2-dimethyl-3-carbonicum acid methyl ester
v169	1-Bromo-2,4,6-triisopropylbenzene
v170	1-Butyl-2,5-dicyanobenzene
v171	1-Chloro-2,3,5,6-tetrafluorobenzene
v172	1-Chloro-2,6-dinitrobenzene
v173	1-Cyclohexene-1-carboxylic acid
v174	1-Cyclopentene, 1-(methylencyclopropyl)-
v175	1-Dimethyl(trimethylsilylmethyl)silyloxycyclohexane
v176	1-Docosanethiol
v177	1-Docosanol
v178	1-Docosene
v179	1-Eicosanol
v180	1-Eicosene
v181	1-Ethoxy-4'-methoxy-2,2'-binaphthyl-1,4-dione
v182	1H-1,5-Benzodiazepine, 2,3,4,5-tetrahydro-2,2,4-trimethyl-
v183	1-Heneicosanol
v184	1-Heneicosyl formate
v185	1-Hentetracontanol
v186	1-Heptadecanol
v187	1-Heptadecene
v188	1-Hexacosene
v189	1H-Imidazole, 2-methyl-4-nitro-
v190	1H-Inden-5-ol, 2,3-dihydro-
v191	1H-Indene, 2-butyl-1-hexyl-2,3-dihydro-
v192	1H-Indole, 1-(trimethylsilyl)-5-[(trimethylsilyl)oxy]-
v193	1H-Indole, 1-(trimethysilyl)-2,5-bis[(trimethylsilyl)oxy]-
v194	1H-Indole-2,3-dione, 1-(tert-butyldimethylsilyl)-, 3-[O-(tert-butyldimethylsilyl)oxime]
v195	1H-Indole-2-acetic aciid, 1-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester
v196	1H-Indole-3-acetic acid, 1-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester
v197	1H-Indole-3-ethanamine, 6-fluoro-.alpha.-methyl-N,1-bis(trimethylsilyl)-
v198	1H-Indole-3-ethanamine, N,1-bis(trimethylsilyl)-
v199	1H-Isoindole-1,3(2H)-dione, 2-ethenyl-
v200	1H-Pyrrole, 1-(2-furanylmethyl)-
v201	1H-Pyrrole-2,5-dione, 1-(4-chlorophenyl)-
v202	1-Hydroxy-6-(4'-chlorobenzyl)-1,2,3,4,5,6-hexamethylcyclohexa-2,4-diene
v203	1-Hydroxycyclohexane-1-carboxylic acid diTMS
v204	1-Hydroxyinden-3-one-1-carboxylic acid
v205	1-Isovaleryl-6-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline
v206	1-Methyl-1-(4-tridecyl)oxy-1-silacyclopentane
v207	1-Methyl-1-(6-ethyl-3-octyloxy)-1-silacyclohexane
v208	1-Methyl-2-pentamethyldisilyloxycyclohexane
v209	1-Methyl-4-azafluorenone, 2-methylphenylimine
v210	1-Methyl-5-imidazolic hydrazide
v211	1-Methyl-trans-decahydroquinol-4(axial)-ol
v212	1-Methyl-trans-decahydroquinol-5(axial)-ol
v213	1-Monolinoleoylglycerol trimethylsilyl ether
v214	1-Monooleoylglycerol trimethylsilyl ether
v215	1-Naphthaleneacetic acid, 1.alpha.,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahydro-2.alpha.-hydroxy-2,5,5,8a.beta.-tetramethyl-, methyl ester, ac
v216	1-n-Octadecyloxy-1-methyl-1-silacyclobutane
v217	1-Nonadecene
v218	1-Octadecanol
v219	1-Octadecene
v220	1-Pentacosanol
v221	1-Pentadecanol
v222	1-Pentadecene
v223	1-Pentamethyldisilyloxy-3-phenylprop-2-ene
v224	1-Pentamethyldisilyloxyhexadecane
v225	1-Pentanol, 3-methyl-2-propyl-
v226	1-Phosphetanamine, 2,2,3,4,4-pentamethyl-N-propyl-, 1-oxide
v227	1-Piperidinecarboxaldehyde
v228	1-Propanamine, 2-chloro-N,N-bis(2-chloroethyl)-3-(1-naphthalenyloxy)-
v229	1-Propanethiol, 2-(9-borabicyclo[3.3.1]non-9-yloxy)-
v230	1-Propene, 3-[(4-nitrobutyl)thio]-
v231	1R,4s,7s,8R,11R-2,2,4,8-Tetramethyltricyclo[5.3.1.0(4,11)]undecan-7-ol
v232	1s,4R,7R,11R-1,3,4,7-Tetramethyltricyclo[5.3.1.0(4,11)]undec-2-en-8-one
v233	1-t-Butyl-2-methylaziridine-2-carbothioic acid, S-phenyl ester
v234	1-Tricosanol
v235	1-Tricosene
v236	1-Tridecanol
v237	1-Trimethylsilyloxyoctadecane

v238	1-Trimethylsilyloxytetradecane
v239	2-(1-Chlorohex-5-enyl)pyridine
v240	2(1H)-Naphthalenone, 7-ethynyl-4a,5,6,7,8,8a-hexahydro-1,4a-dimethyl-, (1.alpha.,4a.beta.,7.beta.,8a.alpha.)-
v241	2-(2,2-Dimethyl-propionyl)-5,5-dimethyl-cyclohexanone
v242	2(3H)-Furanone, dihydro-3,4-bis[(trimethylsilyl)oxy]-, cis-
v243	2(3H)-Naphthalenone, 4,4a,5,6,7,8-hexahydro-4a-phenyl-
v244	2-(4-Chlorophenoxy)-N'-(2-propoxybenzylidene)acethydrazide
v245	2-(N-Morpholinyl)ethylphosphine
v246	2-(p-Chlorophenyl)-3-methyl-3-(p-chlorophenylazo)butanoic acid
v247	2-(Trimethylsilylmethyl)dimethylsilyloxypropane
v248	2,2,3-Tricarbomethoxyaziridine
v249	2,2,4,5,5-Pentamethyl-3-imidazoline-1-oxile
v250	2,2-Diethyl-1,3-dithiane
v251	2,2-Dimethyl-1-oxa-2-silacyclohexanone-6
v252	2,2-Dimethyl-1-phenyl-1-propanol
v253	2,3,3-Trimethyl-2-(4-methyl-pentanoyl)-cyclopentanone
v254	2,3,4,6-Tetra-O-trimethylsilyl-1-[1,7-dicarba-closo-dodecaboran-(12)-1-yl]-D-glucopyranose, .alpha./.beta.
v255	2,3,4-Trihydroxybutyric acid tetraTMS
v256	2,3-Dichloro-6-methylquinoxaline
v257	2,3-Dihydro-4-methoxy-3,3-dimethylindole-2-one
v258	2,3-Dimethyl-1,4,4a,9a-tetrahydroanthracene-9,10-dione
v259	2,3-Dimethyl-1,4-diphenylbicyclo[2.2.0]hexane
v260	2,3-Dimethyl-4-nitrobutyric acid, methyl ester
v261	2,3-Dioxabicyclo[2.2.1]heptane, 1-phenyl-
v262	2,3-Quinoxalinedicarboxaldehyde
v263	2,4(1H,3H)-Pyrimidinedione, dihydro-1,3-bis(trimethylsilyl)-
v264	2,4,6(1H,3H,5H)-Pyrimidinetrione, 5-[2,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]-2-propenyl]-1,3-dimethyl-5-(1-methylbutyl)-
v265	2,4,6(1H,3H,5H)-Pyrimidinetrione, 5-ethyl-1,3-dimethyl-5-(1-methylbutyl)-
v266	2,4,6-Trifluoroaniline
v267	2,4,6-Trimethyl-3-thioxo-5-oxo-2,3,4,5-tetrahydro-1,2,4-triazine
v268	2,4,6-Tri-t-butylbenzenethiol
v269	2,4-Dicarbaheptaborane(7), 2,4-dimethyl-
v270	2,4-Docosanediol, 3,5-dimethyl-
v271	2,4-Hexadiene, 4-ethyl-2-methyl-3-[(trimethylsilyl)oxy(dimethylsilyl)]-
v272	2,4-Octadienoic acid, 7-hydroxy-6-methyl-, methyl ester, [r-[r@,s@-(E,E)]]-
v273	2,5-Pyrrolidinedione, 1-butyl-
v274	2,6,10,15,19,23-Hexamethyl-tetracosa-2,10,14,18,22-pentaene-6,7-diol
v275	2,6-Bis(thiocyantomethyl)-4-methylanisole
v276	2,6-Dimethylmorpholine-4-carbothioic acid 2-[1-[3-isoquinolyl]ethyl]hydrazide
v277	2,6-Octadiene, 3,7-dimethyl-1-(hydroxydimethylsilyl)-1-(trimethylsilyl)-
v278	2,6-Piperazinedione, dioxime
v279	2,6-Piperidinedione, 1-(5-hydroxypentyl)-
v280	2,6-Pyridinediamine, 3-(phenylazo)-
v281	2,7-Bis(spirocyclopropane)bicyclo[2.2.1]heptan-3-one
v282	2,8,13,14-Tetrasilatetracyclo[7,3,0,0(3,7).0(3,9)]tetradeca-4,6,10,12-tetraene, 2,2,8,8,13,13,14,14-octamethyl-
v283	2,8,9-Trioxa-5-aza-1-borabicyclo[3.3.3]undecane
v284	2,8,9-Trioxa-5-aza-1-silabicyclo[3.3.3]undecane, 1-ethenyl-
v285	2-[(2-Hydroxy-1,1-dimethylethyl)amino]-1,4-naphthoquinone
v286	2-[(Ethylamino)methyl]indole
v287	2-[4-(Diethylamino)-a-(2-hydroxy-4,4-dimethyl-6-oxo-1-cyclohexen-1-yl)benzyl]-5,5-dimethyl-1,3-cyclohexanedione
v288	2a-(4-Chlorophenyl)-2-methoxy-4-[N-(2-bromophenyl)-N-methylamino]-1,2,2a,3-tetrahydroazeto(1,2-a)(1,5)-benzodiazepin-1-one
v289	2-Amino-2-oxo-acetic acid, N-[3,4-dimethylphenyl]-, ethyl ester
v290	2-Amino-4,6-dihydroxypyrimidine
v291	2-Butenamide, N,N-diethyl-2-methyl-, (E)-
v292	2-Butenedioic acid (E)-, bis(trimethylsilyl) ester
v293	2-Butenedioic acid (E)-, diethyl ester
v294	2-Butenedioic acid (Z)-, dibutyl ester
v295	2-Butenoic acid, 2-[(tert-butyldimethylsilyl)oxy]-3-methyl-, tert-butyldimethylsilyl ester
v296	2-Butyl-1-methyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-ol
v297	2-Butyl-5-methylthiazole
v298	2-Chlormethyl-3,3-dimethylcyclopropancarbonic acid,methyl ester
v299	2-Chloro-7-methylquinoxaline
v300	2-Chloroethyl oleate
v301	2-Chloro-n-heptyl-N-methylpropionamide
v302	2-Cyclohexen-1-ol, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, acetate
v303	2-Cyclohexen-1-one, 2-hydroxy-4,4,6,6-tetramethyl-
v304	2-Cyclohexen-1-one, 4,5-dimethyl-4-phenyl-
v305	2-Deoxy ribose per-TMS II
v306	2-Deoxy-galactose, tetrakis(trimethylsilyl)
v307	2-Dimethyl(trimethylsilyl)silyloxytridecane
v308	2-Dodecen-1-yl(-)succinic anhydride
v309	2-Eicosanol, (.+/-.)-
v310	2-Ethyl-1-Pentamethyldisilyloxyhexane
v311	2-Ethyl-2-formylaminosuccinic acid, di-t-butyl ester
v312	2-Ethyl-3-hydroxypropionic acid, di-TMS
v313	2-Ethyl-7-phenyl-5H-1,3,4-thiadiazolo[3,2-A]pyrimidin-5-one
v314	2-Fluoroimidazole-4-carboxylic acid, methyl(ester)
v315	2-Furanmethanamine, N,N-diethyl-.alpha.-methyl-
v316	2H,8H-Benzo[1,2-b:5,4-b']dipyran-10-propanoic acid, 5-methoxy-2,2,8,8-tetramethyl-, methyl ester
v317	2H-1-Benzopyran-2-one, 3,5,7-trihydroxy-
v318	2H-3,1-Benzoxazine, octahydro-2-(4-methylphenyl)-, cis-
v319	2-Heptanol, 6-amino-2-methyl-

v320	2-Hexenoic acid, trimethylsilyl ester
v321	2H-Isoindole-2-acetic acid, 1,3-dihydro-.alpha.-methyl-1,3-dioxo-
v322	2H-Pyran-2-carboxylic acid, 3,6-dihydro-6-methoxy-, butyl ester
v323	2H-Quinolizin-1-ol, octahydro-, trans-
v324	2H-Quinolizine-1-methanol, octahydro-, (1R-trans)-
v325	2-Hydroxy-3,5-diethyl-5-methylcyclopent-2-en-1-one
v326	2-Hydroxy-5-nitropyridine
v327	2-Hydroxycyclohexane-1-carboxylic acid diTMS
v328	2-Indole carboxylic diTMS
v329	2-Indolinone, 3-[(o-aminophenyl)imino]-
v330	2-Indolizinemethanol
v331	2-Isopropenyl-3,6-dimethylpyrazine
v332	2-Ketosuccinic acid, tri-TMS
v333	2-Methoxy-3,6-dichloro-phenol
v334	2-Methyl-1,3-bis(trimethylsiloxy)propane
v335	2-Methyl-1,3-bis(trimethylsilyloxy)butane
v336	2-Methyl-1,4-bis(trimethylsiloxy)butane
v337	2-Methyl-1-ethylpyrrolidine
v338	2-Methyl-1-phenyl-1-butanol
v339	2-Methyl-3,5-heptadiene, 7-trimethylsilyl-2,3-bis(trimethylsilyloxy)-
v340	2-Methyl-4-ketoglutaconate, bis(trimethylsilyl)- deriv.
v341	2-Methyl-oct-2-enedial
v342	2-Methyl-Z-4-tetradecene
v343	2-Mono-isobutyrin, bis(trimethylsilyl)-
v344	2-Monooleoylglycerol trimethylsilyl ether
v345	2-Monopalmitin trimethylsilyl ether
v346	2-O-Glycerol-.alpha.-d-galactopyranoside, hexa-TMS
v347	2-Oxiranemethanol, .alpha.-(1-methylethyl)-3-[1-(trimethylsilyloxy)pentyl]-
v348	2-Pentamethyldisilyloxybutane
v349	2-Pentene, 3-diethylboryl-2-(chloromethylsilyl)-
v350	2-Pentenoic acid, 2-[(tert-butyldimethylsilyl)oxy]-, tert-butyldimethylsilyl ester
v351	2-Pentenoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester
v352	2-Pentenoic acid, 5-[(1,5-dimethyl-4-hexenyl)oxy]-3-methyl-, ethyl ester, (E)-
v353	2-Piperidinecarboxamide, 1-butyl-N-(2,6-dimethylphenyl)-
v354	2-Piperidinecarboxylic acid, 1-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester
v355	2-Piperidinone, 1-methyl-
v356	2-Piperidone, 1-(trimethylsilyl)-3-[(trimethylsilyl)amino]-
v357	2-p-Methoxyphenyl-5-ethoxy-oxadiazole-1,3,4
v358	2-p-Nitrophenyl-oxadiazol-1,3,4-one-5
v359	2-Propanol, 1,3-dibromo-
v360	2-Propenoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester
v361	2-Propenoic acid, 2-methyl-, 2-[[2,3,3a,4,7,7a(or 3a,4,5,6,7,7a)-hexahydro-4,7-methano-1H-indenyl]oxy]ethyl ester
v362	2-Propenoic acid, 2-methyl-3,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester
v363	2-Propenoic acid, 3-(2-methoxyphenyl)-
v364	2-Propenoic acid, 3-(4-methoxyphenyl)-, 2-ethylhexyl ester
v365	2-Propenoic acid, 3-phenyl-
v366	2-Propenoic acid, 3-phenyl-, (E)-
v367	2-Propenoic acid, octyl ester
v368	2-Pyrrolidinone, 1-(9-octadecenyl)-
v369	2-sec-Butylthiazole
v370	2-t-Butyl-5-chloromethyl-3-methyl-4-oxoimidazolidine-1-carboxylic acid, t-butyl ester
v371	2-Thiazolidinimine, 3-methyl-
v372	2-Thiophenemethanamine
v373	3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionic acid
v374	3-(3,6-Dimethyl-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)-3-hydroxy-3H-isobenzofuran-1-one
v375	3-(3-Amino-4-methyl-phenyl)-3,4,4-trimethyl-cyclopentanone
v376	3-(Bromomethyl)cyclohexanone
v377	3-(Formylhydrazono)-2',4',6'-trimethylbutyranilide
v378	3,12-Dibora-2,4,11,13-tetraoxatricyclo[12.4.0.0(5,10)]octadecane, 3,12-diethyl-
v379	3,12-Dioxa-2,13-disilatetradecane, 2,2,13,13-tetramethyl-
v380	3,3-Dimethyl-1,5,13,14-tetraoxa-10,19-diazacyclotricosane-6,9,20,23-tetrone
v381	3,4,5,6-Tetra-O-acetyl-2-O-methyl-D-galactonitrile
v382	3,4,5-Trihydroxypentanoic acid, tetra-TMS
v383	3,4-Dimethyl-1-dimethyl(trimethylsilylmethyl) silyloxycyclohexane
v384	3,4-Dimethyl-1-pentamethyldisilyloxycyclohexane
v385	3,5-Cyclohexadiene-1,2-diol, 3-chloro-6-methyl-
v386	3,5-Decadien-7-yne, 6-t-butyl-2,2,9,9-tetramethyl-
v387	3,5-Dimethylbenzaldehyde thiocarbamoylhydrazone
v388	3,5-Disilaheptane, 3,3,5,5-tetramethyl-
v389	3,5-Di-t-butyl-4-hydroxybenzoic acid, ethyl ester
v390	3,5-Dodecadiyne, 2-methyl-
v391	3,5-Hexadien-1-yne, 1,3,6-tris(trimethylsilyl)-, (E,E)-
v392	3,6,10-Trioxa-2,11-disiladodecane, 2,2,11,11-tetramethyl-
v393	3,6,12-Trimethyl-1,4,7,10,13,16-hexaaza-cyclooctadecane-2,5,8,11,14,17-hexaone
v394	3,6,6-Trimethylundecane-2,5,10-trione
v395	3,6,9,12,15,18-Hexaoxabicyclo[18.3.1]tetracosa-1(24),20,22-triene
v396	3,6,9,12-Tetraoxa-2,13-disilatetradecane, 2,2,13,13-tetramethyl-
v397	3,6,9,13-Tetraoxa-2,14-disilapentadecane, 2,2,14,14-tetramethyl-
v398	3,6,9-Trioxa-2,10-disilaundecane, 2,2,10,10-tetramethyl-
v399	3,6-Dioxa-2,4,5,7-tetrasilaoctane, 2,2,4,4,5,5,7,7-octamethyl-
v400	3,6-Dioxa-2,7-disilaoctane, 2,2,4,4,5,5,7,7-octamethyl-
v401	3,6-Dioxa-2,7-disilaoctane, 2,2,4,7,7-pentamethyl-

v402	3,7,11,15-Tetramethyl-hexadecanol TMS ether
v403	3,7-Dioxa-2,8-disilanonane, 2,2,8,8-tetramethyl-
v404	3,8-Dioxa-2,9-disiladec-5-ene, 2,2,9,9-tetramethyl-, (E)-
v405	3,8-Dioxa-2,9-disiladec-5-ene, 2,2,9,9-tetramethyl-, (Z)-
v406	3,8-Dioxa-2,9-disiladec-5-yne, 2,2,9,9-tetramethyl-
v407	3,8-Dioxa-2,9-disiladecane, 2,2,9,9-tetramethyl-
v408	3,8-Dioxa-2,9-disiladecane, 2,2,9,9-tetramethyl-5,6-bis[(trimethylsilyl)oxy]-, (R@,S@)-
v409	3,9,-Dimethyl-6,14,17,22,25-pentaoxa-1,3,9,11-tetraazabicyclo[9.8.8]-heptaocta-cosan-2,10-dione
v410	3,9-Epoxypregn-16-en-20-one, 3-methoxy-7,11,18-triacetoxy-
v411	3.alpha.-(Trimethylsiloxy)cholest-5-ene
v412	3.alpha.,4.alpha.,9.beta.,11-Diepoxymuurolan-10-ol
v413	3.beta.-(Trimethylsiloxy)cholest-4-ene
v414	3.beta.,5-Bis(trimethylsiloxy)-5.alpha.-cholestane
v415	3-[(E)-2-Chloro-1-methyl-1-butenyl]-3-methyl-1,2,4-trioxolane
v416	3-Azabicyclo[7.3.1]-1(13),9,11-tridecatriene, 3,13-dimethyl-
v417	3-Benzyloxy-butyric acid, 2-methoxycarbonyl-1-methyl-ethyl ester
v418	3-Butoxy-1,1,1,5,5,5-hexamethyl-3-(trimethylsiloxy)trisiloxane
v419	3-Cyclobutene-1,2-dione, 3-phenyl-
v420	3-Eicosene, (E)-
v421	3-Ethyl-3-methylheptane
v422	3-Formyl-2,2,4,5-tetramethyloxazolidine-4-carboxylic acid, methyl ester
v423	3-Heptadecene, (Z)-
v424	3-Heptyne, 7-fluoro-2,2-dimethyl-
v425	3-Hydroxy-2-phenylquinoxaline tms
v426	3'-Hydroxybenzo[1',2'-b]-1,4-diazabicyclo[2.2.2]octene
v427	3-Indolamine, 6-fluoro-5-methoxy-N,2-bis[ethoxycarbonylmethyl]-
v428	3-Isoxazolidinone, 4-[bis(trimethylsilyl)amino]-2-(trimethylsilyl)-
v429	3-Methoxy-3,6.alpha.-dipentyl-5.alpha.-androstane-6.beta.,17.beta.-diol
v430	3-Methoxy-N-methylsulfonylbenzenecarboximidamide
v431	3-Methyl-1,3-bis(trimethylsilyloxy)butane
v432	3-Methyl-4-trimethylsiloxy(trimethylsilyl)butyrate
v433	3-Methyl-5-keto-3-hexenoic acid, bis(trimethylsilyl) deriv.
v434	3-Methylene-1,4-bis(trimethylsilyloxy) butane
v435	3-Methyltricosane
v436	3-Octadecene, (E)-
v437	3-Octen-2-amine, N,N-dimethyl-, (E)-
v438	3-Octen-2-one, 4-(methylamino)-
v439	3-Oxabicyclo[3.3.0]octane-2,7-dione
v440	3-Penten-2-one, 3,4-dimethyl-, semicarbazone
v441	3-Phenyl-3-trimethylsilyloxypropanoic acid, trimethylsilyl ester
v442	3-Phenyl-4-(N-methyl-4-chlorophenylhydrazono)isoxazol-5-one
v443	3-Pyridinecarboxylic acid, 6-ethyl-5-methyl-, ethyl ester
v444	3-Pyrrolamine, 3,4-(5H)-dihydro-5-(t-butyldimethylsilyloxy)methyl-
v445	3-t-Butylhexan-2-one
v446	3-Trifluoromethylpyridine
v447	3-Trimethylsiloxyvaleric acid, trimethylsilyl ester
v448	3-Trimethylsilyloxy-2-methyltrimethylsilylvalerate
v449	3-Trimethylsilyloxy-6-methylpyridine
v450	4-(1,4-Benzoquinonyl)benzoic acid
v451	4(1H)-Isobenzofuranone, hexahydro-3a,7a-dimethyl-, cis-(.+/-.)-
v452	4-(1'-Pyperidinocarbonylpropyl)-2-methylpyridine
v453	4-(2,4,4-Trimethyl-bicyclo[4.1.0]hept-2-en-3-yl)-butan-2-one
v454	4-(Benzoylmethyl)-2H-1,4-benzoxazin-3-one
v455	4-(Dichloromethyl)-5-hydroxy-2(3H,5H)-furanone
v456	4-(N,N-Dimethylamino)-cholestane
v457	4'-(Trifluoromethyl)acetophenone
v458	4-(Trimethylsilyl)morpholine
v459	4,11-Dispiro(2'-cyclobutanone)tricyclo[6.2.2.0(2,7)]dodeca-5,9-diene, 1,3,3,5,12,12-hexamethyl-
v460	4,25-Secoobscurinervan-4-ol, 22-ethyl-15,16-dimethoxy-, (4.beta.,22.alpha.)-
v461	4,4,7-Trimethyl-oct-5-enal
v462	4,4-Dimethyl-5-methylene-2-allylamino-2-thiazoline
v463	4,5,6,7-Tetrahydroxy-1,8,8,9-tetramethyl-8,9-dihydrophenaleno[1,2-b]furan-3-one
v464	4,5-Di-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methyl-D-mannonitrile
v465	4,6-Pyrimidinediamine, 2-(methylthio)-
v466	4,8,13-Cyclotetradecatriene-1,3-diol, 1,5,9-trimethyl-12-(1-methylethyl)-
v467	4a-(1-Hydroxy-ethyl)-hexahydrobenzo[1,3]dioxin-4-one
v468	4a-Acetyl-hexahydrobenzo[1,3]dioxin-4-one
v469	4-Acetamido-4-ethylundecane
v470	4-Acetoxy-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydroazulene
v471	4-Acetyl-4-phenylpiperidine
v472	4-Amino-2,2,5,5-tetramethyl-3-imidazoline-1-oxile
v473	4'-Amino-4-diethylaminochalcone
v474	4-Benzyl-isoxazolidine
v475	4-Chloro-2-nitrobenzyl alcohol
v476	4-Chlorotricyclo[4.4.0.0(2,8)]dec-4-ene
v477	4-Cyclopentene-1,3-dione, 4-methoxy-5-methyl-
v478	4-Decenoic acid, methyl ester
v479	4-Dibutylaminobut-2-en-1-ol
v480	4-Fluoroimidazole-5-[1,1-dimethylbutyric acid amide]
v481	4H-Benzo[def]carbazole
v482	4H-Pyrido[1,2-a]pyrimidin-4-one, 3-ethyl-6-methyl-
v483	4-Imidazolidinone, 5-(4-chlorobutyl)-2-(1,1-dimethylethyl)-5-ethyl-3-methyl-, (2R-trans)-

v484	4-Methyl-3-(3-nitrophenyl)-6-phenyl-5,6-dihydro-4H-[1,2,4,5]oxatriazine
v485	4-N-Trimethylsilylmethylaminobutyric acid, trimethylsilyl ester
v486	4-Octynoic acid, 7-(t-butyldimethylsilyloxy)-, t-butyldimethylsilyl ester
v487	4-Pentenoic acid, 2-acetyl-2,3-dimethyl-, ethyl ester
v488	4-Pentenoic acid, 4-methoxycarbonyl-, isopropyl ester
v489	4-Phenyl-1-benzylpyridinium bromide
v490	4-Piperidinone, 1-methyl-
v491	4-Pyrimidinamine, 5-methyl-N-(trimethylsilyl)-2-[(trimethylsilyl)oxy]-
v492	4-Pyrimidinamine, 6-chloro-2-(methylthio)-
v493	4-Pyrimidinamine, N-(trimethylsilyl)-2-[(trimethylsilyl)oxy]-
v494	4-Pyrimidinecarboxaldehyde, 2,6-bis[(trimethylsilyl)oxy]-
v495	4-Trimethylsiloxy(trimethylsilyl)valerate
v496	5(4H)-Thebenidinone
v497	5-(Acetamido)butyl-2-thioxoimidazolidin-4-one
v498	5,16-Pregnadien-3-ol-20-one, 3-acetate-20-oxime-
v499	5,6,8-Trimethoxydinaphtho[1,2-B:2',1'-D]furan
v500	5,6-Dicarbadecaborane(12), 5,6-dimethyl-
v501	5,7-Dioxacycloheptaldoxime, 2,3-dehydro-3-nitro-
v502	5,8-Tridecadione
v503	5.alpha.-Cholestan-7.beta.-amine, N,N-dimethyl-
v504	5-Ethyl-8-(trimethylsilylmethyl)dimethylsilyloxydecane
v505	5-Fluoro-4-chloro-2-aminopyrimidine
v506	5H-Cyclohepta-1,4-dioxin, 2,3,4a,6,7,9a-hexahydro-, cis-
v507	5-Hydroxyhexanoic acid diTMS
v508	5-Isopropyl-2-methylcyclohexanone
v509	5-Methyl-7-phenyl-1,3-diazaadamantane
v510	5-Methylthiazoline, 2-[4-methoxy-3-methylphenyl]-
v511	5-Methyltryptamine
v512	5-Methyl-Z-5-docosene
v513	5-Octadecenal
v514	5-Phenyl-piperonylic acid
v515	5-Pyrimidinamine, 2-chloro-4-ethoxy-
v516	5-Pyrimidinamine, 4-phenyl-
v517	6-(3-Hydroxy-but-1-enyl)-1,5,5-trimethyl-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-2-ol
v518	6,6-Dichloro-7-oxobicyclo[3.2.0]hept-2-ene-2-carboxaldehyde
v519	6,9-Epoxy-2H,6H-pyrimido[2,1-b][1,3]oxazocin-2-one, 7,8,9,10-tetrahydro-7,8-dihydroxy-, [6R-(6.alpha.,7.alpha.,8.alpha.,9.alpha
v520	6,9-Pentadecadione
v521	6-Chloro-7-oxa-2-thiatricyclo[4.3.1.0(3,8)]decane
v522	6-Dimethyl(trimethylsilyl)silyloxytetradecane
v523	6H-Cyclohepta-1,3-dioxol-4,8-imin-6-one, hexahydro-2,2,9-trimethyl-
v524	6-Hydroxy-3,3-dimethyl-9-oxa-bicyclo[3.3.1]nonan-2-one
v525	6-Isopropyl-9-methyl-1,4-dioxa-spiro[4.5]decane-2,3-dicarboxylic acid, dimethyl ester
v526	6-Methyl-5-oxo-12,13-dioxa-tricyclo[7.3.1.0(1,6)]tridecane-10-carboxylic acid, methyl ester
v527	7,16-Dimethyl-1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacyclooctadecane-2,6,17-trione
v528	7,9-Diethyl-2,4-bis(dimethylamino)-10-imino-8-thio-1,7,9-triazaspiro[4.5]-1,3-decadiene-6,8-dione
v529	7-Exo-ethyl-5-methyl-6,8-dioxabicyclo[3.2.1]oct-3-ene
v530	7H-2,4a-Methanonaphthalen-7-one, 1,2,3,4,5,6-hexahydro-1,1,5,5-tetramethyl-, (2s-cis)-
v531	7-Heptadecene, 7-methyl-, (E)-
v532	7-Octadecanone
v533	7-Trimethylsilyloxy-7-methyloctanoic acid, trimethylsilyl ester
v534	8-Isopropenyl-1,3,3,7-tetramethyl-bicyclo[5.1.0]oct-5-en-2-one
v535	9-(2',2'-Dimethylpropanoilhydrazono)-3,6-dichloro-2,7-bis-[2-(diethylamino)-ethoxy]fluorene
v536	9-(Dicyanomethylene)fluorene
v537	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, trimethylsilyl ester
v538	9-Borabicyclo[3.3.1]nonane, 9-methoxy-
v539	9-Heptadecene-4,6-diyn-8-ol, (Z)-
v540	9H-Purin-6-amine, N,9-bis(trimethylsilyl)-
v541	9-Morpholinomethyl-1-phenyl-3,6-diazahomoadamantan-9-ol
v542	9-Tricosene, (Z)-
v543	9-Undecen-2-one, 6,10-dimethyl-
v544	Acenaphthylene, 1,2-bis(trimethylsilyloxy)-
v545	Acetamide, 2,2,2-trifluoro-N-methyl-N-(trimethylsilyl)-
v546	Acetamide, N-(2,3-dihydro-1-oxo-1H-inden-5-yl)-
v547	Acetamide, N-[2-(acetyloxy)-1-methyl-2-phenylethyl]-N-methyl-
v548	Acetamide, N-[3-(acetylethylamino)propyl]-n-pentyl-
v549	Acetic acid, [(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester
v550	Acetic acid, [o-(trimethylsiloxy)phenyl]-, trimethylsilyl ester
v551	Acetic acid, 2-(2,2,6-trimethyl-7-oxa-bicyclo[4.1.0]hept-1-yl)-propenyl ester
v552	Acetic acid, 2-(7-hydroxy-2,2,7-trimethyltetrahydro-[1,3]dioxolo[4,5-c]pyran-4-yl)ethyl ester
v553	Acetic acid, 3,7,11,15-tetramethyl-hexadecyl ester
v554	Acetic acid, 3-hydroxy-2,2-dimethoxy-propyl ester
v555	Acetic acid, bis[(trimethylsilyl)oxyl]-, trimethylsilyl ester
v556	Acetic acid, phenyl(trimethylsiloxy)-, methyl ester
v557	Acetonitrile, 2-phenyl-2-trimethylsilyloxy-
v558	Acetyl turicine
v559	Acrylic acid, 2,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester
v560	Acrylonitrile, .beta.-[3-(2,2-dimethylcyclopropyl)-2,2-dimethylcyclopropyl-
v561	Alanine, phenyl-, trimethylsilyl ester, dl-
v562	Aldehydo-d-glucose, 2-deoxy-3,5:4,6-di-O-(ethylboranediyl)-
v563	Aminomalonic acid, tris(trimethylsilyl)-
v564	Androst-4-ene-3,17-dione, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-, (2.beta.)-
v565	Anthracene, 9-ethenyl-

v566	Anthranilic acid, N-methyl-, butyl ester
v567	Arabinitol, pentakis-O-(trimethylsilyl)-
v568	Arabinofuranose, 1,2,3,5-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
v569	Arabinonic acid, 2,3,4-tris-O-(trimethylsilyl)-, lactone, D-
v570	Arabitol, pentakis(trimethylsilyl)-
v571	Ar-himachalen-2-ol
v572	Azacitidine
v573	Aziridine, 2-(1,1-dimethylethyl)-1-hexyl-3-methyl-, trans-
v574	Bacteriochlorophyll-c-stearyl
v575	Benzamide, N-(trimethylsilyl)-
v576	Benzamide, N-methyl-
v577	Benzene, (1,1-diethylpropyl)-
v578	Benzene, (1-ethoxyethenyl)-
v579	Benzene, (1-octyldecyl)-
v580	Benzene, (2,2-difluoroethenyl)-
v581	Benzene, (trimethoxymethyl)-
v582	Benzene, [1-(2-propenyloxy)-3-butenyl]-
v583	Benzene, [1-chloro-2-(methylsulfonyl)ethyl]-
v584	Benzene, 1-(1,1-dimethylethyl)-3,5-dimethyl-
v585	Benzene, 1-(1,3-dimethyl-3-butenyl)-4-fluoro-
v586	Benzene, 1-(2,2-dimethylpropyl)-2,4,5-trimethyl-
v587	Benzene, 1,1'-bis(1-hexene-3-one-4-methyl-1,6-diyl)
v588	Benzene, 1,2,3,4-tetramethyl-4-(1-methylethenyl)-
v589	Benzene, 1,2,3-trimethyl-
v590	Benzene, 1,2,4-triethyl-
v591	Benzene, 1,2,4-trimethyl-
v592	Benzene, 1,2-diethyl-3,4-dimethyl-
v593	Benzene, 1,2-diethyl-4,5-dimethyl-
v594	Benzene, 1,3,5-triethyl-
v595	Benzene, 1,3,5-trimethyl-
v596	Benzene, 1,3-diethyl-5-methyl-
v597	Benzene, 1,4-bis(1-methylethyl)-
v598	Benzene, 1,4-dichloro-2-nitro-
v599	Benzene, 1,4-difluoro-2,3-dimethyl-
v600	Benzene, 1-chloro-4-methoxy-2-nitro-
v601	Benzene, 1-chloro-4-nitro-
v602	Benzene, 1-ethyl-2-methoxy-, dichloro deriv.
v603	Benzene, 1-ethyl-2-methyl-
v604	Benzene, 1-ethyl-3-methyl-
v605	Benzene, 1-ethyl-4-nitro-
v606	Benzene, 1-ethynyl-2-(methylthio)-
v607	Benzene, 1-methoxy-2-methyl-, dichloro deriv.
v608	Benzene, 1-methyl-3-propyl-
v609	Benzene, 3-[3-iodo-2-(iodomethyl)-2-methylpropyl]-1,2,4,5-tetramethyl-
v610	Benzene, 4-ethyl-1,2-dimethyl-
v611	Benzeneacetaldehyde, .alpha.,2,5-trimethyl-
v612	Benzeneacetaldehyde, 4-chloro-.alpha.-methyl-
v613	Benzeneacetaldehyde, 4-methyl-.alpha.-(2-propenyloxy) oxime
v614	Benzeneacetamide, N-(trimethylsilyl)-
v615	Benzeneacetic acid, .alpha.,4-bis[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester
v616	Benzeneacetic acid, 3-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester
v617	Benzeneacetic acid, 4-(1,1-dimethylethyl)-, methyl ester
v618	Benzeneacetic acid, 4-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester
v619	Benzeneacetic acid, trimethylsilyl ester
v620	Benzenemethanamine, .alpha.-methyl-N-phenyl-
v621	Benzenemethanol, ar,ar,.alpha.-trimethyl-
v622	Benzeneoctanoic acid, 2-butyl-, methyl ester
v623	Benzenepropanoic acid, .alpha.,4-bis[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester
v624	Benzenepropanoic acid, .beta.-[(tert-butyldimethylsilyl)oxy]-, tert-butyldimethylsilyl ester
v625	Benzenepropanoic acid, trimethylsilyl ester
v626	Benzenesulfonamide, 4-(dimethylamino)-N,N-dimethyl-
v627	Benzo[b]thiophene, ethyl-
v628	Benzocyclobutene, 1-triisopropylsilyl-
v629	Benzocyclopentene, 4,6,7-triethyl-1-methyl-5-vinyl-
v630	Benzofuran-6-ol-4-one, 2,3,4,5,6,7-hexahydro-3-undecyl-
v631	Benzofurazan, 5-chloro-4-methoxy-
v632	Benzoic acid trimethylsilyl ester
v633	Benzoic acid, 2,4,6-trimethyl-, trimethylsilyl ester
v634	Benzoic acid, 2,4-dimethyl-, (3,5-dimethylphenyl)methyl ester
v635	Benzoic acid, 2-methoxy-, trimethylsilyl ester
v636	Benzoic acid, 3,4,5-trihydroxy-
v637	Benzoic acid, 3-cyano-
v638	Benzoic acid, 4-[(trimethylsilyl)amino]-, trimethylsilyl ester
v639	Benzoic acid, 4-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester
v640	Benzoic acid, 4-cyano-
v641	Benzonitrile, 2,4,6-tris(1,1-dimethylethyl)-
v642	Benzonitrile, 4-(2-methyl-1,3-dioxolan-2-yl)-
v643	Benzonitrile, N-oxide
v644	Benzophenone, 2,4,6-trimethyl-
v645	Benzoxazole, 2,2'-(2,5-thiophenediyl)bis[5-(1,1-dimethylethyl)-
v646	Benzoyl chloride, 4-propyl-
v647	Benzylamine, .alpha.-methyl-N-(trimethylsilyl)-

v648	Bicyclo[2.2.1]hept-2-ene, 5-ethylidene-
v649	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-amine, N,4,7,7-tetramethyl-
v650	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 4-ethynyl-1,7,7-trimethyl-
v651	Bicyclo[4.2.1]nona-2,4-diene, 7-acetyl-8-isopropyl-
v652	bis [Trimethylsiloxethyl] amine
v653	Bis-(2,2,6,6-tetramethyl,-4-piperidyl) amide adipinic acid
v654	Bis(2-ethylhexyl) phthalate
v655	Bis(dimethyl-t-butylsilyl) maleate
v656	Bis(trimethylsilyl)monostearin
v657	Bis(trimethylsilyl)sarcosine
v658	Bis[1-methylimidazole-2-yl methyl]amine
v659	Borane, dimethylaminobis(methylaziridinyl)-
v660	Borinic acid, diethyl-, (2-ethyl-1,3,2-dioxaborolan-4-yl)methyl ester
v661	Boronic acid, phenyl-, bis(1-methylethyl) ester
v662	Butanal, 2,3,4-tris[(trimethylsilyl)oxy]-, (R@,R@)-
v663	Butane, 1,2,3,4-tetrakis[(trimethylsilyl)oxy]-
v664	Butane, 1,2,3-tris(trimethylsiloxy)-
v665	Butane, 1,4-dichloro-2,3-bis(trimethylsiloxy)-
v666	Butane, 2,3-bis(trimethylsiloxy)-
v667	Butanedioic acid, [(trimethylsilyl)oxy]-, bis(trimethylsilyl) ester
v668	Butanedioic acid, 2-[[[(trimethylsilyl)amino]carbonyl]amino]-, dimethyl ester
v669	Butanedioic acid, bis(trimethylsilyl) ester
v670	Butanedioic acid, methyl-, bis(tert-butyldimethylsilyl) ester
v671	Butanoic acid, 2-[(trimethylsilyl)amino]-, trimethylsilyl ester
v672	Butanoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester
v673	Butanoic acid, 2-[bis(trimethylsilyl)amino]-, trimethylsilyl ester
v674	Butanoic acid, 2-methyl-3-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester
v675	Butanoic acid, 3-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester
v676	Butanoic acid, 3-methyl-2-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester
v677	Butanoic acid, 4-[(tert-butyldimethylsilyl)amino]-, tert-butyldimethylsilyl ester
v678	Butanoic acid, 4-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester
v679	Butanoic acid, 4-[bis(trimethylsilyl)amino]-, trimethylsilyl ester
v680	Butyric acid, 2-methyl-4-(2,5-xylyl)-
v681	Butyric acid, 3-hydroxy-, monoanhydride with 1-butaneboronic acid, cyclic ester
v682	C(14a)-Homo-27-norgammacer-13-en-21-ol, 3-methoxy-, (3.alpha.,21.beta.)-
v683	Cadaverine tetratms
v684	Cadaverine tri-TMS
v685	Carbamate, N-{2-[(2-amino-2-thioxoethyl)amino]-2-oxoethyl}-, 1,1dimethylethyl ester
v686	Carbamic acid, [2-[(cyanomethyl)amino]-1-methyl-2-oxoethyl]-, 1,1-dimethylethyl ester, (s)-
v687	Carbamic acid, methyl-, 7-chloro-2,3-dihydro-1-methyl-2-oxo-5-phenyl-1h
v688	Carbamothioic chloride, dimethyl-
v689	Carbamoylglycine, bis(trimethylsilyl)- deriv.
v690	Carbothioamide, 2-[1-(2,6-dimethylphenyl)methylidene]-1-hydrazine
v691	Chlidanthine, 1,2-dihydro-
v692	Chloral Hydrate
v693	Chloromethyl 5-chloroheptanoate
v694	Cholest-5-en-3-ol (3.beta.)-, 3-phenyl-2-propenoate
v695	Cholest-5-en-3-ol (3.beta.)-, propanoate
v696	Cholest-5-ene, 3-bromo-, (3.beta.)-
v697	Cholest-5-ene, 3-methoxy-, (3.beta.)-
v698	Cholesta-3,5-diene
v699	Cholestan-2-amine, N,N-dimethyl-, (2.alpha.)-
v700	Cholestan-3-ol, 2-methylene-, (3.beta.,5.alpha.)-
v701	Cholesterol trimethylsilyl ether
v702	Chromium, bis-(1,3-dimethyl-.eta.-3-indenyl)-
v703	Chrysene
v704	Cinnamic acid, p-methoxy-, trimethylsilyl ester
v705	cis-anti-cis-Tricyclo[7.3.0.0(2,6)]-7-dodecene
v706	cis-syn-trans-Tricyclo[7.3.0.0(2,6)]dodec-7-ene
v707	Citric Acid
v708	Citric acid monohydrate
v709	Cobalt, .eta.-5-fluorenyl-pentamethylcyclopentadienyl-
v710	Cobalt, .eta.-5-indenyl-.eta.-5-pentamethylcyclopentadienyl-
v711	Corymbolone
v712	Creatinine enol tri-TMS
v713	Cucurbitacin b, 25-desacetoxy-
v714	Cyano[4-(2-cyano-2-methoxycarbonylethyl)-1H-pyrrol-3-ylmethyl]acetic acid, methyl ester
v715	Cyclobutane, 1,2-bis(2-methylphenyl)-3,4-bis(4-methoxy-2H-pyran-2-one-6-yl)-, (1-.alpha.,2-.alpha.,3-.beta.,4-.beta.)-
v716	Cyclobutene, 3,4-dibromo-
v717	Cyclodecasiloxane, eicosamethyl-
v718	Cyclodocosane, ethyl-
v719	Cyclododecane, ethyl-
v720	Cycloheptasiloxane, tetradecamethyl-
v721	Cyclohexane, (1-hexyltetradecyl)-
v722	Cyclohexane, (ethenylthio)-
v723	Cyclohexane, 1,1'-(2-propyl-1,3-propanediyl)bis-
v724	Cyclohexane, 1,2,3,4,5,6-hexaethyl-
v725	Cyclohexane, 1-ethyl-2-propyl-
v726	Cyclohexaneamine, N-(2,3,4-trimethylhex-3-enylidene)-, N-oxide
v727	Cyclohexanecarbonitrile, 3,3,5,5-tetramethyl-1-(phenylsulfinyl)-
v728	Cyclohexanecarboxylic acid, methyl ester
v729	Cyclohexaneethanethiol, acetate

v730	Cyclohexanol, 4-[4-azido-1-hexahydropyridyl]-4-phenyl-
v731	Cyclohexanol, TMS derivative
v732	Cyclohexanone, 2,3-dimethyl-2-(3-oxobutyl)-
v733	Cyclohexanone, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-, trans-
v734	Cyclohexanone, 3-hydroxy-2,4,4-trimethyl-3-(3-methyl-1,3-butadienyl)-
v735	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-
v736	Cyclohexene, .gamma.-3,4,5,6-tetrachloro-
v737	Cyclohexene, 1-chloro-5-(1-chloroethenyl)-
v738	Cyclohexene, 3-butyl-1-trimethylsilyloxy-
v739	Cycloisolongifolene, 7-bromo-
v740	Cyclononasiloxane, octadecamethyl-
v741	Cycloocta-1,3,6-triene, 2,3,5,5,8,8-hexamethyl-
v742	Cyclooctacosane
v743	Cyclooctancarboxylic acid, 4-methyl-, ethyl ester
v744	Cyclooctasiloxane, hexadecamethyl-
v745	Cyclooctene, 5,6-diethenyl-, cis-
v746	Cyclopentadecanone, 2-hydroxy-
v747	Cyclopentane, (4-octyldodecyl)-
v748	Cyclopentane, 1,2-dipropyl-
v749	Cyclopentane, 1-pentyl-2-propyl-
v750	Cyclopentane, 2-(1-hydroxy-2-propyl)-1,3-dimethyl-
v751	Cyclopentane-1,2,4-trione, 3,3,5,5-tetrakis(trimethylsilyloxy)-
v752	Cyclopentanecarboxylic acid, 1-amino-, bis(trimethylsilyl) deriv.
v753	Cyclopentasiloxane, decamethyl-
v754	Cyclopentene, 3,3-dimethyl-4-methylene-1,2-bis(trimethylsilyloxymethyl)-
v755	Cyclopropancarbonic-2,2,3,3-tetramethyl acid,-(1-ethyl-octyl) ester
v756	Cyclopropane -1-methyl-1-ethenyl-2-chloro-2-(2-furyl)
v757	Cyclopropane, 1-chloro-1-ethyl-2,2,3-trimethyl-
v758	Cyclopropane, 2-(1,1-dimethyl-2-pentenyl)-1,1-dimethyl-
v759	Cyclopropane, 2-methylene-1-trimethylsilyl-1-(1-trimethylsilyloxy)ethenyl-
v760	Cyclopropanecarboxylic acid, 3-formyl-2,2-dimethyl-, ethyl ester
v761	Cyclopropanol, 1-[2-methyl-1-(phenylthio)cyclohexyl]-
v762	Cyclotetracosane
v763	Cyclotetradecane
v764	Cyclotetradecane, 1,7,11-trimethyl-4-(1-methylethyl)-
v765	Cyclotetrasiloxane, octamethyl-
v766	Cyclotrisiloxane, hexamethyl-
v767	Cycloundecanone
v768	Cytidine, 2'-deoxy-
v769	D-Altrose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-
v770	D-Arabinonic acid, 2,3,5-tris-O-(trimethylsilyl)-, .gamma.-lactone
v771	Decaborane, ethyl-
v772	Decane, 5-ethyl-5-methyl-
v773	Decanedioic acid, 3,6-dimethyl-, dimethyl ester
v774	Decanedioic acid, bis(tert-butyldimethylsilyl) ester
v775	Decanoic acid, 10-bromo-, trimethylsilyl ester
v776	Decanoic acid, 10-fluoro-, trimethylsilyl ester
v777	Decanoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-1-[[(trimethylsilyl)oxy]methyl]ethyl ester
v778	Decanoic acid, 9-oxo-, methyl ester
v779	D-Erythro-Pentitol, 2-deoxy-1,3,4,5-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
v780	D-Erythro-Pentofuranose, 2-deoxy-1,3,5-tris-O-(trimethylsilyl)-
v781	D-Erythro-Pentopyranose, 2-deoxy-1,3,4-tris-O-(trimethylsilyl)-
v782	d-Erythro-pentose, 2-deoxy-3,4,5-tris-O-(trimethylsilyl)-, o-methyloxime
v783	D-Erythrose, tris(trimethylsilyl)- deriv.
v784	d-Erythrotetrofuranose, tris-O-(trimethylsilyl)-
v785	D-Fructose, 1,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-
v786	D-Fructose, 3-O-[2,3,4,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-.alpha.-D-glucopyranosyl]-1,4,5,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
v787	D-Fructose, 6-O-[2,3,4,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-.alpha.-D-glucopyranosyl]-1,3,4,5-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
v788	d-Galactitol, 2-(acetylamino)-2-deoxy-1,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-
v789	D-Galactose, 2-(acetylamino)-2-deoxy-3,4,5,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
v790	D-Galactose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-
v791	d-Galactose, didecyl mercaptal
v792	D-Glucitol, 6-deoxy-1,2,3,4,5-pentakis-O-(trimethylsilyl)-
v793	D-Glucopyranose, 2-(acetylamino)-2-deoxy-1,3,4,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
v794	D-Glucopyranose, 4-O-[2,3,4,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-.beta.-D-galactopyranosyl]-1,2,3,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
v795	d-Glucosamine, tetrakis(trimethylsilyl)-
v796	D-Glucose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-
v797	D-Glucose, 2,3,6-tri-O-methyl-4,5-bis-O-(trimethylsilyl)-, O-methyloxime
v798	D-Glucose, 4-O-[2,3,4,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-.beta.-D-galactopyranosyl]-2,3,5,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
v799	D-Glucose, 4-O-[2,3,4,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-.beta.-D-glucopyranosyl]-2,3,5,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
v800	D-Glucose, 6-O-.alpha.-D-galactopyranosyl-, bis-O-(trimethylsilyl) deriv., cyclic tris(methylboronate)
v801	D-Glycero-D-galacto-2-Nonulosonic acid, 5-(acetylamino)-3,5-dideoxy-4,6,7,8,9-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl este
v802	Diazene, bis(4-chlorophenyl)-, 1-oxide
v803	Diaziridinone, bis(1,1-dimethyl-2-phenylethyl)-
v804	Dibenz[a,c]cycloheptane, 1,2,9-trimethoxy-
v805	Dicinnamamide, (E)-
v806	Dictamnine
v807	Diethyl aminomalonate, trimethylsilyl deriv.
v808	Diethyl-di(prop-2-enyl)-silane
v809	Diftalone
v810	Digitoxin
v811	Dihydrocoumarin, 4,4,5,7,8-pentamethyl

v812	Dimepiperate
v813	Dimethyl-dioctyl-silane
v814	Dipyrrolo[1,2-a:-1',2'-d]pyrazine-5,10-dione, octahydro-2,7-dihydroxy-
v815	Disiloxane, 1,1,3,3-tetramethyl-1,3-bis[3-(oxiranylmethoxy)propyl]-
v816	Disiloxane, 1,3-bis(1,1-dimethylethyl)-1,1,3,3-tetramethyl-
v817	Disiloxane, 1,3-diethoxy-1,1,3,3-tetramethyl-
v818	Disiloxane, chloropentamethyl-
v819	Disiloxane, hexamethyl-
v820	Disiloxane, triethyltrimethyl-
v821	d-Lyxose, didecyl mercaptal
v822	D-Mannitol, 1,2,3,4,5,6-hexakis-O-(trimethylsilyl)-
v823	D-Mannopyranose, 1,2,3,4,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-
v824	d-Mannose, didecyl mercaptal
v825	Docosa-8,14-diyn-cis-1,22-diol, di-TMS
v826	Docosahexaenoic acid, 1,2,3-propanetriyl ester
v827	Docosane
v828	Docosane, 11-decyl-
v829	Docosanoic acid, 2-hydroxy-, methyl ester
v830	Docosanoic acid, docosyl ester
v831	Dodecane, 1-chloro-
v832	Dodecanoic acid, 1-methylethyl ester
v833	Dodecanoic acid, trimethylsilyl ester
v834	D-Ribofuranose, 1,2,3,5-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
v835	D-Ribo-Hexitol, 3-deoxy-1,2,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-
v836	D-Ribo-Hexonic acid, 3-deoxy-2,5,6-tris-O-(trimethylsilyl)-, lactone
v837	D-Ribonic acid, 2,3,5-tris-O-(trimethylsilyl)-, .gamma.-lactone
v838	D-Ribonic acid, 2-C-methyl-2,3,5-tris-O-(trimethylsilyl)-, .gamma.-lactone
v839	D-Ribopyranose, 1,2,3,4-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
v840	D-Ribose, 2,3,4,5-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
v841	D-Ribose, 2-O-methyl-3,4,5-tris-O-(trimethylsilyl)-, O-methyloxime
v842	D-Turanose, heptakis(trimethylsilyl)-
v843	D-Xylofuranose, 1,2,3,5-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
v844	d-Xylose, tetrakis(trimethylsilyl)-
v845	E,E,Z-1,3,12-Nonadecatriene-5,14-diol
v846	Eicosanoic acid, 2,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]propyl ester
v847	Eicosanoic acid, trimethylsilyl ester
v848	Erucylamide
v849	erythro-7,8-Bromochlorodisparlure
v850	Erythro-Pentitol, 2-deoxy-1,3,4,5-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
v851	Erythro-Pentonic acid, 2-deoxy-3,4,5-tris-O-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester
v852	Erythrose per-TMS
v853	Estra-1,3,5(10)-trien-17-one, 3,16-bis(acetyloxy)-, (16.beta.)-
v854	Estra-1,3,5(10)-trien-6-one, 3,17-bis(acetyloxy)-2-methoxy-, (17.beta.)-
v855	Ethane, 1,1,1-trichloro-2,2-diethoxy-
v856	Ethanedioic acid, bis(trimethylsilyl) ester
v857	Ethanimidic acid, N-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester
v858	Ethanol, 2-(eicosyloxy)-
v859	Ethanone, 1-(2-ethyl-4-methyl-1,3,2-dioxaborolan-4-yl)-
v860	Ethanone, 1-(4-chloro-3-methylphenyl)-
v861	Ethanone, 1-(4'-nitro[1,1'-biphenyl]-4-yl)-
v862	Ethanone, 1-[2-ethyl-4-methyl-5-(1-methylethyl)-1,3,2-dioxaborolan-4-yl]-
v863	Ethanone, 1-[3-(1,1-dimethylethoxy)-2-thienyl]-
v864	Ethanone, 1-[4-(1,1-dimethylethyl)-2,6-dimethyl-3,5-dinitrophenyl]-
v865	Ethoxyamine, di-TMS
v866	Ethyl 2-methyl-3-trimethylsiloxyvalerate
v867	Ethyl 4-cyanobenzoate
v868	Ethyl 5-(5-methyl-2-furyl)-2,4-pentadienoate
v869	Ethyl phosphoric acid, di-TMS derivative
v870	Ethyl trnas-2-triethylsilyl-cyclopropane-1-carboxylate
v871	Ethylbis(trimethylsilyl)amine
v872	exo-Norbornanol, pentamethyldisilyl ether
v873	Fumaric acid, (1-buten-4-yl) ethyl ester
v874	Furan, 2,5-bis(2-furanylmethyl)-
v875	Galactaric acid, 2,3,4,5-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-, bis(trimethylsilyl) ester
v876	Galactose, 2-(acetylamino)-2-deoxy-3,4,5,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
v877	Galacturonic acid, 2,3,4,5-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester
v878	Germane, tetrapentyl-
v879	Germane, trimethyl(1-methyl-2-butenyl)-
v880	Glucofuranoside, methyl 2,3,5,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-, .alpha.-D-
v881	Gluconic acid, .gamma.-lactone, 2-methoximine, tri(trimethylsilyl)-
v882	Gluconic acid, 2,3,5,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-, lactone
v883	Gluconic acid, 2-methoximine, tetra(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester
v884	Glucopyranose pentaTMS
v885	Glucopyranose, 2,3-di-O-methyl-1,4,6-tris-O-(trimethylsilyl)-
v886	Glucopyranose, 4-O-[2,3,4,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-.beta.-d-glucopyranosyl]-1,2,3,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-, d-
v887	Glucose oxime hexaTMS
v888	Glucose, pentakis-O-trimethylsilyl-
v889	Glutamine, tris(trimethylsilyl)-
v890	Glycine, N-(1-oxo-2-butenyl)-, trimethylsilyl ester
v891	Glycine, N-(3-hydroxybenzoyl)-, bis(trimethylsilyl) deriv.
v892	Glycine, N-(tert-butyldimethylsilyl)-, tert-butyldimethylsilyl ester
v893	Glycine, N-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester

v894	Glycine, N,N'-1,2-ethanediylbis-
v895	Glycine, N,N-bis(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester
v896	Glycine, N-benzoyl-, trimethylsilyl ester
v897	Glycol, 1,2-dimyrtenyl-bis-O-trimethylsilyl-
v898	Glycoside, .alpha.-methyl-trtrakis-O-(trimethylsilyl)-
v899	Glycylglycine, tetrakis(trimethylsilyl)-
v900	Glyoxylic acid, di-TMS
v901	Glyoxylic oxime acid, bis(trimethylsilyl)-
v902	Gulonic acid, 2,3,5,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-, lactone
v903	Gulonolactone tetra-TMS, xs
v904	Gulose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-
v905	Hafnium, bis(.eta.-5-t-butylcyclopentadienyl)(.eta.-4-2,3-dimethylbutadiene)
v906	Hafnium, bis[(1,2,3,4,5-.eta.)-1-(1,1-dimethylethyl)-2,4-cyclopentadien-1-yl][(1,2,3,4-.eta.)-2-methyl-1,3-butadiene]-
v907	Harmaline
v908	Heneicosane, 3-methyl-
v909	Heptadeca-7,10-dione
v910	Heptadecane, 3-methyl-
v911	Heptadecanoic acid, trimethylsilyl ester
v912	Heptanoic acid, 3-hydroxy-, methyl ester
v913	Heptanoic acid, 3-methylbutyl ester
v914	Heptanoic acid, heptyl ester
v915	Heptasiloxane, 1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13-tetradecamethyl-
v916	Heptasiloxane, hexadecamethyl-
v917	Hexacontane
v918	Hexadecane, 1,16-dichloro-
v919	Hexadecane, 2,6,10,14-tetramethyl-
v920	Hexadecane, 2-methyl-
v921	Hexadecane-1,2-diol
v922	Hexadecanoic acid, 2,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]propyl ester
v923	Hexadecanoic acid, butyl ester
v924	Hexadecanoic acid, trimethylsilyl ester
v925	Hexane, 2,5-bis[(trimethylsilyl)oxy]-
v926	Hexane, 2,5-dimethyl-2,5-bis(trimethylsilyloxy)-
v927	Hexanedioic acid, 2-trimethylsilyloxy-, bis(trimethylsilyl) ester
v928	Hexanedioic acid, bis(1-methylethyl) ester
v929	Hexanedioic acid, di-2-propenyl ester
v930	Hexanedioic acid, dicyclohexyl ester
v931	Hexanedioic acid, dipropyl ester
v932	Hexanedioyl dichloride
v933	Hexanoic acid, 10-undecen-1-yl ester
v934	Hexanoic acid, 2-cyano-, ethyl ester
v935	Hexanoic acid, butyl ester
v936	Hexanoic acid, propyl ester
v937	Hexanoic acid, trimethylsilyl ester
v938	Hexasiloxane, 1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11-dodecamethyl-
v939	Hexasiloxane, tetradecamethyl-
v940	Hexopyranose, 1,2,3,4,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-
v941	Hexythiazox
v942	Himachala-2,4-diene
v943	Hydrazinecarboxamide, 2-(1-phenylethylidene)-
v944	Hydrocinnamic acid, p-(trimethylsiloxy)-, trimethylsilyl ester
v945	Imidazol-1-yl-acetic acid, methyl ester
v946	Imidazole, 2-bromo-4-methyl-5-nitro-
v947	Imidazole, 4-bromo-1-methyl-5-nitro-
v948	Imidazole, 4-bromo-2-trifluoromethyl-
v949	Imidazole-4-carboxylic amide, 5-fluoro-1-.alpha.-ribofuranosyl-
v950	Indanone, 2-hydroxyimino-4,7-dimethyl-
v951	Indeno[5,4-d]pyrano[4,3-c]isobenzofuran, 11-acetoxy-1,3,4,4a,5,6,8,8a,8b,9,10,11,11a,12,13,13a-hexadecahydro-3-oxo-6,6,11a-trim
v952	Indole, 2-[(1,2-dimethyl-3-piperidyl)methyl]-
v953	Indole, 6-fluoro-2-hydroxy-5-methoxy-3-nitro-
v954	Inositol, 1,2,3,4,5,6-hexakis-O-(trimethylsilyl)-, cis-
v955	Inositol, 1,2,3,4,5,6-hexakis-O-(trimethylsilyl)-, epi-
v956	Inositol, 1,2,3,4,5,6-hexakis-O-(trimethylsilyl)-, scyllo-
v957	Iron, bis(.eta.4-1,3-butadiene)(triethylphosphine)-
v958	Isocitric lactone, bis(trimethylsilyl)-,
v959	Isoheptadecanol
v960	Isopropyl Palmitate
v961	Isoquinoline, decahydro-3-(2-chloroethyl)-2-phenylmethyl-
v962	l-Trimethylsiloxy-2-trimethylsilyl-aminoethane
v963	l-Alanine, N-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester
v964	L-Altrose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-
v965	l-Arabinose, di-O-phenylboranediyl-, di-n-octyl-dithioacetal
v966	L-Aspartic acid, N-(trimethylsilyl)-, bis(trimethylsilyl) ester
v967	Leucine di-TMS
v968	Levoglucosan, tri-TMS
v969	Linoleic acid TMS II
v970	Linolenic acid TMS
v971	L-Isoleucine, N-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester
v972	L-Leucine, N-(tert-butyldimethylsilyl)-, tert-butyldimethylsilyl ester
v973	L-Leucine, N-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester
v974	L-Lysine, N2,N6,N6-tris(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester
v975	L-Methionine, N-(1-methylethyl)-, 1-methylethyl ester

v976	L-Methionine, N-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester
v977	L-Norvaline, N-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester
v978	Longiborneol
v979	L-Ornithine, N2,N5,N5-tris(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester
v980	L-Phenylalanine, N-(tert-butyldimethylsilyl)-, tert-butyldimethylsilyl ester
v981	L-Proline, 1-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester
v982	L-Proline, 1-acetyl-
v983	L-Proline, 5-oxo-1-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester
v984	L-Serine, N,O-bis(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester
v985	L-Tryptophan, N-acetyl-N,1-dimethyl-, methyl ester
v986	L-Tyrosine, N-(trifluoroacetyl)-O-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester
v987	L-Tyrosine, N,O-bis(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester
v988	L-Valine, N-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester
v989	Lycorine, 1,2-epoxide
v990	Lyxose, tetra-TMS-ether
v991	Maleic acid, methyl-, dimethyl ester
v992	Maltose, octakis(trimethylsilyl)-
v993	Mandelic acid di(tert-butyldimethylsilyl)-
v994	Mandelic acid, ethyl ester, trimethylsilyl-
v995	Mannofuranoside, methyl 2,3,5,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-, .alpha.-D-
v996	Manno-lyxo-galacto-trisaccharide
v997	Mannoonic acid, 2,3,4,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-, lactone
v998	Mannoonic acid, 2,3,5,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-, lactone
v999	Mannose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, D-
v1000	Mannose, 6-deoxy-2,3,4,5-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-, L-
v1001	Melibiose, octakis(trimethylsilyl)-
v1002	Mercaptoacetic acid, bis(trimethylsilyl)-
v1003	Mesitol, .alpha.4-(4-hydroxy-2,3,5-trimethylphenyl)-
v1004	Methanamine, N,N-dimethyl-{4-[3-methyl-1-butenyl]-1H-3-indolyl}
v1005	Methane, oxybis[iodo]-
v1006	Methanesulphonothioic acid 1,5-pentanediyl ester
v1007	Methanone, bis[4-(diethylamino)phenyl]-
v1008	Methyl 2,4,6,7-tetra-O-acetyl-3-O-methyl-.beta.-glycero-D-glucoheptopyranoside
v1009	Methyl 3,4,6-tri-O-acetyl-2-O-methyl-.alpha.-D-mannopyranoside
v1010	Methyl 3,4,7-tri-O-acetyl-2,6-di-O-methyl-.beta.-glycero-d-glucoheptopyranoside
v1011	Methyl 3,4-di-O-acetyl-2,6,7-tri-O-methyl-.beta.-glycero-D-glucoheptopyranoside
v1012	Methyl 3,4-di-O-acetyl-2,6-di-O-methyl-.alpha.-D-mannopyranoside
v1013	Methyl 6,8-dioxononanoate
v1014	Methyl erythro-3-bromo-2,4-dichloro-butyrate
v1015	Methyliminodiacetic acid
v1016	Morpholine, 4-[1-(1-methylethyl)-1-propenyl]-
v1017	m-Trimethylsilyloxyphenyl(trimethylsilyloxy)trimethylsilylacrylate
v1018	Myo-Inositol, 1,2,3,4,5,6-hexakis-O-(trimethylsilyl)-
v1019	Myo-inositol, 5-deoxy-1,2,3,4,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-
v1020	Myristic acid, 2,3-bis(trimethylsiloxy)propyl ester
v1021	N Acetyl aspartic TMS
v1022	N(4)-Methyl-5-phenyl-2,4,6-pyrimidinetriamine
v1023	N'-(4-tert-Butylbenzylidene)-a-(2-chlorobenzamido)-4-(dimethylamino)cinnamohydrazide
v1024	N-(exo-Bicyclo(4.1.0)hept-3-en-7-yl)-N'-(2-methoxycarbonyl-thiophen-3-yl)urea
v1025	N-(n-Propyl)-1-phenylcyclohexylamine
v1026	N-(Trifluoracetyl)-O,O',O''-tris(trimethylsilyl)epinephrine
v1027	N,N-Diphenyl-2-(trimethylsilyl)-2,3-butadienamide
v1028	N,O,O-Tris(trimethylsilyl)-L-threonine
v1029	N,O-Bis(trimethylsilyl)-L-phenylalanine
v1030	Naphthalene, 1-ethoxy-
v1031	Naphthalene, 5-ethyl-1,2,3,4-tetrahydro-
v1032	Naphthalene, decahydro-4a-phenyl-, trans-
v1033	Naphtho[1,2-c]furan-1,3-dione
v1034	Neoisolongifolene, 8-bromo-
v1035	Neoisolongifolene, 8-chloro-
v1036	N-Ethyl-4-nitroaniline
v1037	N-Ethyl-5-propyl-5-nonanamine
v1038	N-Methyl-10-hydroxydecahydroquinoline
v1039	N-Methyl-N-cyclohexyl-2-[1-[2-quinolinyl]ethyl]hydrazinecarbothioamide
v1040	n-Octanoic acid, pentamethyldisilyl ester
v1041	Nonadecane, 2,6,10,14,18-pentamethyl-
v1042	Nonadecane, 2,6,10,14-tetramethyl-
v1043	Nonadecanoic acid, trimethylsilyl ester
v1044	Nonanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester
v1045	Nonanedioic acid, bis(tert-butyldimethylsilyl) ester
v1046	Nonanoic acid, trimethylsilyl ester
v1047	Nonylamine, 1-heptyl-N,N-dimethyl-
v1048	n-Pentadecanoic acid, trimethylsilyl ester
v1049	Octadec-9Z-enol TMS ether
v1050	Octadecane
v1051	Octadecane, 1-bromo-
v1052	Octadecane, 1-isocyanato-
v1053	Octadecanoic acid, 12-(trimethylsiloxy)-, trimethylsilyl ester
v1054	Octadecanoic acid, 2,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]propyl ester
v1055	Octadecanoic acid, 3-hydroxy-, methyl ester
v1056	Octadecanoic acid, tert-butyldimethylsilyl ester
v1057	Octadecanoic acid, trimethylsilyl ester

v1058	Octadecanol
v1059	Octane, 2-cyclohexyl-
v1060	Octanedioic acid, bis(trimethylsilyl) ester
v1061	Octanoic acid, trimethylsilyl ester
v1062	Octasiloxane, 1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13,15,15-hexadecamethyl-
v1063	O-Ethyl,S-(1-(2-methoxyphenyl)tetrazol-5-yl) monothiocarbonate
v1064	Oleic acid TMS
v1065	Oleic acid, trimethylsilyl ester
v1066	Oleic acid, trimethylsilyl ester II
v1067	Ornithine tri-TMS
v1068	Oxacyclododecan-2-one
v1069	Oxireno[2,3]azuleno[6,5-b]furan-4(1aH)-one, decahydro-7a-hydroxy-1a,7-dimethyl-3-methylene-, acetate, stereoisomer
v1070	Oxo-dihydrocaranine
v1071	Palmitelaidic acid, trimethylsilyl ester
v1072	Palmitol oxime
v1073	Parabanic acid, bis-O-(trimethylsilyl)-
v1074	Paraquat dichloride
v1075	Pentadecane, 2,6,10,13-tetramethyl-
v1076	Pentafluoropropionic acid
v1077	Pentamethylbenzaldehyde
v1078	Pentamethyldisilyloxymethylbenzene
v1079	Pentanedioic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-, bis(trimethylsilyl) ester
v1080	Pentanedioic acid, 3-(methoxymethoxy)-, dimethyl ester
v1081	Pentanedioic acid, 3-methyl-3-[(trimethylsilyl)oxy]-, bis(trimethylsilyl) ester
v1082	Pentanedioic acid, bis(trimethylsilyl) ester
v1083	Pentanoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester
v1084	Pentanoic acid, 2-methyl-2-propyl-
v1085	Pentanoic acid, 2-methyl-3-oxo-, ethyl ester
v1086	Pentanoic acid, 3-methyl-2-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester
v1087	Pentanoic acid, 4-methyl-2-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester
v1088	Pentanoic acid, 4-oxo-, trimethylsilyl ester
v1089	Pentanoic acid, 5-[bis(trimethylsilyl)amino]-, trimethylsilyl ester
v1090	Pentasiloxane, dodecamethyl-
v1091	Pentatriacontane, 13-docosenylidene-
v1092	Pentenoic acid, 4-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester
v1093	Pentitol, 3-desoxy-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
v1094	Per-O-trimethylsilyl-(3-O-.alpha.-d-mannopyranosyl-4-O-.beta.-d-glucopyranosyl-d-glucitol)
v1095	Per-O-trimethylsilyl-(3-O-.beta.-d-mannopyranosyl-d-glucitol)
v1096	Phenacetic acid, 2,5,.alpha.,.alpha.-tetramethyl-
v1097	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-
v1098	Phenol, 2,5-bis(1,1-dimethylethyl)-
v1099	Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-(1-methyl-1-phenylethyl)-
v1100	Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethyl-
v1101	Phenol, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-
v1102	Phenol, 4-propoxy-
v1103	Phenol, bis(1,1-dimethylethyl)-
v1104	Phensuximide
v1105	Phosphonic acid, (1,3-diaminopropyl)-, pentakis(trimethylsilyl) deriv.
v1106	Phosphonic acid, (1-aminopropyl)-, bis(trimethylsilyl) ester
v1107	Phosphonic acid, (phenylmethyl)-, bis(trimethylsilyl) ester
v1108	Phosphoramidic acid, diethyl ester
v1109	Phosphoric acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-1-[[(trimethylsilyl)oxy]methyl]ethyl ester
v1110	Phosphoric acid, 2-[bis(trimethylsilyl)amino]ethyl bis(trimethylsilyl) ester
v1111	Phosphoric acid, 2-isothiocyanatoethyl bis(trimethylsilyl) ester
v1112	Phosphoric acid, bis(trimethylsilyl) 2,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]propyl ester
v1113	Phosphoric acid, bis(trimethylsilyl)monomethyl ester
v1114	Phosphorochloridic acid, diethyl ester
v1115	Piperazine, 2,5-diketo-, bis(trimethylsilyl)-
v1116	Piperonyl butoxide
v1117	Pregn-5-en-11-one, 3,17,20-tris[(trimethylsilyl)oxy]-, (3.beta.,20R)-
v1118	Propane, 1,1,1,2-tetrachloro-
v1119	Propane, 1,1,3,3-tetrachloro-2-methyl-
v1120	Propane, 1,1,3,3-tetraethoxy-
v1121	Propane, 1,2,3-trichloro-2-methyl-
v1122	Propane, 2-methyl-1,2-bis(trimethylsiloxy)-
v1123	Propane, bromodichlorodifluoro-
v1124	Propanedioic acid, bis(trimethylsilyl) ester
v1125	Propanedioic acid, dimethyl-, bis(trimethylsilyl) ester
v1126	Propanedioic acid, methyl-, bis(trimethylsilyl) ester
v1127	Propanoic acid, 2,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester
v1128	Propanoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester
v1129	Propanoic acid, 2-methyl-2-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester
v1130	Propanoic acid, 2-methyl-3-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester
v1131	Propanoic acid, 3-(2-benzoyloxycyclopent-3-en-1-yl)-2-methyl-, methyl ester
v1132	Propanoic acid, 3-(2-propynyloxy)-, ethyl ester
v1133	Propanoic acid, 3-[(tert-butyldimethylsilyl)amino]-2-methyl-, tert-butyldimethylsilyl ester, (.+-.)-
v1134	Propanoic acid, 3-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester
v1135	Propanoic acid, 3-[bis(trimethylsilyl)amino]-2-methyl-, trimethylsilyl ester
v1136	Propionic acid, 3-(p-cyanobenzoyl)-2-methyl-
v1137	Propionic acid, pentafluoro-, triester with 2,2,3,3,3-pentafluoro-N-methyl-N-(.beta.,3,4-trihydroxyphenethyl)propionamide
v1138	Propyl Ethylphosphonofluoridate
v1139	Pyrazine, 2,3-dimethyl-5-(2-propenyl)-

v1140	Pyrazine, 3,6-dihydro-2,5-bis-O-trimethylsilyl-
v1141	Pyrazine, 3,6-dihydro-3,6-dimethyl-2,5-bis(trimethylsilyloxy)-
v1142	Pyridine, 1,2,3,6-tetrahydro-1,5-dimethyl-4-phenyl-
v1143	Pyridine, 2-(4-methyl-5-cis-phenyl-1,3-oxazolidin-2-yl)-
v1144	Pyridine, 2,3-dichloro-
v1145	Pyridine, 2,5-dichloro-
v1146	Pyridine, 2,6-dichloro-4-(4,5-dihydro-5-methyl-1H-pyrazol-1-yl)-
v1147	Pyridine, 3,5-dichloro-
v1148	Pyridine, 3-trimethylsiloxy-
v1149	Pyridine, 4-nitro-, 1-oxide
v1150	Pyrimidine, 2,4,6-tris[(trimethylsilyl)oxy]-
v1151	Pyrimidine, 2,4-bis[(trimethylsilyl)oxy]-
v1152	Pyrimidine, 2,4-bis[(trimethylsilyl)oxy]-5-[[(trimethylsilyl)oxy]methyl]-
v1153	Pyrimidine, 4,5-dimethyl-2,6-bis[(trimethylsilyl)oxy]-
v1154	Pyrimidine, 5-methyl-2,4-bis[(trimethylsilyl)oxy]-
v1155	Pyrimidine, 5-phenyl-2-carboxylic acid
v1156	Pyrrole-2-carboxylic acid, N-trimethylsilyl-, trimethylsilyl ester
v1157	Pyrylium, 2,4,6-triphenyl-, iodide
v1158	Quebrachamine
v1159	Quinoline, 1,2,3,4-tetrahydro-2-(1-methylimidazol-4-yl)-
v1160	Quinoline, 2-(1-methylethyl)-
v1161	Quinoline, 2,3,4-trimethyl-
v1162	Quinoline, decahydro-1,7-dimethyl-
v1163	Ribitol, 1,2,3,4,5-pentakis-O-(trimethylsilyl)-
v1164	Ribitol, 1,3:4,5-di-O-(ethylboranediyl)-2-deoxy-
v1165	Ribonic acid, 2,3,4,5-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester
v1166	Ricinoleic acid, trimethylsiloxy, trimethylsilyl ester
v1167	Sarcosine, N-(tert-butyldimethylsilyl)-, tert-butyldimethylsilyl ester
v1168	Selenourea, N,N-dimethyl-N'-phenyl-
v1169	Serine, bis(trimethylsilyl)-
v1170	Silacyclohexane, 1,1-dichloro-
v1171	Silacyclohexane, 1,1-dimethyl-
v1172	Silacyclopentane, 1,1-dichloro-
v1173	Silacycloundec-6-yne, 1,1-dimethyl-
v1174	Silanamine, 1,1,1-trimethyl-N-(trimethylsilyl)-N-[2-[(trimethylsilyl)oxy]ethyl]-
v1175	Silanamine, 1,1,1-trimethyl-N,N-bis[2-[(trimethylsilyl)oxy]ethyl]-
v1176	Silanamine, N,N'-methanetetraylbis[1,1,1-trimethyl-
v1177	Silanamine, N-[2-[2-methoxy-4-[(trimethylsilyl)oxy]phenyl]ethyl]-1,1,1-trimethyl-
v1178	Silane, (1,4-dioxan-2-yloxy)trimethyl-
v1179	Silane, (1-cyclohexen-1-yloxy)trimethyl-
v1180	Silane, (3-bromopropoxy)trimethyl-
v1181	Silane, (cyclohexyloxy)trimethyl-
v1182	Silane, (dodecyloxy)trimethyl-
v1183	Silane, (hexadecyloxy)trimethyl-
v1184	Silane, [(1-methyl-1,3-propanediyl)bis(oxy)]bis[trimethyl-
v1185	Silane, [(2-ethylhexyl)oxy]trimethyl-
v1186	Silane, [(6-chlorohexyl)oxy]trimethyl-
v1187	Silane, [(dimethylsilyl)methyl]trimethyl-
v1188	Silane, [[4-[1,2-bis[(trimethylsilyl)oxy]ethyl]-1,2-phenylene]bis(oxy)]bis[trimethyl-
v1189	Silane, [1-(5-ethenyltetrahydro-5-methyl-2-furanyl)-1-methylethoxy]trimethyl-, trans-
v1190	Silane, [1,2,3-benzenetriyltris(oxy)]tris[trimethyl-
v1191	Silane, [1,3-cyclohexanediylbis(oxy)]bis[trimethyl-
v1192	Silane, [1,4-dioxane-2,3-diylbis(oxy)]bis[trimethyl-, cis-
v1193	Silane, [1,4-phenylenebis(oxy)]bis[trimethyl-
v1194	Silane, [1-[(trimethylsilyl)oxy]butylidene]bis[trimethyl-
v1195	Silane, [2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]trimethyl-
v1196	Silane, [2-(cyclohexyloxy)ethoxy]trimethyl-
v1197	Silane, [2-(cyclopentyloxy)ethoxy]trimethyl-
v1198	Silane, 1,2-ethynediylbis[trimethyl-
v1199	Silane, 1,3,5-benzenetriyltris[trimethyl-
v1200	Silane, 1,6-heptadiyne-1,7-diylbis[trimethyl-
v1201	Silane, 1,8-octanediylbis[trimethyl-
v1202	Silane, bromotriethyl-
v1203	Silane, dichloro(2-chloroethyl)methyl-
v1204	Silane, dichloro(2-methoxyethyl)methyl-
v1205	Silane, dichloro(chloromethyl)methyl-
v1206	Silane, dichloromethyl[3-[1,2,2,2-tetrafluoro-1-(trifluoromethyl)ethoxy]propyl]-
v1207	Silane, methyltripropyl-
v1208	Silane, trimethyl(3-methylphenoxy)-
v1209	Silane, trimethyl(4-methylphenoxy)-
v1210	Silane, trimethyl[1-methyl-2-oxo-2-(trimethylsilyl)ethoxy]-, (R)-
v1211	Silane, trimethyl[2-(1-methylethoxy)ethoxy]-
v1212	Silane, trimethyl[4-(trimethylsilyl)butoxy]-
v1213	Silane, trimethylphenoxy-
v1214	Silanol, trimethyl-, 2-aminobenzoate
v1215	Silanol, trimethyl-, carbonate (2:1)
v1216	Silanol, trimethyl-, phosphate (3:1)
v1217	S-Indacene-1,7-dione, 2,3,5,6-tetrahydro-3,3,4,5,5,8-hexamethyl-
v1218	Spermine
v1219	Spiro(1,3-benzodioxole)-2,1'-cyclohexan-4'-one
v1220	Spiro(benzofuran-2(3H),1'-cyclohexane)
v1221	Spiro(tricyclo[6.2.1.0(2,7)]undeca-2,4,6-triene)-7,1'-cyclopropane

v1222	Spiro-2'(bicyclo[2.2.1]hept-5-ene)-5-(1,3-dioxan-4-one), 2-t-butyl-6-methyl-, (2R,6R)-
v1223	Squalane
v1224	Succinic acid, 2,3-bis(trimethylsiloxy)-, bis(trimethylsilyl) ester
v1225	Succinyl lactate di-TMS
v1226	Sulfone, 2-chlorooctyl phenyl
v1227	syn-Tricyclo[5.1.0.0(2,4)]oct-5-ene, 3,3,5,6,8,8-hexamethyl-
v1228	t-Butyl(4,5-dihydrofuran-2-yl)dimethylsilane
v1229	Terbucarb
v1230	Terbutryn
v1231	Tetrabutylammonium ethylphosphite, dimer
v1232	Tetracosamethyl-cyclododecasiloxane
v1233	Tetracyclo[6.2.1.1(3,6).0(2,7)]dodeca-4,9-diene, 11-isopropylidene-
v1234	Tetracyclo[6.2.2.2(4,10).0(4,9)]tetradecan-2-one, 10,12-dihydroxy-1,3,7,8-tetramethyl-
v1235	Tetradecane, 1-chloro-
v1236	Tetradecanoic acid, tetradecyl ester
v1237	Tetradecanoic acid, trimethylsilyl ester
v1238	Tetrapentacontane
v1239	Tetrapentacontane, 1,54-dibromo-
v1240	Tetrasiloxane, decamethyl-
v1241	Tetratetracontane
v1242	Thiazole, 4-butyl-2-methyl-
v1243	Thiazolo[5,4-d]pyrimidine, 5-chloro-
v1244	Thiochroman-4-ol
v1245	Thiolactomycin
v1246	Thionaphthene, 2-[1-(1-pyrrolidyl)cycloheptyl]-
v1247	Thiophene, 2,3,4-trimethyl-
v1248	Thiophene, 3,3'-(1,2-ethenediyl)bis-
v1249	Thiophene, 3,4-bis(ethoxymethyl)-
v1250	Thiosalicylic acid, O,S-di-trimethylsilyl-
v1251	Thiourea, N,N'-diphenyl-
v1252	Threitol, 1,2,3,4-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-, D-
v1253	threo-7,8-Bromochlorodisparlure
v1254	Thymol-.beta.-d-glucopyranoside, tetra(trimethylsilyl)-
v1255	Titanium, (.eta.8-1,3,5,7-cyclooctatetraene)(.eta.5-2,4-cyclopentadien-1-yl)-
v1256	trans-2,3-Methylenedioxy-b-methyl-b-nitrostyrene
v1257	Tricosane-1,15-diol, di-TMS
v1258	Tricyclo[3.2.1.0(2,4)]oct-6-ene, 2-[2-(phenylthio)ethyl]-
v1259	Tricyclo[4.2.1.1(2,5)]dec-3-en-9-one
v1260	Tricyclo[4.2.2.0(2,5)]dec-7-ene, 7-butyl-
v1261	Tridecane, 1-bromo-
v1262	Triethylamine, 2,2',2''-tris(trimethylsiloxy)-
v1263	Trimethyl(2-methyl-1-propenyl)silane
v1264	Trimethylsilyl acetylsalicylate
v1265	Trimethylsilyl ether of glucitol
v1266	Trimethylsilyl ether of glycerol
v1267	Triolein
v1268	Tris(trimethylsilyl)borate
v1269	Trisiloxane, 1,1,1,5,5,5-hexamethyl-3,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]-
v1270	Trisiloxane, octamethyl-
v1271	Tungsten, tris(.pi.-allyl)(1,3-dimethylallyl)-
v1272	Tyrosine, O-trimethylsilyl-, trimethylsilyl ester
v1273	Uracil, 1,3-bis(trimethylsilyl)-
v1274	Urea tri-TMS
v1275	Urea, N,N'-bis(trimethylsilyl)-
v1276	Uridine
v1277	Uridine, 3'-O-methyl-
v1278	Urocanic acid di-TMS
v1279	Valeric acid, 2-cyano-2-ethyl-3-methyl-, ethyl ester
v1280	Vanadium, (cyclopentadienyl)-(cyclopentenocyclopentadienyl)-
v1281	Vitamin A aldehyde
v1282	Vitamin E acetate
v1283	Xanthine, 9-phenyl-
v1284	Xylitol, 1,2,3,4,5-pentakis-O-(trimethylsilyl)-
v1285	Xylonic acid, 2,3,4-tris-O-(trimethylsilyl)-, .delta.-lactone, D-
v1286	Xylopyranose, 3-O-methyl-1,2,4-tris-O-(trimethylsilyl)-
v1287	Xylulose tetra-TMS
v1288	Z-3-Tetradecen-1-ol acetate
v1289	Z-5-Nonadecene
v1290	Z-7-Hexadecenal
v1291	Z-9-Pentadecenol
v1292	Z-9-Tetradecenal

ANEXO E - Tabelas Completas

Tabela: média, mediana e desvio padrão dos metabólitos não exclusivos no GI e GII seguido do p-valor do teste de mann-withney - saliva

Metabólito	Grupo						p-valor
	I			II			
	Média	Mediana	DP	Média	Mediana	DP	
N,O-Bis(trimethylsilyl)-L-phenylalanine	4,13	4,06	1,34	3,31	3,53	1,49	0,0343
Disiloxane, triethyltrimethyl-	4,42	3,96	1,71	5,76	5,19	2,15	0,0380
1-(4-Isopropylphenyl)-3-(2-furyl)propane	3,72	3,98	1,11	2,96	3,59	1,57	0,0509
3,5-Disilaheptane, 3,3,5,5-tetramethyl-	3,42	3,96	1,40	3,08	3,78	1,60	0,1239
N,O,O-Tris(trimethylsilyl)-L-threonine	3,86	4,45	2,15	3,56	3,89	1,51	0,1700
L-Serine, N,O-bis(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester	3,89	4,06	1,12	3,69	3,84	1,17	0,1710
5-Phenyl-piperonylic acid	3,40	3,82	1,41	2,98	3,46	1,58	0,2123
.beta.-D-Xylopyranose, 1,2,3,4-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-	4,31	3,90	1,92	3,47	3,66	2,12	0,2535
3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionic acid	3,49	3,85	1,50	2,82	3,74	1,78	0,2608
Benzene, 1,2,3-trimethyl-	5,59	6,61	2,46	5,10	5,71	2,20	0,2622
3,6-Dioxa-2,7-disilaoctane, 2,2,4,7,7-pentamethyl-	4,35	3,26	3,24	4,13	3,19	2,64	0,2800
Cyclohexanol, TMS derivative	3,36	3,77	1,84	2,87	3,65	1,83	0,3371
5-Pyrimidinamine, 2-chloro-4-ethoxy-	3,17	3,51	1,33	2,62	3,37	1,66	0,4166
L-Proline, 1-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester	6,17	7,48	2,47	5,68	6,08	2,76	0,4304
1-Nonadecene	4,44	4,27	0,66	4,71	4,38	0,93	0,4807
L-Leucine, N-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester	3,68	3,87	1,60	3,37	3,72	1,88	0,4927
2,6-Octadiene, 3,7-dimethyl-1-(hydroxydimethylsilyl)-1-(trimethylsilyl)-	2,58	3,07	2,64	3,30	3,43	2,44	0,5561
Butanoic acid, 3-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester	2,52	3,37	1,62	2,71	3,38	1,78	0,5576
Silanol, trimethyl-, phosphate (3:1)	5,12	5,18	1,03	5,44	5,33	1,50	0,5614
Urea, N,N'-bis(trimethylsilyl)-	8,93	8,55	3,05	9,72	9,09	3,71	0,5614
Tetrasiloxane, decamethyl-	4,69	4,35	1,82	5,22	5,37	1,43	0,5614
Acetic acid, [(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester	3,50	3,29	2,09	2,88	3,28	1,20	0,5750
Myo-Inositol, 1,2,3,4,5,6-hexakis-O-(trimethylsilyl)-	3,51	3,52	0,35	3,18	3,52	1,31	0,5752
Glycine, N-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester	7,59	7,93	4,04	6,91	7,44	2,94	0,5755
(R,S)-5-Ethyl-6-methyl-3E-hepten-2-one	3,58	3,37	0,70	3,33	3,26	1,12	0,6185
Cyclopentane, 1,2-dipropyl-	2,58	3,72	2,24	3,26	3,65	1,91	0,7050
L-Proline, 5-oxo-1-(trimethylsilyl)-,	3,64	3,50	0,53	3,57	3,52	0,41	0,7243

trimethylsilyl ester							
Propanoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester	11,45	10,35	4,68	11,37	11,05	2,28	0,7244
Dihydrocoumarin, 4,4,5,7,8-pentamethyl	2,53	3,14	1,32	2,52	3,10	1,31	0,7389
Hexadecanoic acid, trimethylsilyl ester	2,86	2,83	0,23	2,83	2,84	0,09	0,7397
1,3,5-Triazine, 2,4,6-tris[(trimethylsilyl)oxy]-	2,95	3,09	0,84	3,15	3,14	0,21	0,7397
Trimethylsilyl ether of glycerol	8,38	8,32	2,67	8,07	8,35	3,20	0,7874
l-Alanine, N-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester	8,60	9,84	4,10	8,45	8,96	3,09	0,8035
Phosphoric acid, bis(trimethylsilyl) 2,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]propyl ester	3,91	4,26	1,52	3,75	4,18	1,82	0,8356
Octadecanoic acid, trimethylsilyl ester	2,86	2,81	0,18	2,84	2,81	0,13	0,8844
Tyrosine, O-trimethylsilyl-, trimethylsilyl ester	3,27	3,61	0,95	3,28	3,49	0,96	0,9009
Benzonitrile, 4-(2-methyl-1,3-dioxolan-2-yl)-	7,08	6,56	2,41	7,33	6,83	2,79	0,9010
l-Trimethylsiloxy-2-trimethylsilyl-aminoethane	6,68	7,37	2,17	7,12	6,56	2,51	0,9010
3-Methyl-1,3-bis(trimethylsilyloxy)butane	2,93	3,66	2,42	3,08	3,62	2,18	0,9665
Silanamine, 1,1,1-trimethyl-N-(trimethylsilyl)-N-[2-[(trimethylsilyl)oxy]ethyl]-	4,43	4,16	0,91	4,37	4,15	1,68	0,9669
Tetradecanoic acid, trimethylsilyl ester	3,64	3,63	1,08	3,34	3,78	1,41	0,9669
Pentanoic acid, 5-[bis(trimethylsilyl)amino]-, trimethylsilyl ester	3,11	3,45	1,32	3,10	3,48	2,55	1,0000

Tabela: média, mediana e desvio padrão dos metabólitos não exclusivos no GI e GIII seguido do p-valor do teste de mann-withney - saliva

Metabólito	Grupo						p-valor
	I			III			
	Média	Mediana	DP	Média	Mediana	DP	
(R,S)-5-Ethyl-6-methyl-3E-hepten-2-one	3,58	3,37	0,7	0,14	0,12	0,1	<.0001
Silanamine, 1,1,1-trimethyl-N-(trimethylsilyl)-N-[2-[(trimethylsilyl)oxy]ethyl]-	4,43	4,16	0,91	0,3	0,32	0,12	<.0001
Glycine, N-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester	7,59	7,93	4,04	0,81	0,39	0,95	<.0001
l-Trimethylsiloxy-2-trimethylsilyl-aminoethane	6,68	7,37	2,17	0,57	0,42	0,49	<.0001
l-Alanine, N-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester	8,6	9,84	4,1	0,36	0,3	0,3	<.0001
1-Nonadecene	4,44	4,27	0,66	0,14	0,13	0,1	<.0001
Trimethylsilyl ether of glycerol	8,38	8,32	2,67	0,75	0,24	1,92	<.0001
L-Proline, 5-oxo-1-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester	3,64	3,5	0,53	0,2	0,18	0,26	<.0001
Tetradecanoic acid, trimethylsilyl ester	3,64	3,63	1,08	0,17	0,21	0,14	<.0001
L-Serine, N,O-bis(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester	3,89	4,06	1,12	0,1	0,06	0,11	<.0001
Tyrosine, O-trimethylsilyl-, trimethylsilyl ester	3,27	3,61	0,95	0,17	0,11	0,19	<.0001
Tetrasiloxane, decamethyl-	4,69	4,35	1,82	0,2	0,16	0,26	<.0001
Disiloxane, triethyltrimethyl-	4,42	3,96	1,71	0,37	0,5	0,36	<.0001
1-(4-Isopropylphenyl)-3-(2-furyl)propane	3,72	3,98	1,11	0,42	0,54	0,43	<.0001
N,O-Bis(trimethylsilyl)-L-phenylalanine	4,13	4,06	1,34	0,13	0,03	0,2	<.0001
3,5-Disilaheptane, 3,3,5,5-tetramethyl-	3,42	3,96	1,4	0,07	0,03	0,09	0,0002
5-Phenyl-piperonylic acid	3,4	3,82	1,41	0,33	0,06	0,4	0,0002
Benzene, 1,2,3-trimethyl-	5,59	6,61	2,46	0,19	0,1	0,21	0,0002
Pentanoic acid, 5-[bis(trimethylsilyl)amino]-, trimethylsilyl ester	3,11	3,45	1,32	0,23	0,17	0,26	0,0003
L-Leucine, N-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester	3,68	3,87	1,6	0,36	0,34	0,34	0,0004
Acetic acid, [(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester	3,5	3,29	2,09	0,08	0,06	0,07	0,0004
3,6-Dioxa-2,7-disilaoctane, 2,2,4,7,7-pentamethyl-	4,35	3,26	3,24	0,37	0,19	0,47	0,0005
L-Proline, 1-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester	6,17	7,48	2,47	1,46	0,89	2,46	0,0005
Hexadecanoic acid, trimethylsilyl ester	2,86	2,83	0,23	1,5	1,68	1,17	0,0007
Silanol, trimethyl-, phosphate (3:1)	5,12	5,18	1,03	10,03	8,19	5,46	0,0021

Butanoic acid, 3-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester	2,52	3,37	1,62	0,07	0,05	0,09	0,0091
Propanoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester	11,45	10,35	4,68	5,96	3,77	6,15	0,0101
D-Galactose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-	2,67	3,25	2,48	0,12	0,04	0,16	0,0481
Benzonitrile, 4-(2-methyl-1,3-dioxolan-2-yl)-	7,08	6,56	2,41	4,87	2,27	5,02	0,0619
3-Methyl-1,3-bis(trimethylsilyloxy)butane	2,93	3,66	2,42	0,1	0,09	0,09	0,0624
1,3,5-Triazine, 2,4,6-tris[(trimethylsilyl)oxy]-	2,95	3,09	0,84	11,91	8,87	13,08	0,0926
Pentasiloxane, dodecamethyl-	3,07	3,63	2,58	0,18	0,14	0,13	0,0998
.beta.-L-Mannopyranose, 6-deoxy-1,2,3,4-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-	2,39	3,53	2,04	0,47	0,33	0,54	0,1924
Urea, N,N'-bis(trimethylsilyl)-	8,93	8,55	3,05	9,02	5,67	7,7	0,5201
Octadecanoic acid, trimethylsilyl ester	2,86	2,81	0,18	2,79	2,8	2,08	1,0000

ANEXO F - Tabelas de Metabólitos exclusivos dos Grupos

Tabela de Metabólitos exclusivos do grupo SD-DP

Metabólito	N	% amostra
1-Cyclohexene-1-carboxylic acid	3	20%
2,3-Quinoxalinedicarboxaldehyde	2	13%
3,6,10-Trioxa-2,11-disiladodecane, 2,2,11,11-tetramethyl-	2	13%
3-Octadecene, (E)-	2	13%
Cytidine, 2'-deoxy-	2	13%
Glucopyranose, 4-O-[2,3,4,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-.beta.-d-glucopyranosyl]-1,2,3,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-, d-	2	13%
Melibiose, octakis(trimethylsilyl)-	2	13%
Z-5-Nonadecene	2	13%
.beta.-D-Galactopyranoside, methyl 2,3,4,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-	2	13%
.beta.-D-Mannopyranoside, methyl 2,3,4,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-	2	13%
.gamma.-Amino butyric acid di-TMS	2	13%
[1,2,4]Oxadiazin-6-one, 4,5-dihydro-5-(1-methylpropyl)-3-phenyl-	2	13%
1,10-Dimethyl-4,7,13-trioxa-1,10-diazacyclopentadecane	2	13%
1,3,4,6-Hexanetetrone, 1,6-diphenyl-	1	7%
1,3-Dimethyl-5-pentamethyldisilyloxycyclohexane	1	7%
1,4-Eicosanediol	1	7%
1,5-Cyclododecadien-9-yne, 2,5-dibromo-, (E,E)-	1	7%
1,7,7-Trimethyl-2-vinylbicyclo[2.2.1]hept-2-ene	1	7%
1-Hydroxy-6-(4'-chlorobenzyl)-1,2,3,4,5,6-hexamethylcyclohexa-2,4-diene	1	7%
1-Methyl-2-pentamethyldisilyloxycyclohexane	1	7%
1-Methyl-4-azafluorenone, 2-methylphenylimine	1	7%
1-Propene, 3-[(4-nitrobutyl)thio]-	1	7%
2-Amino-2-oxo-acetic acid, N-[3,4-dimethylphenyl]-, ethyl ester	1	7%
2-Hydroxy-3,5-diethyl-5-methylcyclopent-2-en-1-one	1	7%
3-(3-Amino-4-methyl-phenyl)-3,4,4-trimethyl-cyclopentanone	1	7%
3,4-Dimethyl-1-pentamethyldisilyloxycyclohexane	1	7%
3-[(E)-2-Chloro-1-methyl-1-butenyl]-3-methyl-1,2,4-trioxolane	1	7%
3-Cyclobutene-1,2-dione, 3-phenyl-	1	7%
3-Methoxy-N-methylsulfonylbenzenecarboximidamide	1	7%
3-Methylene-1,4-bis(trimethylsilyloxy) butane	1	7%
3-Penten-2-one, 3,4-dimethyl-, semicarbazone	1	7%
3-Trifluoromethylpyridine	1	7%
4-(Benzoylmethyl)-2H-1,4-benzoxazin-3-one	1	7%
4-Acetyl-4-phenylpiperidine	1	7%
4-Cyclopentene-1,3-dione, 4-methoxy-5-methyl-	1	7%
4-Pyrimidinecarboxaldehyde, 2,6-bis[(trimethylsilyl)oxy]-	1	7%
5,7-Dioxacycloheptaldoxime, 2,3-dehydro-3-nitro-	1	7%
6,9-Epoxy-2H,6H-pyrimido[2,1-b][1,3]oxazocin-2-one, 7,8,9,10-tetrahydro-7,8-dihydroxy-, [6R-(6.alpha.,7.alpha.,8.alpha.,9.alpha	1	7%
6-Dimethyl(trimethylsilyl)silyloxytetradecane	1	7%
Acetic acid, 3,7,11,15-tetramethyl-hexadecyl ester	1	7%
Butane, 1,4-dichloro-2,3-bis(trimethylsiloxy)-	1	7%
Butanedioic acid, [(trimethylsilyl)oxy]-, bis(trimethylsilyl) ester	1	7%
Citric acid monohydrate	1	7%
Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-	1	7%
Cyclopentadecanone, 2-hydroxy-	1	7%
Cyclotetrasiloxane, octamethyl-	1	7%
Cycloundecanone	1	7%
D-Altrose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-	1	7%
Decanoic acid, 10-fluoro-, trimethylsilyl ester	1	7%
Dibenz[a,c]cycloheptane, 1,2,9-trimethoxy-	1	7%

Dicinnamamide, (E)-	1	7%
Diftalone	1	7%
D-Ribonic acid, 2-C-methyl-2,3,5-tris-O-(trimethylsilyl)-, .gamma.-lactone	1	7%
Ethyl 4-cyanobenzoate	1	7%
Fumaric acid, (1-buten-4-yl) ethyl ester	1	7%
Gulose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-	1	7%
Hexanoic acid, 2-cyano-, ethyl ester	1	7%
Isocitric lactone, bis(trimethylsilyl)-,	1	7%
Mannoonic acid, 2,3,4,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-, lactone	1	7%
Methyliminodiacetic acid	1	7%
N-Methyl-10-hydroxydecahydroquinoline	1	7%
Octadecanol	1	7%
Octanoic acid, trimethylsilyl ester	1	7%
Oxacyclododecan-2-one	1	7%
Pentenoic acid, 4-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester	1	7%
Per-O-trimethylsilyl-(3-O-.alpha.-d-mannopyranosyl-4-O-.beta.-d-glucopyranosyl-d-glucitol)	1	7%
Phenol, bis(1,1-dimethylethyl)-	1	7%
Propanoic acid, 3-[(tert-butyldimethylsilyl)amino]-2-methyl-, tert-butyldimethylsilyl ester, (.+-.)-	1	7%
Silane, (1,4-dioxan-2-yloxy)trimethyl-	1	7%
Spermine	1	7%
Thiazole, 4-butyl-2-methyl-	1	7%
Triethylamine, 2,2',2''-tris(trimethylsiloxy)-	1	7%

Tabela de Metabólitos exclusivos do grupo SD+DP

Metabólito	**N**	**% amostra**
2H-Isoindole-2-acetic acid, 1,3-dihydro-.alpha.-methyl-1,3-dioxo-	3	20%
1,11,11-Trimethyl-3-azatricyclo[6.2.1.0(2,7)]undeca-2,4,6-triene	3	20%
Eicosanoic acid, 2,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]propyl ester	2	13%
Propionic acid, 3-(p-cyanobenzoyl)-2-methyl-	2	13%
Silane, dichloro(chloromethyl)methyl-	2	13%
.alpha.-d-Xylopyranoside, 2,4-O-(ethylboranediyl)-1-O-methyl-	2	13%
.alpha.-l-Mannopyranoside, methyl 6-deoxy-2,3,4-tris-O-(trimethylsilyl)-	1	7%
.beta.-Amino isobutyric acid di-TMS	1	7%
1,1,1,5,7,7,7-Heptamethyl-3,3-bis(trimethylsiloxy)tetrasiloxane	1	7%
1,3,5-Cycloheptatriene, 2,5-diethyl-7,7-dimethyl-	1	7%
1,3-Bis(dimethyl-n-pentylsilyl)propene	1	7%
11-(Trimethylsilylmethyl)dimethylsilyloxy-1-undecene	1	7%
1-Acetyl-3-(4-pyridyl)-pyrazoline	1	7%
1-Pentamethyldisilyloxy-3-phenylprop-2-ene	1	7%
1-t-Butyl-2-methylaziridine-2-carbothioic acid, S-phenyl ester	1	7%
2-(2,2-Dimethyl-propionyl)-5,5-dimethyl-cyclohexanone	1	7%
2-[(Ethylamino)methyl]indole	1	7%
2-Fluoroimidazole-4-carboxylic acid, methyl(ester)	1	7%
2H-Quinolizine-1-methanol, octahydro-, (1R-trans)-	1	7%
2-Piperidone, 1-(trimethylsilyl)-3-[(trimethylsilyl)amino]-	1	7%
2-Propenoic acid, 2-methyl-3,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester	1	7%
2-Thiazolidinimine, 3-methyl-	1	7%
3,5-Dodecadiyne, 2-methyl-	1	7%
3,6,12-Trimethyl-1,4,7,10,13,16-hexaaza-cyclooctadecane-2,5,8,11,14,17-hexaone	1	7%
3,6,6-Trimethylundecane-2,5,10-trione	1	7%
3,6,9,12-Tetraoxa-2,13-disilatetradecane, 2,2,13,13-tetramethyl-	1	7%
3-Heptyne, 7-fluoro-2,2-dimethyl-	1	7%
4-Decenoic acid, methyl ester	1	7%
4-Fluoroimidazole-5-[1,1-dimethylbutyric acid amide]	1	7%
4H-Pyrido[1,2-a]pyrimidin-4-one, 3-ethyl-6-methyl-	1	7%

5-Ethyl-8-(trimethylsilylmethyl)dimethylsilyloxydecane	1	7%
7,9-Diethyl-2,4-bis(dimethylamino)-10-imino-8-thio-1,7,9-triazaspiro[4.5]-1,3-decadiene-6,8-dione	1	7%
Acetic acid, 2-(2,2,6-trimethyl-7-oxa-bicyclo[4.1.0]hept-1-yl)-propenyl ester	1	7%
Arabinitol, pentakis-O-(trimethylsilyl)-	1	7%
Benzenepropanoic acid, .beta.-[(tert-butyldimethylsilyl)oxy]-, tert-butyldimethylsilyl ester	1	7%
Benzonitrile, N-oxide	1	7%
Butanoic acid, 4-[(tert-butyldimethylsilyl)amino]-, tert-butyldimethylsilyl ester	1	7%
Citric Acid	1	7%
Cyclobutene, 3,4-dibromo-	1	7%
Cyclopentane, 1-pentyl-2-propyl-	1	7%
D-Fructose, 3-O-[2,3,4,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-.alpha.-D-glucopyranosyl]-1,4,5,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-	1	7%
D-Glucose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-	1	7%
Dimepiperate	1	7%
Erythro-Pentonic acid, 2-deoxy-3,4,5-tris-O-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester	1	7%
Ethanone, 1-[3-(1,1-dimethylethoxy)-2-thienyl]-	1	7%
Ethyl trnas-2-triethylsilyl-cyclopropane-1-carboxylate	1	7%
Germane, tetrapentyl-	1	7%
Glucofuranoside, methyl 2,3,5,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-, .alpha.-D-	1	7%
Hexadecane-1,2-diol	1	7%
Hexane, 2,5-dimethyl-2,5-bis(trimethylsilyloxy)-	1	7%
Hexanedioic acid, dicyclohexyl ester	1	7%
Indanone, 2-hydroxyimino-4,7-dimethyl-	1	7%
Lyxose, tetra-TMS-ether	1	7%
Mandelic acid, ethyl ester, trimethylsilyl-	1	7%
N,N-Diphenyl-2-(trimethylsilyl)-2,3-butadienamide	1	7%
N-Ethyl-4-nitroaniline	1	7%
Pentanedioic acid, bis(trimethylsilyl) ester	1	7%
Phenol, 4-propoxy-	1	7%
Phosphoric acid, 2-[bis(trimethylsilyl)amino]ethyl bis(trimethylsilyl) ester	1	7%
Propanoic acid, 3-(2-benzoyloxycyclopent-3-en-1-yl)-2-methyl-, methyl ester	1	7%
Silanamine, N-[2-[2-methoxy-4-[(trimethylsilyl)oxy]phenyl]ethyl]-1,1,1-trimethyl-	1	7%
Thiophene, 2,3,4-trimethyl-	1	7%
Xylopyranose, 3-O-methyl-1,2,4-tris-O-(trimethylsilyl)-	1	7%
Z-9-Pentadecenol	1	7%

Tabela de Metabólitos exclusivos do grupo C-DP

Metabólito	**N**	**% amostra**
Estra-1,3,5(10)-trien-6-one, 3,17-bis(acetyloxy)-2-methoxy-, (17.beta.)-	4	27%
Octasiloxane, 1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13,15,15-hexadecamethyl-	4	27%
.beta.-L-Galactopyranose, 6-deoxy-1,2,3,4-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-	4	27%
1,2-Bis(trimethylsiloxy)ethane	4	27%
1-Dimethyl(trimethylsilylmethyl)silyloxycyclohexane	3	20%
2-(p-Chlorophenyl)-3-methyl-3-(p-chlorophenylazo)butanoic acid	3	20%
2H-1-Benzopyran-2-one, 3,5,7-trihydroxy-	3	20%
3,12-Dibora-2,4,11,13-tetraoxatricyclo[12.4.0.0(5,10)]octadecane, 3,12-diethyl-	3	20%
4H-Benzo[def]carbazole	3	20%
8-Isopropenyl-1,3,3,7-tetramethyl-bicyclo[5.1.0]oct-5-en-2-one	3	20%
Benzenesulfonamide, 4-(dimethylamino)-N,N-dimethyl-	3	20%
Bis(dimethyl-t-butylsilyl) maleate	3	20%
Butyric acid, 3-hydroxy-, monoanhydride with 1-butaneboronic acid, cyclic ester	3	20%
Hexadecane, 2,6,10,14-tetramethyl-	3	20%
Phenol, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-	3	20%
(3-Methoxyphenyl)naphthalen-1-yldiazene	3	20%
.alpha.-D-Galactofuranose, 1,2,3,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-	3	13%

.alpha.-D-Xylofuranose, cyclic 1,2:3,5-bis(butylboronate)	2	13%
.beta.-D-Glucopyranose, 3-O-methyl-1,2,4,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-	2	13%
1,2-Bis(trimethylsiloxy)cyclohexene	2	13%
1H-Indole, 1-(trimethysilyl)-2,5-bis[(trimethylsilyl)oxy]-	2	13%
1-Isovaleryl-6-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline	2	13%
1-Methyl-trans-decahydroquinol-5(axial)-ol	2	13%
1-Octadecene	2	13%
2,2,3-Tricarbomethoxyaziridine	2	13%
2,3-Dioxabicyclo[2.2.1]heptane, 1-phenyl-	2	13%
2,4-Dicarbaheptaborane(7), 2,4-dimethyl-	2	13%
2-Methyl-1,3-bis(trimethylsilyloxy)butane	2	13%
2-t-Butyl-5-chloromethyl-3-methyl-4-oxoimidazolidine-1-carboxylic acid, t-butyl ester	2	13%
3-(3,6-Dimethyl-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)-3-hydroxy-3H-isobenzofuran-1-one	2	13%
3-Azabicyclo[7.3.1]-1(13),9,11-tridecatriene, 3,13-dimethyl-	2	13%
4-(1'-Pyperidinocarbonylpropyl)-2-methylpyridine	2	13%
4-(Trimethylsilyl)morpholine	2	13%
4-Pentenoic acid, 4-methoxycarbonyl-, isopropyl ester	2	13%
Acetic acid, 2-(7-hydroxy-2,2,7-trimethyltetrahydro-[1,3]dioxolo[4,5-c]pyran-4-yl)ethyl ester	2	13%
Anthranilic acid, N-methyl-, butyl ester	2	13%
Benzeneacetic acid, trimethylsilyl ester	2	13%
Benzenemethanol, ar,ar,.alpha.-trimethyl-	2	13%
Benzylamine, .alpha.-methyl-N-(trimethylsilyl)-	2	13%
d-Mannose, didecyl mercaptal	2	13%
Docosane	2	13%
Heptanoic acid, heptyl ester	2	13%
L-Tryptophan, N-acetyl-N,1-dimethyl-, methyl ester	2	13%
N Acetyl aspartic TMS	2	13%
N'-(4-tert-Butylbenzylidene)-a-(2-chlorobenzamido)-4-(dimethylamino)cinnamohydrazide	2	13%
Nonadecanoic acid, trimethylsilyl ester	2	13%
O-Ethyl,S-(1-(2-methoxyphenyl)tetrazol-5-yl) monothiocarbonate	2	13%
Propane, 1,1,1,2-tetrachloro-	2	13%
Spiro(1,3-benzodioxole)-2,1'-cyclohexan-4'-one	2	13%
Thiophene, 3,3'-(1,2-ethenediyl)bis-	2	13%
Thymol-.beta.-d-glucopyranoside, tetra(trimethylsilyl)-	2	13%
Urocanic acid di-TMS	2	13%
(1-Methoxymethoxy-but-2-enyl)-benzene	2	13%
(2-Methyl-but-3-enyl-2-oxy)-dimethyl-silane	2	13%
(4R,5S)Hept-1-yne-4,5-diol, 1-(2-methyl-1,3-dioxolan-2-yl)-	1	7%
(7-Isopropylidenebicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-ylidene)acetonitrile	1	7%
.alpha. Keto isovaleric acid enol di-TMS	1	7%
.beta.-D-Fructopyranose, cyclic 2,3:4,5-bis(ethylboronate) 1-acetate	1	7%
.beta.-d-Mannofuranose, 2,3:5,6-di-O-ethylboranediyl-5-phenylpentyl-	1	7%
[1,2]Azaborino[1,2-a][1,2]azaborine	1	7%
1-(3,4-Methylenedioxybenzylidene)semicarbazide	1	7%
1-(Trimethylsilylmethyl)dimethylsilyloxydecane	1	7%
1,1-Difluoro-2,2,3-trimethyl-cyclopropane	1	7%
1,2:5,6-Di-O-ethylborandiyl-D-glycohexodialdose	1	7%
1,2-Benzenedicarboxylic acid, dipropyl ester	1	7%
1,2-Bis[5-(4-chlorophenyl)furfuryl]ethylene	1	7%
1,2-Dicarbadodecaborane(12)	1	7%
1,3,2-Benzoxazaborole, 2-ethyl-2,3-dihydro-	1	7%
1,3,5-Trisilacyclohexane	1	7%
1,3-Dioxolane, 4-(2-furanyl)-2-phenyl-	1	7%
1,3-Dioxolo[4,5-b]acridin-10(5H)-one, 11-hydroxy-4-methoxy-	1	7%

Tabela de Metabólitos exclusivos do grupo C+DP

Metabólito	N	% amostra
(1S,17S)-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-Decaoxabicyclo[15.13.0]triacontane	4	27%
.alpha.-D-Erythro-Hexopyranoside, methyl 2,3-dideoxy-, diacetate	4	27%
.alpha.-D-Galactopyranoside, methyl 2,3,4,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-	4	27%
.alpha.-D-Galactoside, methyl tetrakis-O-(trimethylsilyl)-	3	20%
.alpha.-D-Glucopyranosiduronamide, methyl 3-O-methyl-	3	20%
.gamma.-3,4,5,6-Tetrachlorocyclohexene	2	13%
1-(3-Methylbutyl)-2,3,4-trimethylbenzene	2	13%
1-(3-Methylbutyl)-2,3,5-trimethylbenzene	2	13%
1,1,1,3,5,5,7,7,7-Nonamethyl-3-(trimethylsiloxy)tetrasiloxane	2	13%
1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline, 6,7-dimethoxy-1-(3,4-dimethoxybenzyl)-2-nitroso-	2	13%
1,2-Benzenedicarboxylic acid, ditridecyl ester	2	13%
1,2-Bis(dimethylphenylsilyl)ethane	2	13%
1,3,2-Dioxaborolane, 2-ethyl-4,5-dimethyl-	2	13%
2,4,6-Trimethyl-3-thioxo-5-oxo-2,3,4,5-tetrahydro-1,2,4-triazine	1	7%
2,4-Docosanediol, 3,5-dimethyl-	1	7%
2,7-Bis(spirocyclopropane)bicyclo[2.2.1]heptan-3-one	1	7%
2a-(4-Chlorophenyl)-2-methoxy-4-[N-(2-bromophenyl)-N-methylamino]-1,2,2a,3-tetrahydroazeto(1,2-a)(1,5)-benzodiazepin-1-one	1	7%
2-Butenamide, N,N-diethyl-2-methyl-, (E)-	1	7%
2-Butenedioic acid (E)-, bis(trimethylsilyl) ester	1	7%
2-Butenedioic acid (Z)-, dibutyl ester	1	7%
2-Chloro-7-methylquinoxaline	1	7%
2-Cyclohexen-1-ol, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, acetate	1	7%
2-Cyclohexen-1-one, 2-hydroxy-4,4,6,6-tetramethyl-	1	7%
2-Furanmethanamine, N,N-diethyl-.alpha.-methyl-	1	7%
2-Hexenoic acid, trimethylsilyl ester	1	7%
2-Hydroxycyclohexane-1-carboxylic acid diTMS	1	7%
2-Ketosuccinic acid, tri-TMS	1	7%
2-Methyl-4-ketoglutaconate, bis(trimethylsilyl)- deriv.	1	7%
2-Monopalmitin trimethylsilyl ether	1	7%
2-Propenoic acid, 3-(4-methoxyphenyl)-, 2-ethylhexyl ester	1	7%
2-Pyrrolidinone, 1-(9-octadecenyl)-	1	7%
2-sec-Butylthiazole	1	7%
2-Thiophenemethanamine	1	7%
3-(Bromomethyl)cyclohexanone	1	7%
3-(Formylhydrazono)-2',4',6'-trimethylbutyranilide	1	7%
3,4,5,6-Tetra-O-acetyl-2-O-methyl-D-galactonitrile	1	7%
3,4,5-Trihydroxypentanoic acid, tetra-TMS	1	7%
3,5-Hexadien-1-yne, 1,3,6-tris(trimethylsilyl)-, (E,E)-	1	7%
3-Heptadecene, (Z)-	1	7%
3'-Hydroxybenzo[1',2'-b]-1,4-diazabicyclo[2.2.2]octene	1	7%
3-Indolamine, 6-fluoro-5-methoxy-N,2-bis[ethoxycarbonylmethyl]-	1	7%
3-Isoxazolidinone, 4-[bis(trimethylsilyl)amino]-2-(trimethylsilyl)-	1	7%
3-Methyltricosane	1	7%
3-Octen-2-amine, N,N-dimethyl-, (E)-	1	7%
3-Pyrrolamine, 3,4-(5H)-dihydro-5-(t-butyldimethylsilyloxy)methyl-	1	7%
4-(Dichloromethyl)-5-hydroxy-2(3H,5H)-furanone	1	7%
4,4,7-Trimethyl-oct-5-enal	1	7%
4,4-Dimethyl-5-methylene-2-allylamino-2-thiazoline	1	7%
4,5-Di-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methyl-D-mannonitrile	1	7%
4'-Amino-4-diethylaminochalcone	1	7%
4-Imidazolidinone, 5-(4-chlorobutyl)-2-(1,1-dimethylethyl)-5-ethyl-3-methyl-, (2R-trans)-	1	7%
4-Methyl-3-(3-nitrophenyl)-6-phenyl-5,6-dihydro-4H-[1,2,4,5]oxatriazine	1	7%
4-N-Trimethylsilylmethylaminobutyric acid, trimethylsilyl ester	1	7%
4-Phenyl-1-benzylpyridinium bromide	1	7%
4-Pyrimidinamine, 6-chloro-2-(methylthio)-	1	7%

5-(Acetamido)butyl-2-thioxoimidazolidin-4-one	1	7%
5-Hydroxyhexanoic acid diTMS	1	7%
5-Pyrimidinamine, 4-phenyl-	1	7%
6-(3-Hydroxy-but-1-enyl)-1,5,5-trimethyl-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-2-ol	1	7%
6,9-Pentadecadione	1	7%
6-Isopropyl-9-methyl-1,4-dioxa-spiro[4.5]decane-2,3-dicarboxylic acid, dimethyl ester	1	7%
6-Methyl-5-oxo-12,13-dioxa-tricyclo[7.3.1.0(1,6)]tridecane-10-carboxylic acid, methyl ester	1	7%
7-Octadecanone	1	7%
9-Borabicyclo[3.3.1]nonane, 9-methoxy-	1	7%
Acetamide, N-[2-(acetyloxy)-1-methyl-2-phenylethyl]-N-methyl-	1	7%
Arabinofuranose, 1,2,3,5-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-	1	7%
Aziridine, 2-(1,1-dimethylethyl)-1-hexyl-3-methyl-, trans-	1	7%
Benzamide, N-(trimethylsilyl)-	1	7%
Benzeneacetaldehyde, 4-chloro-.alpha.-methyl-	1	7%
Benzeneacetamide, N-(trimethylsilyl)-	1	7%
Benzeneacetic acid, .alpha.,4-bis[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester	1	7%
Benzocyclopentene, 4,6,7-triethyl-1-methyl-5-vinyl-	1	7%
Benzofuran-6-ol-4-one, 2,3,4,5,6,7-hexahydro-3-undecyl-	1	7%
Benzoic acid, 2-methoxy-, trimethylsilyl ester	1	7%
Benzophenone, 2,4,6-trimethyl-	1	7%
Benzoxazole, 2,2'-(2,5-thiophenediyl)bis[5-(1,1-dimethylethyl)-	1	7%
Bicyclo[2.2.1]hept-2-ene, 5-ethylidene-	1	7%