

# QUANTIFICAÇÃO DAS ENZIMAS LISSOSSOMAIS ARIL-SULFATASE, BETA HEXOSAMINIDASE E FOSFATASE ÁCIDA NA PLACA BACTERIANA DENTAL

José Ricardo KINA\*  
Eulázio Mikio TAGA\*\*  
Valéria Gondim da SILVA\*\*\*  
Valdir Gouveia GARCIA\*

- RESUMO: Neste experimento quantificaram-se as enzimas lisossomais fosfatase ácida, beta hexosaminidase e aril-sulfatase na placa bacteriana supragengival. De acordo com a metodologia empregada, somente as enzimas fosfatase ácida e beta hexosaminidase puderam ser detectadas.
- PALAVRAS-CHAVE: Enzima lisossomal; bactérias; doenças periodontais.

## Introdução

A agressão aos tecidos periodontais durante a doença periodontal inflamatória acentua-se devido a uma alteração gradual na distribuição percentual da quantidade e qualidade da placa bacteriana dental, que é constituída predominantemente pelas bactérias e seus produtos.<sup>19,36,38,40,51,52,58</sup>

Embora inúmeras bactérias estejam presentes na constituição da placa bacteriana dental, elas somente são encontradas na intimidade dos tecidos em fases avançadas da periodontite,<sup>10,14,47</sup> parecendo improvável que exerçam um papel direto nas alterações teciduais do periodonto nos estágios iniciais da doença periodontal inflamatória.<sup>45</sup>

Para que os microrganismos e as substâncias destrutivas originárias da placa bacteriana dental tenham acesso ao tecido conjuntivo para o início e prosseguimento

---

\* Departamento de Diagnóstico e Cirurgia – Faculdade de Odontologia – UNESP – 16015-050 – Araçatuba – SP.

\*\* Departamento de Bioquímica – Faculdade de Odontologia – USP – 17043-101 – Bauru – SP.

\*\*\* Cirurgiã-Dentista – 16015-050 – Araçatuba – SP.

do processo periodontal inflamatório, parece haver a necessidade de se superarem alguns mecanismos defensivos do sulco gengival.<sup>43,44,49</sup>

Enquanto os mecanismos de defesa do sulco gengival estiverem intactos, as bactérias e seus produtos não podem penetrar no tecido conjuntivo subjacente. Um evento importante no desenvolvimento da doença periodontal inflamatória é a derrubada desses fatores defensivos, ou seja, deve ocorrer a ulceração do sulco gengival para que haja o afluxo de substâncias microbianas ao tecido conjuntivo subjacente.<sup>1,51</sup>

Este processo pode ser promovido por diversos fatores, como a ação de enzimas produzidas por bactérias presentes na placa bacteriana dental,<sup>1,4,12,51</sup> além de enzimas produzidas por leucócitos polimorfonucleares,<sup>21,62</sup> que são atraídos pela atividade quimiotática positiva exercida pela placa bacteriana dental.<sup>35,42,46,48</sup>

Em virtude de as enzimas advindas das bactérias da placa bacteriana dental desempenharem um papel importante no desencadeamento da doença periodontal inflamatória, julgamos oportuno dosar as enzimas aril-sulfatase, beta hexosaminidase e fosfatase ácida em extrato de placa bacteriana dental.

## **Material e método**

### **1 Coleta da placa bacteriana dental**

Para a realização deste estudo, foram coletadas placas bacterianas dentais em 50 alunos da rede de ensino pública da cidade de Araçatuba.

Foi feita a coleta de 0,28 g de placa bacteriana dental supragengival com curetas estéreis, tomando-se o cuidado de não provocar sangramento gengival.

Em seguida, a placa bacteriana dental foi acondicionada em vidros estéreis, fechados hermeticamente e armazenados em *freezer* a -20 °C.

### **2 Obtenção do extrato de placa bacteriana dental**

Realizou-se a homogeneização de 0,28 g de placa dental com 35,0 ml de tampão Tris - HCl 0,1M pH 7,5 em um sonicador "SONIFIER CELL DISRUPTOR B-30, da BRANSON SONIC POWER CO". A temperatura foi mantida a 4 °C por imersão do *becker* em gelo moído. Mediante a utilização do microtip e da potência máxima do aparelho, foram dados pulsos de 1 minuto, com intervalos de 1 minuto, durante 10 horas.

Após a sonicação, a suspensão de placa dental foi centrifugada por 30 minutos a 10.000 r.p.m. em uma centrífuga SORVALL RC-5C, com rotor SS-34.

O sobrenadante foi recolhido e o precipitado, desprezado.

Na seqüência, realizou-se um estudo do tempo de incubação para a dosagem de atividade das enzimas, utilizando-se, para cada uma, 0,1 ml do sobrenadante, imediatamente após a centrifugação.

### **3 Dosagem da atividade da beta hexosaminidase**

Por intermédio do método utilizado por Taga,<sup>57</sup> a atividade da beta hexosaminidase foi determinada a 37°C, usando-se 0,5 ml de p-nitrofenil-N-Acetil-Beta-D-glucosaminidase 3 mM em tampão acetato 100 mM pH 4,5. Após incubação por 60 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 1,0 ml de NaOH 1,0N.

A absorvância foi lida a 400 nm. A unidade de atividade enzimática definiu-se como 1 micro mol de p-nitrofenol liberado por minuto, sendo o coeficiente de extinção molar do p-nitrofenol  $1,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### **4 Dosagem da atividade da fosfatase ácida**

Por meio do método utilizado por Taga,<sup>56</sup> a atividade da fosfatase ácida foi determinada a 37°C, usando-se 1,0 ml de p-nitrofenil-fosfato 5 mM em tampão acetato 100 mM pH 5,0. Após incubação por 2 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 1,0 ml de NaOH 1,0N. A absorvância foi lida a 400 nm. Uma unidade de atividade enzimática definiu-se como 1 micro mol de p-nitrofenol liberado por minuto, sendo o coeficiente de extinção molar do p-nitrofenol  $1,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### **5 Dosagem da atividade da aril-sulfatase**

Por meio do método utilizado por Waheed & Van Etten,<sup>61</sup> a atividade da aril-sulfatase foi determinada a 37°C, usando-se 0,5 ml de p-nitrocatecol-sulfato 5 mM em tampão acetato 100 mM pH 5,0. Após incubação por 60 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 1,0 ml de NaOH 1,0N. A absorvância foi lida a 515 nm. A unidade de atividade enzimática definiu-se como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 micro mol de substrato/minuto, sendo o coeficiente de extinção molar do p-nitrocatecol  $1,24 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### **6 Dosagem de proteínas**

A dosagem de proteínas foi determinada pelo método de Lowry, modificada por Hartree.<sup>17</sup>

## Resultado

Quadro 1 – Resultados da dosagem das atividades enzimáticas

Enzima	Vol/ml	mU/ml*	mU/Total	Prot. total	mU/mg prot.	mU/g placa
FA	35	57	1995	78,79 mg	25,32	7125
A-S	35	0	0	78,79 mg	0	0
Beta hexo.	35	6,9	241	78,79 mg	3,05	860

\* mU = miliunidade enzimática (corresponde à unidade enzimática x 1.000).

## Discussão

Vários trabalhos têm correlacionado a quantificação das enzimas lisossomais com os diferentes graus da doença periodontal inflamatória nos fluidos e tecidos bucais.<sup>2,3,5,8,11,20,27,28,29,30</sup>

Apesar de diversos resultados demonstrarem correlação entre o nível enzimático com o grau da doença periodontal inflamatória, pouco se sabe acerca da origem destas enzimas, se provêm do tecido gengival de células inflamatórias ou se são produtos de excreção das bactérias contidas na placa bacteriana dental.

Sabe-se que o nível da fosfatase ácida durante a doença periodontal inflamatória se encontra alterado tanto no tecido gengival,<sup>6,13,18,23,54</sup> quanto na saliva,<sup>26,63</sup> na saliva e no sangue,<sup>50</sup> no soro<sup>25</sup> e no sangue.<sup>22</sup> Kina et al.<sup>27</sup> atribuíram o aumento da fosfatase ácida no tecido gengival de pacientes portadores de diferentes graus da doença periodontal inflamatória, analisando que parte da enzima encontrada nos tecidos gengivais pode ser oriunda de vários tipos de células presentes nas várias etapas da doença periodontal inflamatória. Por isso deve-se ter muito cuidado na interpretação dos resultados ao utilizar o nível de fosfatase ácida como parâmetro no diagnóstico dos diferentes graus evolutivos da doença periodontal inflamatória.

De acordo com nossos resultados, a fosfatase ácida pode ser liberada pelos microrganismos da placa bacteriana dental que, junto com a fosfatase ácida de leucócitos polimorfonucleares,<sup>9,24,32,55,60</sup> podem estar presentes no início da doença periodontal inflamatória; enquanto, a fosfatase ácida de células epiteliais<sup>7,15,31,32,33,34,53</sup> e os fibroblastos<sup>15,32,33</sup> poderiam participar mais efetivamente nas fases subseqüentes da doença periodontal inflamatória, em razão da maior destruição tecidual.

Kina et al.<sup>27</sup> também descreveram a beta hexosaminidase no tecido gengival de humanos, que sofria tendência acentuada à elevação, de acordo com a progressão da doença periodontal inflamatória.

A quantificação desta enzima no extrato de placa bacteriana dental prova que a população bacteriana presente na placa também contém esta enzima em uma

quantidade relativamente alta, o que mostra que a beta hexosaminidase das bactérias pode ter participação nos estágios iniciais da doença periodontal inflamatória. Infelizmente, não temos dados na literatura que permitam um melhor estudo comparativo dos nossos resultados.

Das enzimas lisossomais estudadas, de acordo com os resultados deste trabalho, podemos analisar que a aril-sulfatase talvez seja uma enzima proveniente somente do tecido gengival alterado<sup>33,41</sup> e de células inflamatórias,<sup>39</sup> no início da doença periodontal inflamatória, pois não foi possível detectá-la em extrato sonicado de placa bacteriana supragengival, mesmo em tempos de incubação superiores a 120 minutos.

Esta enzima pode não participar do início da instalação da gengivite pelas bactérias da placa supragengival, mas está presente e atuante durante a destruição tecidual com o avançar da doença periodontal inflamatória, pois Harper et al.<sup>16</sup> relacionaram esta enzima com *Bacteróides gingivalis* isolados de placa subgengival, coletada de pacientes com periodontite.

Além disso, Kina et al.<sup>27</sup> descreveram alterações no nível da aril-sulfatase nos tecidos gengivais de pacientes portadores de diferentes graus da doença periodontal inflamatória, cujo nível máximo relacionava-se com a gengivite grau 1, de acordo com Løe & Silness.<sup>37</sup>

Os resultados encontrados no presente trabalho, demonstrando a presença das enzimas lisossomais beta hexosaminidase e fosfatase ácida na placa bacteriana dental, corroboram os estudos de Thilander<sup>59</sup>, responsável pela observação de que enzimas podem ser um fator de importância na patogênese da doença periodontal, uma vez que promove a ampliação dos espaços intercelulares do epitélio sulcular e juncional, por onde substâncias destrutivas da placa poderiam ter acesso direto ao tecido conjuntivo.

## Conclusão

De acordo com a análise dos resultados obtidos, nas condições em que foi realizado o estudo, pôde-se chegar às seguintes conclusões:

- ocorre atividade da fosfatase ácida e da beta hexosaminidase na placa bacteriana supragengival;
- não foi demonstrada atividade da aril-sulfatase na placa bacteriana supragengival.

## Agradecimento

Agradecemos ao CNPq, pela Bolsa de Pesquisa que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

KINA, J. R. et al. Detection of lysosomal enzymes acid phosphatase, beta hexosaminidase and arylsulphatase in human supra gingival plaque. *Rev. Odontol. UNESP (São Paulo)*, v.25, n.1, p.125-133, 1996.

- **ABSTRACT:** *This experiment was carried out to identify the lysosomal enzymes acid phosphatase, arylsulphatase and beta hexosaminidase in supragingival plaque harvested from humans. According to our results only acid phosphatase and beta hexosaminidase could be detected.*
- **KEYWORDS:** *Lysosomal enzyme; bacteria; periodontal diseases.*

## Referências bibliográficas

- 1 BAHN, A. N. Microbial potential in the etiology of periodontal disease. *J. Periodontol.*, v.41, p.603-10, 1970.
- 2 BANG, J., CIMASONI, G., HELD, A. J. Beta glucuronidase correlated with inflammation in the exsudate from human gingiva. *Arch. Oral Biol.*, v.15, p.445-51, 1970.
- 3 BEIGHTON, D., LIFE, J. S. C. Trypsin-like, chymotrypsin-like and glycylprolil dipeptidase activities in gingival crevicular fluid from human periodontal sites with gingivitis. *Arch. Oral Biol.*, v.34, p.843-6, 1989.
- 4 CAFFESSE, R. G., NASJLETI, C. E. Enzymatic penetration through intact sulcular epithelium. *J. Periodontol.*, v.47, p.391-7, 1976.
- 5 CAO, C. F., SMITH, O. T. Crevicular fluid myeloperoxidase at healthy, gingivitis and periodontitis sites. *J. Clin. Periodontol.*, v.16, p.17-20, 1989.
- 6 CIECIURA, L. et al. Histochemical and biochemical study of patterns of acid phosphatase activity in parodontopathies before and after surgical treatment. *Czas. Stomatol.*, v.23, p.1245-50, 1970.
- 7 CORNAZ, A., CIMASONI, G., PATAKI, A. Decrease of acid phosphatase activity in the epithelial cells from inflamed gingivae. *Experientia*, v.30, p.143-4, 1974.
- 8 ELEY, B. M., COX, S. W. A biochemical study of serine proteinase activities at local gingival tissue sites in human chronic periodontitis. *Arch. Oral Biol.*, v.35, p.23-7, 1990.
- 9 FRANK, R. M., CIMASONI, G. Electron microscopy of acid phosphatase in the exsudate from inflamed gingiva. *J. Periodontal Res.*, v.7, p.213-25, 1972.
- 10 FRANK, R. M., VOEGEL, J. C. Bacterial bone resorption in advanced cases of human periodontitis. *J. Periodontal Res.*, v.13, p.251-61, 1978.
- 11 FULLMER, H. M., BAER, P., DRISCOLL, E. Correlation of collagenase production to periodontal disease. *J. Periodontal Res.*, v.4, p.30-1, 1969.
- 12 GAFFAR, A., COLEMAN, E. J., MARCUSSEN, H. W. Penetration of dental plaque components into gingiva: sequential topical treatments with hyaluronidase and Streptococcal polysaccharide in rats. *J. Periodontol.*, v.52, p.197-205, 1981.
- 13 GIBSON, W. A., BAER, P. N. An unusual manifestation of chronic gingivitis enzyme histochemical findings. *J. Periodontol.*, v.43, p.26-30, 1972.
- 14 HABERMAN, S. Inflammatory and non-inflammatory responses to gingival invasion by microorganisms. *J. Periodontol.*, v.30, p.190-5, 1959.
- 15 HALACKOVÁ, Z., OUDRÁN, L., KUKLETOVÁ, M. Localization of some enzymes in the periodontium of the rat molar. *Acta Histochem.*, v.67, p.173-9, 1980.

- 16 HARPER, D. S., LAMSTER, M. I., CELENTI, R. Relationship of subgingival plaque flora to lysosomal and cytoplasmic enzyme activities in gingival crevicular fluid. *J. Clin. Periodontol.*, v.16, p.164-9, 1989.
- 17 HARTREE, E. F. Determination of proteins: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, v.48, p.422-7, 1972.
- 18 HASEGAWA, K., CIMASONI, G., VUAGNAT, P. Inflamed gingiva contains more free lysosomal enzymes. *Experientia*, v.31, p.765-6, 1975.
- 19 HOLBOROW, D. W. Developments in the microbiology of periodontal disease: a review. *J. N. Z. Soc. Periodontol.*, v.48, p.5-10, 1979.
- 20 ISHIKAWA, I., CIMASONI, G. Alkaline phosphatase in human gingival fluid and its relation to periodontitis. *Arch. Oral Biol.*, v.15, p.1401-4, 1970.
- 21 ISHIKAWA, I. et al. Effect of lysosomal enzymes isolated from polymorphonuclear leukocytes on periodontal tissues. *J. Periodontal Res.*, v.17, p.503-5, 1982.
- 22 JANCZUK, Z., BANACH, J., GREGORCZYK, J. The activity of non-specific phosphatases in the blood of patients with periodontal diseases during healing of periodontal wounds. *Czas. Stomatol.*, v.23, p.1091-6, 1970.
- 23 JANY, Z. et al. Nonspecific acid phosphomonoesterase activity in gingival tissue. *Bratisl. Lek. Listy*, v.69, p.57-64, 1978.
- 24 \_\_\_\_\_. Correlation between morphological findings and the activity of acid phosphomonoesterase in the tissue of the marginal gingiva. *Cesk. Stomatol.*, v.79, p.287-93, 1979.
- 25 JEDRZEJEWSKA, T. et al. The activity of acid and alkaline phosphatases and the concentration of inorganic phosphates, calcium and magnesium in the serum in periodontal diseases and in the course of their treatment. *Czas. Stomatol.*, v.23, p.901-8, 1970.
- 26 \_\_\_\_\_. Acid and alkaline phosphatase activity and concentration of inorganic phosphorus, calcium, and magnesium in the saliva in periodontopathies and during their treatment. *Czas. Stomatol.*, v.23, p.1233-38, 1970.
- 27 KINA, J. R., TAGA, E. M., PASSANEZI, E. Alterações das enzimas lisossomais beta hexosaminidase, fosfatase ácida e aril-sulfatase nos diferentes estágios da doença periodontal inflamatória. *Rev. Odontol. UNESP*, v.21, p.191-201, 1992.
- 28 LAMSTER, I. B., HARTLEY, L. J., VOGEL, R. I. Development of a biochemical profile for gingival crevicular fluid. Methodological considerations and evaluation of collagen-degrading and ground substance-degrading enzyme activity during experimental gingivitis. *J. Periodontol.*, v.56, p.13-21, 1985.
- 29 LAMSTER, I. B. et al. Lactate dehydrogenase, beta glucuronidase and arylsulfatase activity in gingival crevicular fluid associated with experimental gingivitis in man. *J. Periodontol.*, v.56, p.139-47, 1985.
- 30 \_\_\_\_\_. Enzyme activity in crevicular fluid for detection and prediction of clinical attachment loss in patients with chronic adult periodontitis. Six month results. *J. Periodontol.*, v.59, p.516-23, 1988.
- 31 LANGE, D. E., SCHROEDER, H. E. Structural localization of lysosomal enzymes in gingival sulcus cells. *J. Dent. Res.*, v.51, p.272-8, 1972.
- 32 LARMAS, L. Distribution of acid phosphatase activity in hydantoin induced hyperplastic, healthy and inflamed human gingiva. *Proc. Finn. Dent. Soc.*, v.72, p.109-13, 1976.
- 33 \_\_\_\_\_. A histochemical study of arylsulfatase activity in healthy, inflamed and hydantoin induced hyperplastic human gingiva. *Proc. Finn. Dent. Soc.*, v.73, p.48-52, 1977.

- 34 LEONARD, E. P. Enzyme histochemistry of periodontal pathogenesis in the rice rat (*Dryomys palustris*). *Cell. Mol. Biol.*, v.24, p.241-8, 1979.
- 35 LINDHE, J., HELLDIN, L. Neutrophil chemotactic activity elaborated by human dental plaque. *J. Periodontal Res.*, v.7, p.297-303, 1972.
- 36 LOESCHE, W. J., SYED, S. A. Bacteriology of human experimental gingivitis: effects of plaque and gingivitis score. *Infect. Immun.*, v.21, p.830-9, 1978.
- 37 LÖE, H., SILNESS, J. Periodontal disease in pregnancy. I. Prevalence and severity. *Acta Odontol. Scand.*, v.21, p.533-51, 1963.
- 38 LOW, S. B. Current views on the etiology of periodontal disease: a review of literature (1976-1979). *J. Fla. Dent. Soc.*, v.50, p.22-4, 1979.
- 39 LYNCH, S. M., AUSTEN, K. F., WASSERMAN, S. I. Release of arylsulfatase A but not B from rat mast cells by noncytolytic secretory stimuli. *J. Immunol.*, v.121, p.1394-9, 1978.
- 40 MANDEL, I. D. Dental plaque: nature, formation and effects. *J. Periodontol.*, v.37, p.537-67, 1966.
- 41 MARCELIS, R., VAN ELSSEN, A. F., LEROY, J. G. Arylsulphatase A and B in human diploid fibroblast: differential assay with 4-methylumbelliferylsulphatase and AgNO<sub>3</sub>. *Clin. Chim. Acta*, v.93, p.85-92, 1979.
- 42 MARY, G. G., FOLKE, L. E. A. The influence of plasma and serum on the chemostactic response to plaque. *J. Periodontal Res.*, v.9, p.349-59, 1974.
- 43 MILLER, D. R., LAMSTER, I. B., CHASENS, A. J. Role of the polymorphonuclear leukocyte in periodontal health and disease. *J. Clin. Periodontol.*, v.11, p.1-15, 1984.
- 44 PAGE, R. C. Gingivitis. *J. Clin. Periodontol.*, v.13, p.345-59, 1986.
- 45 PAGE, R. C., SCHROEDER, H. E. Biochemical aspects of the connective tissue alterations in inflammatory gingival and periodontal disease. *Int. Dent. J.*, v.23, p.455-69, 1973.
- 46 PAYNE, W. A. et al. Histopathologic features of the initial and early stages of experimental gingivitis in man. *J. Periodontal Res.*, v.10, p.51-64, 1975.
- 47 SAGLIE, R., ELBAZ, J. J. Bacterial penetration into the gingival tissue in periodontal disease. *J. West Soc. Periodontal Abstr.*, v.31, p.85-93, 1983.
- 48 SCHROEDER, H. E. Quantitative parameters of early human gingival inflammation. *Arch. Oral Biol.*, v.15, p.383-400, 1970.
- 49 SCHULTZ-HAUDT, S. D. Tissue resistance to oral infection. *J. Dent. Res.*, v.42, p.545-8, 1963.
- 50 SMOLYAR, N. I., KOVALYUK, I. S. Activity of salivary and blood phosphatases in paradontal disease. *Stomatologija Mosk.*, v.53, p.25-6, 1974.
- 51 SOCRANSKY, S. S. Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. *J. Dent. Res.*, v.49, p.203-22, 1970.
- 52 SOCRANSKY, S. S. et al. Bacteriological studies of developing supragingival dental plaque. *J. Periodontal Res.*, v.12, p.90-106, 1977.
- 53 SQUIER, C. A., MATERHOUSE, J. P. The lysosomes in oral epithelium: the ultrastructural localization of acid phosphatase and non-specific esterase in keratinized oral epithelium in man and rat. *Arch. Oral Biol.*, v.15, p.153-68, 1970.
- 54 STAMBOLIEVA, E., BURKOVA, T. Some enzymohistochemical and enzymoelectrophoretic studies of the periodontium in periodontosis. *Stomatologija Mosk.*, v.48, p.22-5, 1969.
- 55 SUEDA, T., CIMASONI, G. The origins of acid phosphatase in human gingival fluid. *Arch. Oral Biol.*, v.13, p.553-8, 1968.

- 56 TAGA, E. M. *Fosfatase ácida de fígado de Cobaia (Cavia porcellus - Linnaeus, 1758):* purificação, estudos eletroforéticos e algumas propriedades. São Paulo, 1979. 228p. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo.
- 57 \_\_\_\_\_. Structural and chemical characterization of a homogeneous peptide N-glycosidase from almond. *Biochemistry*, v.23, p.815-22, 1985.
- 58 THEILADE, E. et al. Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J. Periodontal Res.*, v.1, p.1-13, 1966.
- 59 THILANDER, H. The effect of leukocytic enzyme activity on the structure of the gingival pocket epithelium in man. *Acta Odontol. Scand.*, v.21, p.431-54, 1963.
- 60 TYNELIUS-BRATTHALL, G., ATTSTRON, R. J. Acid phosphatase, hyaluronidase, and protease in crevices of healthy and chronically inflamed gingiva in dogs. *J. Dent. Res.*, v.51, p.279-83, 1972.
- 61 WAHEED, A., VAN ETTEN, R. L. The monomer-dimer association of rabbits liver aryl-sulfatase A and its relationship to the anomalous linetes. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.194, p.215-25, 1979.
- 62 WHITE, R. R., MONTGOMERY, E. H. Exocytosis of polymorphonuclear leukocyte lysosomal contents induced by dental plaque. *Infect. Immunol.*, v.16, p.934-7, 1977.
- 63 WITEK, E. Acid phosphatase activity in saliva in relation to changes in periodontium. *Czas. Stomatol.*, v.23, p.1227-32, 1970.