

ADESÃO LEUCOCITÁRIA NA MEDICINA VETERINÁRIA: ASPECTOS MOLECULARES E ENFERMIDADES RELACIONADAS

[*Leukocyte adhesion in veterinary medicine: Molecular aspects and related diseases*]

Glaucio Jonas Lemos Santos^{1*}, Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

RESUMO - Adesão leucocitária é um evento fundamental para o processo inflamatório, culminando com o carreamento de células de defesa mediante ação de citocinas e moléculas de adesão que irão debelar o agente infeccioso. Dentre as moléculas de adesão, quatro grandes famílias se destacam: as integrinas, imunoglobulinas, selectinas e caderinas. Essas moléculas coordenam as várias fases da adesão leucocitária ao endotélio, promovendo rápida regulação de interações adesivas entre as células sanguíneas e o endotélio. Na presença de agentes moduladores como fármacos, alterações genéticas, patógenos, padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados ao dano tecidual (DAMPs), há liberação de citocinas e alarminas que por sua vez suscitam uma resposta por parte do organismo. Muitas substâncias e fármacos alteram a adesão leucocitária, como: anticoagulantes, corticóides e anti-inflamatórios não-esteroidais. Enfermidades que acometem os animais podem ser relacionadas à adesão leucocitária de duas formas: doenças que suscitam processo inflamatório que levem à migração de leucócitos (como doenças infecciosas e neoplasias) ou por um restrito grupo de doenças que inibem a adesão leucocitária. Alguns testes *in vitro* para avaliar a capacidade migratória dos leucócitos podem ser realizados, tais como os testes de quimiotaxia, de análise de mutações pontuais em moléculas de adesão, imunohistoquímica dentre outros. No entanto, algumas enfermidades que alteram a adesão leucocitária são pouco frequentes, e, assim, podem ser negligenciadas na clínica veterinária. Apesar da pouca literatura disponível, o estudo da adesão leucocitária é de extrema relevância na clínica médica veterinária. Desta forma, a presente revisão aborda desde os aspectos mais fundamentais acerca da etiologia, diagnóstico e fatores que interferem na homeostase dos mecanismos da adesão leucocitária.

Palavras-chave: migração leucocitária, moléculas de adesão, imunodeficiências, imunomodulação.

ABSTRACT - Leukocyte adhesion is a key event for the full operation of inflammatory process, culminating with leukocyte carrying by cytokines and adhesion molecules and subsequently will eradicate the infectious agent. Adhesion molecules are inserted into four major families: integrins, immunoglobulins, selectins and cadherins. These molecules coordinate various phases of leukocyte adhesion to endothelium, promoting fast regulation of adhesive interactions between blood and endothelial cells. In presence of modulating agents, such as drugs, genetic disorders, pathogens, PAMPs and DAMPS, there is a production and/or release of cytokines, alarmins, which provokes a response by the organism. Many drugs and substances possess the ability to alter leukocyte adhesion, such as anticoagulants, corticosteroids and non-steroidal anti-inflammatory drugs. The diseases that affect animals may be related to leukocyte adhesion in two ways: by a stimulation of inflammatory process and leading the leukocytes migration (such as infectious diseases and neoplasms) or by a suppression of leukocyte adhesion. Many *in vitro* tests available have been used to evaluate the migration ability of leukocytes, such as chemotaxis tests, single mutation analysis in adhesion molecules genes, immunohistochemistry, etc. However, some of the diseases related to failures in the leukocyte adhesion are rare, and, for this reason can be neglected in veterinary practice. Despite the lack of available literature, the study of leukocyte adhesion is very important in veterinary medicine. Thus, the present review focuses from the most fundamental aspects about the etiology, diagnosis and factors that affect the homeostasis mechanisms of leukocyte adhesion.

Keywords: Leukocyte migration, adhesion molecules, immunodeficiency, immunomodulation

* Autor para correspondência: diana.pinheiro@uece.br

INTRODUÇÃO

A ativação do sistema imunológico depende de mecanismos complexos que, orquestrados harmoniosamente, promovem a rápida liberação de substâncias solúveis do sangue seguida de liberação de células de defesa, tendo como objetivo principal o desencadeamento da imunidade e consequente promoção da homeostase do indivíduo (Muller, 2009).

Nos processos infecciosos de animais, a inflamação é uma resposta predominante no tecido envolvido. Dentre os eventos incluídos no processo inflamatório, destaca-se a mobilização dos leucócitos para os respectivos sítios de lesão (Muller, 2011).

A adesão leucocitária é um evento fundamental para o funcionamento adequado do sistema imunológico, pois a partir dela, há o deslocamento de células de defesa para os tecidos adjacentes mediante a participação de moléculas de adesão e de diversos mediadores químicos, tais como as citocinas e quimiocinas (Rose et al., 2007).

As moléculas de adesão têm como função promover a interação célula-célula e célula-matriz extracelular, migração transendotelial e junções intercelulares, o que faz seu estudo necessário para se compreender muitos outros processos essenciais para a defesa do organismo (Bevilacqua et al., 1994).

Desta forma, a presente revisão tem por objetivo fornecer subsídios para compreensão dos

aspectos moleculares envolvidos na adesão leucocitária em seu nível mais fundamental e também correlacionar esse evento com fatores que possam vir a influenciá-la, como enfermidades e fármacos utilizados rotineiramente na clínica veterinária.

ADESÃO LEUCOCITÁRIA

As moléculas de adesão coordenam de maneira orquestrada as várias fases da aderência leucocitária ao endotélio quiescente ou inflamado através de um mecanismo regulado por ligações a receptores (Mazzone & Ricevuti, 1995). A transformação de um leucócito circulante em um não-circulante depende, entre outros fatores, de modificações das propriedades reológicas de resistência para deformações mecânicas e adesividade. A passagem bem-sucedida através da microvasculatura depende da deformabilidade dos leucócitos, devido o diâmetro capilar ser um pouco menor do que o das células, e da manutenção de uma resposta adesiva do endotélio. Na resposta fisiológica, o controle das interações adesivas permite que os leucócitos possam se aderir à parede dos vasos, e a modulação de propriedades mecânicas das células permitem a locomoção e a migração para os tecidos (Adams & Nash, 1996).

MOLÉCULAS DE ADESÃO

Entre os muitos tipos de receptores de adesão na superfície das células, quatro grandes famílias se destacam: as integrinas, imunoglobulinas, selectinas e caderinas (Tabela 1).

Tabela 1. Membros das superfamílias de moléculas de adesão e suas respectivas nomenclaturas de inclusão em grupos de diferenciação (CD).

Superfamília	Protótipos	Grupo de diferenciação (CD)
Integrinas	VLA-1 (antígeno de fase tardia)	CD49a/CD29
	LFA-1 (antígeno associado a função leucocitária)	CD11a/CD18
	Mac-1 (molécula de adesão celular)	CD11b/CD18
Imunoglobulinas	ICAM-1 (molécula de adesão intercelular)	CD54
	LFA-2	CD2
	PECAM-1 (molécula de adesão celular endotélio-plaquetária)	CD31
Selectinas	E-selectina,	(CD62E)
	L-selectina	(CD62L)
	P-selectina	(CD62P)

A família das integrinas é composta por glicoproteínas heterodiméricas de membrana com duas subunidades: α e β (Kijas et al., 1999). Atualmente, 18 tipos diferentes de subunidade α e 8 tipos de β foram descritos, os quais se associam em pares para formar pelo menos 24 tipos diferentes de receptores $\alpha\beta$ (Abram & Lowell, 2009). Os principais protótipos dessa família incluem o antígeno de fase tardia (VLA-1 ou CD49a/CD29), antígeno associado a função leucocitária de número 1 (LFA-1 ou CD11a/CD18) e molécula de adesão celular de número 1 (Mac-1 ou CD11b/CD18) (Sullivan, 2000). Uma importante característica das integrinas é que elas existem em estados ativos e inativos. Uma célula ativada pode transmitir um sinal do seu citoplasma que modifica a conformação do domínio das integrinas na superfície da membrana celular, aumentando a afinidade das integrinas pelos seus ligantes. Essa sinalização ocorre, por exemplo, quando leucócitos são estimulados por peptídeos bacterianos, e rapidamente a afinidade das integrinas leucocitárias aumenta para os membros da família das imunoglobulinas (Barreiro et al., 2007).

A família das imunoglobulinas é um grupo composto por mais de 760 membros, incluindo proteínas de superfície celular e proteínas solúveis que estão envolvidas no reconhecimento intercelular, ligação ou no processo de adesão leucocitária. As moléculas classificadas como membros desta superfamília partilham características estruturais com as imunoglobulinas também conhecidas como anticorpos, e todas elas possuem um domínio conhecido como domínio de imunoglobulina ou dobra, estrutura tipo “sanduíche” composta de duas porções β -pregueadas opostas e estabilizadas por meio de uma ponte dissulfeto (Wong et al., 2012). Os principais protótipos dessa família incluem molécula de adesão intercelular (ICAM-1) ou CD54, LFA-2 ou CD2, molécula de adesão celular endotélio-plaquetária de número 1 (PECAM-1) ou CD31 e molécula de adesão celular mucosa-adressina de número 1 (MAdCAM-1) (Sullivan, 2000). Além da sua participação no fenômeno da adesão leucocitária, somam-se outros fenômenos executados mediante influxo de Ca^{2+} e processados dentro das células, como proliferação, apoptose e transdução de sinais (Nagahata & Higuchi, 1996, Nagahata, 2004).

As caderinas são uma família de moléculas de superfície celular transmembranárias dependentes de cálcio, as quais se ligam por meio de interações homofílicas. O domínio

citoplasmático das caderinas se associa com cateninas α , β , γ e p120, promovendo forte ligação dessa molécula ao endotélio e reforçando a adesão intercelular, sua principal função. São divididas em grupos de acordo com sua especificidade tissular e, entre elas, destacam-se a E-caderina (também chamada uvomorulina ou Cell-CAM 120-80 em humanos), Arc1 em cães e L-CAM em galinhas. São responsáveis por adesão intercelular em todos os tecidos epiteliais (Restucci et al., 1997).

Outra família importante no estudo da adesão leucocitária é a família das selectinas. Todas as selectinas têm uma região extracelular característica composta por um domínio lectina aminoterminal dependente de cálcio, um domínio EGF2-like e duas a nove unidades curtas homólogas (Tedder et al., 1995). São biossintetizadas e expressas em resposta a endotoxinas bacterianas e citocinas pró-inflamatórias como interleucina de número 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF) (Bevilacqua et al., 1994) e interagem com carboidratos ligantes nos leucócitos e nas células endoteliais (Frenette & Wagner, 1996a). Os protótipos dessa família são a E-selectina (CD62E), L-selectina (CD62L) e a P-selectina (CD62P) (Sullivan, 2000).

MIGRAÇÃO TRANSENDOTELIAL

A manutenção da integridade vascular e a defesa contra agentes patogênicos requerem uma rápida regulação de interações adesivas entre as células sanguíneas e as células da parede dos vasos. Na presença de agentes moduladores como fármacos, alterações genéticas, DAMPs (padrões moleculares associados a danos) e PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos), há consequente liberação de citocinas, alarminas, que por sua vez suscitam uma resposta por parte do organismo (Tang et al., 2012).

Através da geração de compostos vasoativos tais como, prostaglandina 2 (PG2), fator ativador de plaquetas (PAF), citocinas quimiotáticas como a interleucina 8 (IL-8) e moléculas de adesão específicas da superfície de membrana, o endotélio orquestra o movimento do fluido e dos leucócitos que caracteriza a inflamação. As células endoteliais também expressam moléculas que fazem parte do grupo das imunoglobulinas e participam da adesão celular. As que estão mais associadas com a adesão leucocitária e a migração transendotelial

são: ICAM-1 (CD54), ICAM-2, molécula de adesão da célula vascular número 1 (VCAM-1) e molécula de adesão endotélio-plaqueta (PECAM-1 ou CD31) (Bevilacqua et al., 1994).

O controle desses mecanismos depende da ativação de receptores de adesão que estão presentes nos leucócitos e no endotélio, ou pela expressão de novos receptores na superfície celular. Uma célula em movimento carrega consigo receptores de adesão para ligação com a superfície de outra célula ou na matriz em direções normais ou tangenciais. O fluxo sanguíneo impõe restrições ao transporte adicional e mecânico de moléculas de interação enquanto elas residem nas células circulantes (Mcever & Zhu, 2010). Algumas funcionalidades dos receptores de adesão e seus ligantes acrescentam segurança ao reparo e ao sistema de defesa, no entanto a adesão defectiva pode ocorrer, causando lesão tecidual ou interrupção da homeostase do sistema vascular (Frenette & Wagner, 1996b).

O extravasamento dos leucócitos em áreas de inflamação já foi esclarecido em nível molecular. As citocinas, TNF- α e IL-1 produzidas em resposta a infecção e/ou lesão tecidual induzem a expressão de selectinas pelo endotélio. De fato, já foi comprovada não só a atuação do TNF- α , mas também do PAF como estimuladores da adesão tanto leucocitária como plaquetária (He et al., 2006). Os leucócitos circulantes podem se ligar às selectinas expressas pelo endotélio ativado no processo de rolagem (Etzioni, 2010). A próxima fase, adesão firme, é promovida por membros da família das integrinas e imunoglobulinas. Nessa fase, CD11/CD18 (Mac-1) e LFA-1 na superfície do neutrófilo e ICAM-1 e ICAM-2 na superfície do endotélio são os mediadores mais importantes na adesão (Meyer & Harvey, 1998; Sullivan et al, 2000). A afinidade da ligação entre as selectinas é relativamente baixa, mas é suficiente para servir como um “freio” biológico, fazendo com que os leucócitos desacelerem rapidamente por rolamento sobre o endotélio. Enquanto estão rolando, os leucócitos podem se tornar ativados por moléculas quimiotáticas, graças ao aumento da afinidade dos receptores adesivos β -2 de integrinas para ligantes no endotélio ativado. Um sinal quimiotático fora das vênulas induz os leucócitos a se comprimirem entre as células endoteliais e migrarem para o centro inflamatório (Frenette & Wagner, 1996a). Dentro desse contexto, vale ressaltar que o organismo também se utiliza de caminhos alternativos para promover a adesão dos leucócitos. Se em um primeiro momento as

principais moléculas envolvidas na migração de neutrófilos são as selectinas e as integrinas, os linfócitos utilizam o CD44, uma molécula de superfície que serve de marcador, sobretudo para os linfócitos T, para esse mesmo fim (Nunes-Pinheiro, 2000; Degrendele et al, 1996). Dessa forma, o organismo consegue manter um leque de vias principais e alternativas que propiciam o desenvolvimento do processo de adesão leucocitária em níveis operacionais normais, uma vez que o tráfego de leucócitos de forma aberrante contribui para o aparecimento de enfermidades de caráter autoimune (Rose et al., 2007).

MODULADORES DA ADESÃO LEUCOCITÁRIA

Muitas substâncias e fármacos possuem a capacidade de alterar a adesão leucocitária. Em relação aos anticoagulantes, a utilização do citrato, um quelante de cálcio, interfere na adesão leucocitária, suprimindo-a, tendo em vista que a expressão de moléculas de adesão está inibida, devido a pelo menos dois mecanismos: inibição da degranulação, por reduzir a concentração de cálcio, e atenuação da ativação do sistema complemento também pela redução dos níveis de cálcio (via clássica) e magnésio (via alternativa) (Dhondt et al., 1998). O citrato exerce uma atividade inibitória sobre a ativação de neutrófilos, impedindo que essas células migrem para sítios inflamatórios (permanecem em um estado quiescente no sistema circulatório) em ensaios de adesão leucocitária *in vivo* (Pfister et al., 1988).

Ao se comparar a viabilidade dos leucócitos submetidos à preservação com heparina e citrato, os melhores resultados são obtidos no sangue em heparina desde que os testes sejam realizados em um período de até 48 horas após a coleta associada aos anticoagulantes, a fim de que a deterioração das células não interfira nos resultados (McCullough et al., 1974; Branum et al., 1988).

A avaliação da expressão de fatores de adesão em sangue canino fresco e conservado em anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) em variados períodos de tempo demonstra que a população celular e a presença de marcadores de superfície sofrem alteração e tendem a decrescer com o passar do tempo, mesmo que o sangue tenha sido submetido a processos conservativos a partir do quinto dia. Esse efeito foi mais evidente no estudo do CD18, quando comparado ao CD11 e CD49 (Holst et. al., 2011).

Em relação aos fármacos, os efeitos inibitórios na adesão leucocitária que os corticóides administrados por via oral provocam em humanos apontam para o ápice da inibição após 4 horas da administração dos fármacos (Mcgillen et al., 1979). Em um segundo momento, foi feita a análise comparativa acerca do efeito do zymosan (agente flogístico), PGI₂ (Prostaciclina, mediador inflamatório) e hidrocortisona (corticóide) em amostras de sangue total. O zymosan induziu aumento da adesão leucocitária, mimetizando um processo inflamatório, enquanto a PGI₂ e o corticoide a suprimiram. Em adição a esse resultado, pode ser questionado o fato que os corticóides, PGI₂ e componentes ativados do sistema complemento podem ter interagido com plaquetas e/ou células mononucleadas, alterando o efeito da adesão leucocitária (Mcgillen et al., 1980). O uso de imunossuppressores específicos como a ciclosporina também está relacionada com a modulação da migração leucocitária, em particular o linfócito (Nunes-Pinheiro, 1995). O efeito de anti-inflamatórios não-esteroidais tais como ibuprofeno, fenoprofeno e sulindac na adesão leucocitária de humanos revelou que um decréscimo significativo 4 horas após a ingestão oral desses fármacos, efeito esse persistente até 24 horas após o teste (Venezio et al., 1985). A colchicina, alcalóide que possui propriedades anti-inflamatórias, provoca inibição na adesão leucocitária de polimorfonucleares em humanos (Fordham et al., 1981). Mediante o exposto, existem fármacos que modulam positivamente ou negativamente a adesão leucocitária.

ENFERMIDADES E ADESÃO LEUCOCITÁRIA

As enfermidades associadas à adesão leucocitária que acometem os animais podem ser relacionadas de duas formas: doenças que suscitam um processo inflamatório que leve à necessidade de migração de células de defesa ou um grupo restrito de doenças que interferem na adesão dos leucócitos ao endotélio (Nagahata, 2004).

ENFERMIDADES QUE SUPRIMEM A ADESÃO LEUCOCITÁRIA

Com relação às enfermidades que reduzem a capacidade de adesão dos leucócitos destacam-se a deficiência de adesão leucocitária canina (CLAD) e a deficiência de adesão leucocitária bovina (BLAD). As duas enfermidades são geneticamente e fenotipicamente semelhantes à

deficiência de adesão leucocitária em humanos (LAD) (Debenham et al., 2002; Gu et al., 2004). A gênese dessas enfermidades reside em uma deficiência autossomal recessiva parcial ou total das glicoproteínas de adesão de superfície celular (β_2 -integrinas) dos leucócitos. Em bovinos, os estudos vão além, tendo sido reconhecido um defeito na subunidade β do CD18 provocada pela homozigose do alelo D126G que expressa esta molécula. Nesse caso, o gene ITGB2 não é expresso corretamente, provocando um defeito na decodificação da integrina β_2 . Como se tratam de moléculas essenciais para a adesão das células de defesa, essa atividade é suprimida (Debey, 2010).

A CLAD foi reconhecida primeiramente em cães da raça Setter irlandês e Weimaraners (Willard et al., 1994) e a BLAD em bovinos da raça Holandesa e Pardo-suíço (Norouzy et al., 2005) e em búfalos (Patel et al., 2007). Esse defeito resulta em uma adesão leucocitária deficiente, quimiotaxia comprometida e mínima atividade bactericida. Como resultado, os animais são alvo de infecções bacterianas recorrentes. Os criadores dessa raça, bem como os veterinários devem estar atentos para a possibilidade de manifestação dessa enfermidade quando se depararem com esses animais (Trowald-wigh et al., 2000).

Os sinais clínicos da CLAD incluem gengivite, úlceras orais, febre (Gu et al., 2004), periodontites, pneumonia crônica, baixa regeneração tissular e crescimento retardado. Leucocitose em torno de 230.000/ μ L (Foureman et al., 2002) associada à neutrofilia marcante com ou sem desvio à esquerda está geralmente presente. Um aumento nos demais tipos de células sanguíneas também pode ocorrer (Meyer et al., 1998). A medula óssea se apresenta hiperplásica, com aumentado número de precursores mielóides granulocíticos (Gu et al., 2004). Anemia não-regenerativa suave a moderada e hiperglobulinemia policlonal podem estar presentes (Meyer et al., 1998). Onfalite e osteodistrofia hipertrófica também são sinais evidenciados em animais acometidos por CLAD (Bauer et al., 2008), bem como linfadenopatia (Bauer et al., 2004). Esses sinais são frequentemente confundidos com os de infecções inespecíficas, tornando o diagnóstico difícil, bem como o acesso à extensão da penetração do alelo mutante nas populações (Pfeiffer & Brenig, 2005). Os animais jovens são os mais acometidos (Trowald-Wigh et al., 2000), bem como os animais de sangue puro ou mestiços com elevado grau de consanguinidade (Willard et al., 1994). Os filhotes geralmente morrem precocemente de infecções múltiplas e

recorrentes de natureza bacteriana, nos pulmões e pele (Pfeiffer & Brenig, 2005), e/ou fúngica (Kobayashi et al., 2009). Muitos acabam sendo eutanasiados aos seis meses de idade (Bauer et al., 2004).

Ao contrário da CLAD, a BLAD encontra-se mais disseminada ao redor do mundo, refletindo a variedade de estudos acerca do impacto dessa enfermidade em vários países. Ainda que em uma baixa frequência, já foram relatados casos na Hungria (5.23%) (Fésus et al., 1999; Jánosa et al., 1999), Brasil (2.8%) (Ribeiro et al., 2000), Irã (1.7%) (Norouzy et al., 2005), Índia (8%) (Patel et al., 2007), Polônia (7.9%) (Czarnik et al., 2007), Alemanha (2.3%) (Schutz et al., 2008) e Paquistão (1%) (Nasreen et al., 2009). O primeiro relato no Reino Unido foi descrito por Andrews et al. (1996).

Outros estudos foram feitos para avaliar a influência da infecção por *Salmonella enterica* em bovinos holandeses de 1 a 5 semanas de vida com BLAD (Nunes et al., 2010) e também a apoptose neutrofilica bovinos holandeses de 1 a 3 meses de idade com BLAD (Nagahata et al., 2004). Análoga à manifestação dessa enfermidade em outras espécies, a base molecular da BLAD constitui-se de uma única mutação pontual (adenina para guanina) na posição 383 do gene do CD18, a qual provoca a substituição de um ácido aspártico por uma glicina no aminoácido 128 da glicoproteína (Nagahata, 2004).

No Brasil, o sêmen e embriões de bovinos da raça holandesa são importados para criação de rebanhos leiteiros. Além disso, o Brasil produz animais mestiços de Holandês e Gir sem controle para BLAD, o que leva a uma possibilidade de ocorrer transferência dessa mutação para os rebanhos de Gir, ainda que a frequência do alelo para BLAD no Brasil seja baixa (2.8%) (Ribeiro et al., 2000).

Devido ao acometimento de animais de produção, a mortalidade precoce provocada pela BLAD resulta em perdas econômicas, pois muitos animais morrem antes de chegar à fase adulta (maturidade sexual) devido às infecções recorrentes, mesmo após a implementação de tratamentos convencionais (Norouzy et al., 2005). Bezerros heterozigotos portadores de um alelo anormal para BLAD não têm seu crescimento comprometido, situação essa que não se reflete no caso de animais homozigóticos, onde geralmente a enfermidade é letal (Arrayet et al., 2002).

A existência de outra granulopatia canina congênita não relacionada a fatores genéticos

foi documentada, a qual exclui o diagnóstico de CLAD ainda que as manifestações clínicas sejam semelhantes em filhotes de cães mestiços (Kobayashi et al., 2009).

ENFERMIDADES QUE AMPLIFICAM A ADESÃO LEUCOCITÁRIA

Com relação às enfermidades que suscitam processo inflamatório, estas podem ser de natureza infecciosa ou não. O ponto de convergência é que se faz necessário a presença de um processo inflamatório que suscite o recrutamento de leucócitos e migração para um ambiente extravascular. Por exemplo, podem ser citados o evidenciamento da adesão leucocitária (nesse caso, sobretudo de monócitos) e plaquetas ao endotélio de pombos acometidos de aterosclerose (Lewis & Kottke, 1977).

A adesão leucocitária também está aumentada na meningite bacteriana em modelo murino, pois ainda que animais sejam pré-tratados com anticorpos anti-moléculas de adesão, esse processo não é suprimido, o que indica que outros fatores podem estar envolvidos devido à complexidade do estudo acerca da adesão leucocitária (Lechner et al., 2000).

Outras situações em que a adesão leucocitária foi estudada incluem a ruptura espontânea do ligamento cranial (CCL) em cães, uma enfermidade comum, foi verificado a presença de moléculas de adesão em função da presença de leucócitos no infiltrado inflamatório da membrana sinovial (Lemburg et al., 2004). Na reperusão sanguínea, a adesão leucocitária está aumentada ao se comparar ao processo isquêmico, revelando a importância desse fenômeno nas doenças coronarianas em modelo canino *in vivo* (Sheridan et al., 1996). Na uveíte induzida por endotoxinas em camundongos, foi observado um aumento significativo na adesão leucocitária, evidenciado pela análise do diâmetro das veias, expressão do gene da P-selectina e contagem de leucócitos em rolagem no endotélio (Yamashiro et al., 2001).

Em cães que apresentam atopia, uma enfermidade de alta incidência em cães e ainda pouco conhecida, a P-selectina se apresentou em quantidade quatro vezes maior em áreas lesionadas e com presença de infiltrado inflamatório do que nas áreas não lesionadas. A molécula de adesão ICAM-1 e a citocina TNF- α se apresentaram de forma semelhante em áreas lesionadas e não-lesionadas (Mora et al., 2007). Acrescentam-se à lista de moléculas de adesão envolvidas na atopia canina a E-selectina e

VCAM-1 em áreas não-lesionadas e de forma mais expressiva em áreas lesionadas (Vries et al., 2008).

Em relação às leishmanioses, sabe-se que a expressão de receptores de complemento do tipo 3 (CR3, CD11b/CD18), está relacionada tanto na adesão leucocitária como também na ligação do parasita *Leishmania donovani* aos fagócitos mononucleares em humanos (Wilson & Pearson, 1988) e em cães sintomáticos e assintomáticos para *Leishmania chagasi* no tecido hepático e esplênico (Lima et al., 2007). A atuação de CR3 em quadros de leishmaniose é ambígua, uma vez que pode ser vista como positiva ao promover o recrutamento de leucócitos para os sítios de infecção a fim de que o parasita seja eliminado, ou negativa por promover a ligação do próprio parasita às células de defesa, contribuindo assim para o mecanismo de evasão do agente invasor e para o desenvolvimento da doença (Lima et al., 2007).

Os processos neoplásicos merecem destaque no estudo da sua relação com as moléculas de adesão. A expressão de β 1-Integrina foi avaliada em glândula mamária canina normal, displásica e neoplásica, onde se demonstrou que grandes quantidades de β 1-Integrina estão presentes nas células epiteliais cobrindo os ductos e ácinos de tecido mamário normal, displásico e neoplásico benigno (Peña et al., 1994; Restucci et al., 1995). Curiosamente, em tumores malignos metastáticos houve um decréscimo na imunomarcagem de β 1 e α 5-integrinas (Restucci et al., 1995). Posteriormente, observou-se que há também um aumento significativo e heterogêneo na expressão de E-caderina ao se comparar a glândula mamária normal e neoplásica benigna de cães (Restucci et al., 1997). Devido ao fato dessa molécula ser responsável pela adesão entre as células, provavelmente está envolvida na promoção de uma maior solidificação do tumor, característico das neoplasias benignas. As células neoplásicas no sítio do tumor primário possuem um maior potencial metastazante porque há uma regulação negativa na expressão de E-caderina, o que promove um enfraquecimento das junções intercelulares e maior dispersão das células. Após a metastização, as células podem então recuperar a habilidade de sintetizar essa molécula. Reforçando esse conceito, a expressão de E-caderina e β -catenina se mantém preservada em tumores benignos de Merkel em cães (Costa et al., 2009).

Em seguimento ao supraexposto, a análise de P-caderina em diferentes tipos de tumores malignos caninos, tais como carcinomas sólidos,

carcinomas tubulopapilares, carcinomas complexos e carcinosarcomas foi conduzida. Identificou-se histologicamente a presença de P-caderina em todos os tipos de tumores estudados, enquanto que a expressão de E-caderina e β -catenina foi negativo em todos os sarcomas (Gama et al., 2008).

MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ADESÃO LEUCOCITÁRIA

Existem inúmeros passos para a destruição de agentes patogênicos, incluindo-se a migração leucocitária, o processo da quimiotaxia e da fagocitose entre outros (Muller, 2009). Consequentemente, vários testes *in vitro* são requeridos para avaliar a função dos leucócitos. Estes testes não estão disponíveis, em sua maioria, em laboratórios comerciais, mas são realizados, em um número limitado em laboratórios de pesquisa (Tabela 2).

Destaca-se um dos testes mais práticos e simples para avaliação da adesão leucocitária: o método de coluna. Esse método é fundamentado na propriedade dos leucócitos (sobretudo os polimorfonucleados) em se aderir a materiais não-fagocitáveis, como o plástico, nylon, vidro, etc. A adesão leucocitária pode ser estudada ao se submeter leucócitos a esses materiais, sendo previamente estimulados por substâncias químicas ou ativados em função de enfermidades. Os estudos que envolvem esse método começaram com Gavin nos anos 60, que utilizou pequenas esferas de vidro, as quais foram substituídas por fibras de nylon por MacGregor nos anos 70 e 80 (Macgregor et al., 1978). O método de MacGregor é uma modificação do método de Gavin e foi utilizado na avaliação de adesão na espécie humana estudando os efeitos do etanol e da lidocaína (Macgregor et al., 1978; Macgregor et al., 1980; Macgregor et al., 1988). Devido à necessidade de aumentar a praticidade desse método, as pipetas Pasteur foram substituídas por seringas de tuberculina em estudo com ratos, e foi preconizando a medida de 80 mg de fibra como ideal para estudos em modelos murinos, obtendo-se nível de adesão significativo. Nesse novo modelo foram avaliados os efeitos de anti-inflamatórios, ouro e cloroquina na inibição da adesão leucocitária em ratos (Stetcher et al., 1978). Os testes de quimiotaxia mensuram a habilidade dos neutrófilos de migrar na direção de vários quimioatrativos como C5a, leucotrieno B₄, linfocinas, monocinas, vários fatores estimuladores de colônia, PAF, produtos bacterianos etc. A habilidade de fagocitar microrganismos pode ser determinada

microscopicamente e a morte por fagocitose pode ser evidenciada por cultura de bactérias seguida de incubação com soro e neutrófilos. Os testes de redução tetrazólio nitroazul (NBT), espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e quimioluminescência detectam a presença de “burst” oxidativo. No entanto,

testes mais especializados são necessários para demonstrar a natureza específica de um defeito herdado (Meyer & Harvey, 1998; Willard et al., 1994).

Tabela 2. Métodos de avaliação da função leucocitária e seus respectivos princípios e aplicações.

MÉTODO	PRINCÍPIO/ USO
Teste de quimiotaxia	Avalia habilidade de migração dos neutrófilos em direção a um gradiente quimiotático (ex: C5a, linfocinas, monocinas, LPS, etc.)
Teste de fagocitose	Avaliação microscópica de culturas bacterianas incubadas com soro e neutrófilos
NBT (Teste de redução tetrazólio nitroazul), TBARS (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico), quimioluminescência	Avaliação de estresse oxidativo por mensuração de metabólitos oriundos desse processo
Citometria de fluxo	Evidencia deficiência de moléculas de adesão de superfície celular imunomarcadas
PCR	Análise molecular de distúrbios genéticos que podem levar ao aparecimento de CLAD e BLAD
Imunohistoquímica	Avaliação da presença de moléculas de adesão imunomarcadas
Método de coluna	Avaliação da taxa de adesão leucocitária. As principais variações desse teste são os de MacGregor (1978) e Wilkinson (1978)

A identificação de mutações específicas permite o uso de um número variado de técnicas para rastrear indivíduos e até mesmo populações acometidas (Jobling et al., 2003). Dentre os testes utilizados para confirmação de CLAD, BLAD ou de qualquer distúrbio na adesão leucocitária estão incluídos: hemograma evidenciando neutrofilia associado à baixa presença de neutrófilos na histologia devido à incapacidade de migração para os sítios inflamatórios, a capacidade adesiva e fagocitose mediada por C3b e/ou citometria de fluxo para evidenciar a deficiência de proteínas de adesão (Trowald-Wigh et al., 2000). A análise molecular pode demonstrar defeitos heterogêneos na integrina CD18 dos leucócitos (Bauer et al., 2004), como a PCR a partir do sangue (Nagahata et al., 2004) ou biópsia da pele (Ryncarz et al., 1995). Análise por pirosequenciamento ou teste de ligação de oligonucleotídeos (OLA) pode evidenciar animais com genótipo positivo para CLAD

(Kijas et al., 1999; Kijas et al., 2000). Homozigose para a mutação demonstrada pelo DNA também é uma forma de diagnóstico (Trowald-Wigh et al., 2000). O rastreamento do pedigree do animal por seis ou sete gerações é útil para se reduzir a probabilidade de presença do alelo defeituoso para 0% (Powell et al., 1996), o que também pode ser obtido por estimativa de frequência alélica (Nasreen et al., 2009). Existe ainda um kit diagnóstico baseado no DNA específico para CLAD que foi desenvolvido na Europa (Debenham et al., 2002).

Por meio da imunohistoquímica, pode-se confirmar um aumento marcante das moléculas CD11a, CD11c e CD18 na membrana sinovial de cães acometidos por ruptura de CCL quando compradas a amostras controle. No tecido inflamado, a intensa expressão de moléculas da família CD11/CD18 foi associada à presença de muitas células dendríticas e mononucleares e foi

positivamente correlacionada com a severidade do infiltrado inflamatório da sinóvia, sugerindo que essas moléculas participam do recrutamento local de leucócitos nesse tipo de sinovite (Lemburg et al., 2004).

A despeito da pouca literatura disponível, o estudo da adesão leucocitária é de extrema relevância na clínica médica veterinária. Desta forma, a presente revisão aborda desde os aspectos mais fundamentais acerca da etiologia, diagnóstico e fatores que interferem na homeostase dos mecanismos da adesão leucocitária.

REFERÊNCIAS

- Abram C.L. & Lowell C.A. 2009. The ins and outs of leukocyte integrin signaling. *Annu Rev Immunol* 27: 339-362.
- Adams D.H. & Nash G.B. 1996. Disturbance of leukocyte circulation and adhesion to the endothelium as factors in circulatory pathology. *Br J Anaesth* 77: 17-31.
- Andrews A.H., Fishwick J. & Waters, R.J. 1996. Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in a one year old Holstein-Friesian bull – The first report in the United Kingdom. *Br Vet J* 152: 347-352.
- Arrayet J.L., Oberbauer A.M., Famula, T.R., Garnett I., Oltjen J.W., Imhoof J., Kehrl M.E. & Graham T.W. 2002. Growth of Holstein calves from birth to 90 days: The influence of dietary zinc and BLAD status. *J Ani Sci* 80: 545-552.
- Barreiro O., Fuente H., Mittlebrunn M. & Sánchez-Madrid, F. 2007. Functional insights on the polarized redistribution of leukocyte integrins and their ligands during leukocyte migration and immune interactions. *Immunol Rev* 218: 147-164.
- Bauer T.R., Gu Y.C., Creevy K.E., Tuschong L.M., Embree L., Holland S.M., Sokolic, R.A. & Hickstein, D.D. 2004. Leukocyte adhesion deficiency in children and irish setter dogs. *Pediatr Res* 55: 363-367.
- Bauer T.R., Allen J.M., Hai M., Tuschong L.M., Khan I., Olson E.M., Adlenc R.L., Burkholder T.H., Gu Y.C., Russell, D.W. & Hickstein, D.D. 2008. Successful treatment of canine leukocyte adhesion deficiency by foamy virus vectors. *Nat Med* 14: 93-97.
- Bevilacqua M.P., Nelson R.M., Mannori G. & Cecconi O. 1994. Endothelial-Leukocyte adhesion molecules in human disease. *Annu Rev Med* 45: 361-78.
- Branum E., Cummins L., Bartilson M., Hopper M., Pruett S. & O'Brien J.F. 1988. Effect of two anticoagulants on leukocyte yield and function, and on lysosomal enzyme activity. *Clin Chem* 34: 110-113.
- Czarnik U., Grzybowski G., Kamiński S. & Prusak B. 2007. Effectiveness of a program aimed at the elimination of BLAD-carrier bulls from Polish Holstein-Friesian cattle. *J App Genet* 48: 375-377.
- Costa R.M.G., Rema A., Pires M.A. & Gartner, F. 2009. Two canine Merkel cell tumours: immunoeexpression of c-KIT, E-cadherin, β -catenin and S100 protein. *Vet Dermatol* 21:198-201.
- Debenham S.L., Millington A., Kijas T., Andersson L. & Binns, M. 2002. Canine leukocyte adhesion deficiency in Irish red and white setters. *J Small Ani Pract* 43: 74-75.
- Debey M.C. 2010. Primary immunodeficiencies of dogs and cats. *Vet Clin Small Ani* 40: 425-438.
- Degrendele H.C., Estess P., Picker L.J. & Siegelman M.H. 1996. CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: A novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway. *J Exp Med* 183: 1119-1130.
- Dhondt A., Vanholder R., Waterloos M.A., Glorieux, Smet, R. & Lameire, N. 1998. Citrate anticoagulation does not correct cuprophane bioincompatibility as evaluated by the expression of leukocyte surface molecules. *Nephrol Dial Transpl* 13: 1752-1758.
- Etzioni, A. 2010. Defects in the leukocyte adhesion cascade. *Clin Rev Allergy Immunol* 38: 54-60.
- Fésus L., Zsolnai A., Anton I., Bárányi I. & Bozó, S. 1999. BLAD genotypes and cow production traits in Hungarian Holsteins. *J Anim Breed Genet* 116: 169-174.
- Fordham J.N., Kirwan J., Cason J. & Currey, H.L.F. 1981. Prolonged reduction in polymorphonuclear adhesion following oral colchicine. *Ann Rheum Dis* 40: 605-608.
- Fouremant P., Whiteley M. & Giger, U. 2002. Canine leukocyte adhesion deficiency: presence of the cys36ser -2 integrin mutation in an affected us irish setter cross-breed dog and in us irish red and white setters. *J Vet Intern Med* 16: 518-523.
- Frenette P.S. & Wagner, D.D. 1996a. Medicine molecular – Part I. *N Engl J Med* 334: 23-27.
- Frenette P.S. & Wagner, D.D. 1996b. Medicine molecular – Part II. *N Engl J Med* 335: 43-45.
- Gama A., Paredes J., Gartner F., Alves A. & Schmitt, F. 2008. Expression of E-cadherin, P-cadherin and β -catenin in canine malignant mammary tumours in relation to clinicopathological parameters, proliferation and survival. *Vet J* 177: 45-53.
- Gu Y.C., Bauer T.R., Ackermann M.R., Smith C.W., Kehrl M.E., Starost M.F. & Hickstein, D.D. 2004. The genetic immunodeficiency disease, leukocyte adhesion deficiency, in humans, dogs, cattle, and mice. *Comparative Med* 54: 363-372.
- He P., Zhang H., Zhu L., Jiang Y. & Zhoy X. 2006. Leukocyte-platelet aggregate adhesion and vascular permeability in intact microvessels: role of activated endothelial cells. *Am J Physiol - Heart C* 291: 591-599.
- Holst B., Hagberg M., Lilliehook I. & Johannisson, A. 2011. Expression of four canine leukocyte adhesion factors in fresh and stored whole blood samples evaluated using a no-lyse, no-wash method. *Vet Immunol Immunopathol* 139: 271-276.
- Jánosa A., Baranyai B. & Dohy J. 1999. Comparison of milk production of the progeny of blad-carrier and healthy holstein bulls in hungary. *Acta Vet Hung* 47: p. 283 - 289.
- Jobling A., Ryan J. & Augusteyn R.C. 2003. The frequency of the canine leukocyte adhesion deficiency (CLAD) allele within the Irish Setter population of Australia. *Aust Vet J* 81: 763-765.
- Kijas J.M.H., Bauer T. R., Gafvert S., Marklund S., Trowald-Wigh S., Johanninsson A., Hedhammar A., Binns M., Juneja R.K., Hickstein D.D. & Andersson L.A. 1999. Missense mutation in the β_2 -integrins gene (ITGB2) causes

- canine leukocyte adhesion deficiency. *Genomics* 61: 101-107.
- Kijas J.M.H., Juneja R.K., Gafvert S. & Andersson, L. 2000. Detection of the causal mutation for canine leukocyte adhesion deficiency (CLAD) using pyrosequencing. *Ani Genet* 31: 326-328.
- Kobayashi S., Sato R., Abe Y., Inanami O., Yasui H., Omoe K., Yasuda J., Hankanga C., Oda S. & Sasaki J. 2009. Canine neutrophil dysfunction caused by downregulation of b2-integrin expression without mutation. *Vet Immunol Immunopathol* 130: 187-196.
- Lechner F., Sahrbacker U., Suter T., Frei K., Brockhaus M., Koedel U. & Fontana A. 2000. Antibodies to the junctional adhesion molecule cause disruption of endothelial cells and do not prevent leukocyte influx into the meninges after viral or bacterial infection. *J Infect Dis* 182: 978-82.
- Lemburg A.K., Meyer-Lindenberg A. & Hewicker-Trautwein M. 2004. Immunohistochemical characterization of inflammatory cell populations and adhesion molecule expression in synovial membranes from dogs with spontaneous cranial cruciate ligament rupture. *Vet Immunol Immunopathol* 97: 231-240.
- Lentnek A.L., Schreiber A.D. & Macgregor R.R. 1976. The induction of augmented granulocyte adherence by inflammation: mediation by a plasma factor. *J Clin Invest* 57: 1098-1103.
- Lewis J.C. & Kottke, B.A. 1977. Endothelial damage and thrombocyte adhesion in pigeon atherosclerosis. *Science* 196: 1007-1009.
- Lima W.G., Oliveira P.S., Caliani M.V., Gonçalves R., Michalick M.S.M., Melo M.N. & Tafuri W.L. 2007. Histopathological and immunohistochemical study of type 3 complement receptors (CD11b/CD18) in livers and spleens of asymptomatic and symptomatic dogs naturally infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol* 117: 129-136.
- Macgregor R.R., Macarak E.J. & Kefalides N.A. 1978. Comparative adherence of granulocytes to endothelial monolayers and nylon fiber. *J Clin Invest* 61: 697-702.
- Macgregor R.R., Thorner R.E. & Wright D.M. 1980. Lidocaine inhibits granulocyte adherence and prevents granulocyte delivery to inflammatory sites. *Blood* 56: 203-209.
- Macgregor R.R., Safford M. & Shalit, M. 1988. Effect of ethanol on functions required for the delivery of neutrophils to sites of inflammation. *J Infect Dis* 157: 682-689.
- Mazzone A. & Ricevuti, G. 1995. Leukocyte CD11/CD18 integrins: biological and clinical relevance. *Haematologica* 80: 161-175.
- Mccullough J., Carter S.J. & Quie, P.G. 1974. Effects of anticoagulants and storage on granulocyte function in bank blood. *Blood* 43: 207-217.
- Mcever R.P. & Zhu C. 2010. Rolling cell adhesion. *Ann Rev Cell Dev Biol* 26: 1-34.
- Mcgill J. & Phair J.P. 1979. Polymorphonuclear leukocyte adherence to nylon: effect of oral corticosteroids. *Infect Immun* 26: 542-546.
- Mcgill J., Patterson R. & Phair J.P. 1980. Adherence of polymorphonuclear leukocytes to nylon: modulation by prostacyclin (PGI₂), corticosteroids, and complement activation. *J Infect Dis* 141: 382-388.
- Meyer D.J. & Harvey J.W. 1998. Veterinary laboratory medicine: Interpretation & Diagnosis. *Saunders Company*. 392 p.
- Mora F., Fuente C., Jasmin P., Gatto H., Marco A., Ferrer L., Fondati A., Fondevila D. & Torres R. 2007. Evaluation of the expression of P-selectin, ICAM-1 and TNF-alpha in bacteria-free lesional skin of atopic dogs with low-to-mild inflammation. *Vet Immunol Immunopathol* 115: 223-229.
- Muller W.A. 2009. Mechanisms of transendothelial migration of leukocytes. *Circ Res* 105: 223 - 230.
- Muller W.A. 2011. Mechanisms of leukocyte transendothelial migration. *Ann Rev Pathol* 6: 323-344.
- Nagahata H. & Higuchi H. 1996. Biosynthesis of B₂-integrin, intracellular calcium signalling and functional responses of normal and CD18-deficient bovine neutrophils. *Res Vet Sci* 61: 95-101.
- Nagahata H. 2004. Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD): A review. *The J Vet Med Sci* 66: 1475-1482.
- Nasreen F., Malik N.A., Riaz M.N. & Quresh J.A. 2009. Detection and screening of bovine leukocyte adhesion deficiency in Pakistan using molecular methods. *Hereditas* 146: 74-78.
- Norouzy A., Nassiry M.R., Shahrody F.E., Javadmanesh A., Abadi M.R.M. & Sulimova G. E. 2005. Identification of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) carriers in Holstein and Brown swiss AI bulls in Iran. *Genetika* 41: 1409-1413.
- Nunes J.S., Lawhon S.D., Rosseti C.A., Khare S., Figueiredo J.F., Gull T., Burghardt R.C., Baumler A.J., Tsolis R.M. & Adams L.G. 2010. Morphologic and cytokine profile characterization of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* infection in calves with bovine leukocyte adhesion deficiency. *Vet Pathol* 47: 322-333.
- Nunes-Pinheiro D.C.S. 1995. Estudo do tráfego linfocitário e sua modulação em camundongos, in vivo. 118p. (Tese de Doutorado) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, Brasil.
- Nunes-Pinheiro D.C.S. 2000. Migração linfocitária. *Cienc Anim* 10: 66-69.
- Patel R.K., Singh K.M., Soni K.J., Chauhan J.B. & Rao K.R.S.S. 2007. Low incidence of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) carriers in India cattle and buffalo breeds. *J App Genetics* 48: 153-155.
- Peña L., Nieto A., Perez Alenza M.D., Rodriguez A., Sanchez, M.A. & Castaño, M. 1994. Expression of fibronectin and its integrin receptor α5β1 in canine mammary tumours. *Res Vet Sci* 57: 358-364.
- Pfeiffer I. & Brenig B. 2005. Frequency of the canine leukocyte adhesion deficiency (CLAD) mutation among Irish red setters in Germany. *J Ani Breed Genet* 122: 140-142.
- Pfister R.R., Haddox J.L. & Snyder T.L. 1988. The effects of citrate on the adherence of neutrophils to nylon fibers in vitro. *Invest Ophth Vis Sci* 29: 869-75.
- Powell R.L., Horman H.D. & Cowan, C.M. 1996. Relationships of bovine leukocyte adhesion deficiency with genetic merit for performance traits. *J Dairy Sci* 79: 895-899.

- Restucci B., De Vico G. & Maiolino P. 1995. Expression of β 1-Integrin in normal, dysplastic and neoplastic canine mammary gland. *J Comp Pathol* 113: 165-173.
- Restucci B., Papparella S., De Vico G. & Maiolino, P. 1997. E-Cadherin expression in normal and neoplastic canine mammary gland. *J Comp Pathol* 116: 191-202.
- Ribeiro L.A., Baron E.E., Martinez M.L. & Coutinho L.L. 2000. PCR screening and allele frequency estimation of bovine leukocyte adhesion deficiency in Holstein and Gir cattle in Brazil. *Genet Mol Biol* 23: 831-834.
- Rose D.M., Alon R. & Ginsberg M.H. 2007. Integrin modulation and signaling in leukocyte adhesion and migration. *Immunol Rev* 218: 126-134.
- Ryncarz R.E., Dietz A.B. & Kehrl M.E. 1995. Recognition of leukochimerism during genotyping for bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) by polymerase-chain-reaction-amplified DNA extracted from blood. *J Vet Diagn Invest* 7: 569-572.
- Sheridan F.M., Cole P.G. & Ramage, D. 1996. Leukocyte adhesion to the coronary microvasculature during ischemia and reperfusion in an in vivo canine model. *Circulation* 93: 1784-1787.
- Schutz E., Scharfenstein M. & Brenig B. 2008. Implication of complex vertebral malformation and bovine leukocyte adhesion deficiency. DNA-based testing of frequency in the Holstein population. *J Dairy Sci* 91: 4854-4859.
- Stetcher V.J. & Chinea G.L. 1978. The neutrophil adherence assay as a method for detecting unique anti-inflammatory agents. *Inflamm Res* 8: 259-262.
- Sullivan K.E. 2000. Defects in adhesion molecules. *Clin Rev Allergy Immunol* 19: 109-122.
- Tang D., Kang R., Coyne C.B., Zeh H.J., & Lotze M.T. 2012. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev* 249: 158-175.
- Tedder T.F., Steeber D.A., Chen A. & Engel P. 1995. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J* 9: 866-873.
- Trowald-Wigh G., Ekman K., Hansson A., Hedhammar A. & Segerstad C.H. 2000. Clinical, radiological and pathological features of 12 Irish setters with canine leukocyte adhesion deficiency. *J Small Anim Pract* 41: 211-217.
- Venezio F.R., Divicenzo C., Pearlman F. & Phair J.P. 1985. Effects of the newer nonsteroidal anti-inflammatory agents, ibuprofen fenoprofen, and sulindac on neutrophil adherence. *J Infect Dis* 152: 690-694.
- Vries J.I., Langeveld-Wildschut E.G., Reijnsen F.C., Dubois G.R., Hoek A.V., Bihari I.C., Wichen D., Weger R.A., Knol E.F., Thepen T. & Bruijnzeel-Koomen C.A.F.M. 2008. Adhesion molecule expression on skin endothelia in atopic dermatitis: Effects of TNF- α e IL-4. *J Allergy Clin Immunol* 102: 461-468.
- Willard M.D., Tvedten H. & Turnwald G.H. 1994. Small animal clinical diagnosis by laboratory methods. *Saunders Company*, 448p.
- Wilson, M.E. & Pearson R.D. 1988. Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. *Infect Immun* 56: 363-369.
- Wong C.W., Dye D.E. & Coombe D.R. 2012. The role of immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules in cancer metastasis. *Int J Cell Biol* 2012: 1-9.
- Yamashiro, K., Kiryu, J., Tsujikawa, A., Honjo, M., Nonaka, A., Miyamoto, K., Honda, Y., Tanihara, H., Ogura, Y. 2001. Inhibitory effects of antithrombin III against leukocyte rolling and infiltration during endotoxin-induced uveitis in rats. *Invest Ophth Vis Sci* 42: 1553-1560.