

METODOLOGIA E INTERPRETAZIONE DELLE BIOPSIE DI MUSCOLO E NERVO

CLAUDIA SALVADORI, CARLO CANTILE, MARIO ARISPICI

Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi e Igiene degli Alimenti, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Pisa

Riassunto

Le malattie neuromuscolari rappresentano patologie dell'unità motoria coinvolgendo gli assoni dei motoneuroni e/o le fibre muscolari da questi innervate. Si distinguono quindi neuropatie, patologie della placca neuromuscolare e miopatie. Il sintomo comune e caratteristico delle malattie neuromuscolari è la debolezza che può variare per gravità e distribuzione. Un corretto "work up" clinico seguito da esami di laboratorio specifici e dall'elettromiografia è importante per una corretta localizzazione anatomica del processo patologico. La biopsia muscolare e la biopsia di nervo periferico, se eseguite correttamente, possono fornire dettagli importanti per la diagnosi, per la prognosi e l'indicazione di specifiche terapie. Una diagnosi corretta e definitiva in caso di patologia neuromuscolare può essere raggiunta però solo tramite un approccio integrato tra indagine clinica, diagnostica strumentale ed esame istologico. In questo lavoro sono descritte le principali caratteristiche cliniche e patologiche delle malattie neuromuscolari del cane e del gatto e sono riportate indicazioni pratiche per l'esecuzione e il trattamento delle biopsie di muscolo e nervo periferico.

Summary

Neuromuscular diseases result from pathologic processes directed against the motor unit involving the axons of motoneurons and/or the muscle fibres they innervate. Consequently, neuromuscular diseases are classified as neuropathies, disorders of neuromuscular transmission and myopathies. The clinical sign which characterizes all these disorders is weakness that can vary on the basis of severity and distribution. A correct clinical work up associated with specific laboratory tests and electromyography is crucial to achieve an anatomic localization of the disorder. Muscle and nerve biopsies, if correctly performed, can give important information to reach the diagnosis and to indicate the prognosis. An accurate diagnosis of neuromuscular disease can be achieved only with an integrated approach by clinical examination, electrodiagnostic methods and histological investigation. In this work, the main clinical and pathological features of the neuromuscular disorders of dogs and cats are reviewed and practical information to perform and processing muscle and nerve biopsies are provided.

INTRODUZIONE

L'interesse e le conoscenze nell'ambito delle malattie neuromuscolari del cane e del gatto hanno subito una notevole espansione negli ultimi anni soprattutto grazie alla maggiore specializzazione dei clinici e alla disponibilità di attrezzature più sofisticate così come al maggior interesse dei patologi e della ricerca in questo campo. Le malattie neuromuscolari rappresentano patologie complesse per le quali formulare una diagnosi richiede specifiche competenze anche nel campo della patologia, parallelamente alla specializzazione in ambito clinico. Per una diagnosi, talvolta anche di tipo eziologico, è necessaria infatti l'analisi istomorfológica del tessuto muscolare così come del nervo periferico attraverso l'esame di campioni biotipici seguendo una metodologia corretta di prelievo, conservazione e colorazione delle biopsie applicando metodiche di labora-

torio mirate al sospetto diagnostico. Tutto questo deve essere seguito da una precisa interpretazione delle lesioni, possibile solo attraverso la conoscenza delle patologie neuromuscolari da parte del neuropatologo.

Lo scopo del presente lavoro è di descrivere le caratteristiche cliniche e patologiche delle malattie neuromuscolari nel cane e nel gatto per facilitare la diagnosi clinica e l'interpretazione del referto istopatologico di biopsie muscolari e di nervo periferico.

LE PATOLOGIE NEUROMUSCOLARI

Le malattie neuromuscolari sono patologie che interessano la cosiddetta unità motoria. Con tale termine si intende il complesso formato dal motoneurone situato nelle corna ventrali del midollo spinale o nei nuclei motori dei nervi cranici, il suo lungo assone che raggiunge i muscoli periferici, la placca neuromuscolare tramite la quale lo stimolo nervoso è trasmesso al muscolo e le fibre muscolari innervate dall'assone stesso.^{1,2} Qualunque patologia che interes-

¹ "Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 15/1/2006 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 10/5/2006".

Tabella 1
Classificazione clinico-patologica delle patologie neuromuscolari
 (modificata da Shelton, 2003)³

LOCALIZZAZIONE ANATOMICA	CLASSIFICAZIONE PATOLOGICA
MOTONEURONE Soma neuronale	NEUROPATIE Centrali Malattia del motoneurone Periferiche
Assone Cellula di Schwann Assone e cellula di Schwann	Assonopatie Malattie demielinizzanti Neuropatie miste
PLACCA NEUROMUSCOLARE	MALATTIE DELLA TRASMISSIONE NEUROMUSCOLARE
Sintesi e rilascio di acetilcolina Acetilcolinesterasi Recettori per l'acetilcolina	Patologie presinaptiche Patologie dello spazio sinaptico Patologie postsinaptiche
FIBRE MUSCOLARI	MIOPATIE

sa una delle componenti dell'unità motoria causa una sintomatologia tipica di malattia neuromuscolare.² Quindi, a seconda della componente anatomica colpita, le patologie neuromuscolari si distinguono in neuropatie, patologie della placca neuromuscolare e miopatie (Tab. 1).³ Il sintomo comune a tutte le patologie neuromuscolari è la debolezza che può essere accompagnata da alterazioni dell'andatura, paresi, paralisi o alterazioni delle funzioni viscerali quali ad esempio disfagia, rigurgito, disfonia e dispnea.³

“WORK UP” CLINICO PER LE PATOLOGIE NEUROMUSCOLARI

Un approccio clinico corretto all'esame di un animale con sospetta patologia neuromuscolare deve essere innanzitutto volto ad escludere qualsiasi malattia che possa mimare una malattia muscolare o una malattia a carico del nervo periferico come patologie cardiovascolari, patologie ortopediche, cause neurologiche centrali di debolezza e patologie metaboliche sistemiche.⁴ Un corretto segnalamento e un'anamnesi dettagliata rappresentano il primo passo fondamentale per la diagnosi. Molte patologie neuromuscolari sono infatti descritte in razze specifiche e molte di queste patologie congenite o ereditarie si manifestano subito dopo la nascita o nei primi mesi di vita dell'animale. È fondamentale investigare sulla dieta per escludere eventuali deficienze vitaminiche o di altri elementi, sulle vaccinazioni effettuate e su eventuali esposizioni a sostanze tossiche. È utile anche la valutazione della capacità dell'animale di prensione, masticazione e deglutizione dell'alimento e dell'acqua così come di una eventuale alterazione della vocalizzazione in quanto la funzionalità faringea e laringea possono essere alterate nelle patologie neuromuscolari. Il tipo di progressione della sintomatologia è importante per capire se si tratta di una patologia cronica, episodica o se i sintomi peggiorano con l'esercizio.²

Un completo esame fisico e neurologico deve seguire la raccolta di informazioni anamnestiche con particolare attenzione al trofismo muscolare per evidenziare atrofia o ipertrofia, alterazione dell'andatura, della propriocezione e della sensibilità. L'esame neurologico e la valutazione

della temperatura corporea dovrebbero essere ripetuti prima e dopo esercizio.⁴

Esami ematologici e biochimici di routine così come l'esame delle urine devono completare la visita clinica. Il dosaggio della creatinfosfochinasi nel siero può essere indicativo di patologia muscolare attiva e i valori più elevati si riscontrano in corso di distrofie muscolari o mionecrosi. I livelli di creatinfosfochinasi comunque possono essere normali in corso di patologie muscolari come nel caso della miopatia ereditaria del Labrador Retriever, così come possono essere elevati anche per altre cause come il decubito prolungato, iniezioni, traumi o l'anorexia nel gatto.⁴ Tra i test di laboratorio più specifici è utile la determinazione delle concentrazioni di lattato e piruvato pre- e post-esercizio in casi di sospette patologie mitocondriali, la titolazione degli anticorpi per infezione da *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*,⁴ la titolazione degli auto-anticorpi contro le fibre di tipo IIM per casi di miosite dei muscoli masticatori, la titolazione degli auto-anticorpi contro i recettori per l'acetilcolina in casi di miastenia gravis acquisita,² così come la valutazione della funzionalità tiroidea e surrenalica per escludere casi di ipotiroidismo e ipercorticosurrenalismo, quali cause frequenti di patologie neuromuscolari.⁴

Gli esami più specifici per indagare il sistema neuromuscolare sono gli studi di elettrodiagnostica. Questi comprendono l'elettromiografia (EMG), la valutazione della velocità di conduzione nervosa motoria e sensitiva, la valutazione della funzionalità della placca neuromuscolare tramite il test di stimolazione ripetitiva sopramassimale e la valutazione della funzionalità delle radici nervose dorsali e ventrali attraverso i potenziali evocati somatosensitivi delle corna dorsali e le onde F.⁵ L'EMG valuta la stabilità delle membrane delle fibre muscolari e negli animali si basa sulla registrazione e sullo studio dei potenziali di inserzione e dei potenziali spontanei delle fibre muscolari.⁵ I risultati degli esami elettrodiagnostici permettono già una prima interpretazione dei segni clinici con riconoscimento di patologie assonali, patologie della mielina e patologie miopatiche e una valutazione della loro distribuzione e della loro gravità.⁴ L'EMG è inoltre uno strumento utilissimo per valutare il sito da sottoporre a biopsia.⁴ Una esauriente revisione degli studi di elettrodiagnostica non è comunque tra gli scopi del presente lavoro e può essere reperita nelle pubblicazioni di Braund (1994)⁶ e Cuddon (2002).⁵

LA SINDROME MIOPATICA

Generalmente le miopatie sono caratterizzate da una distribuzione diffusa, bilaterale e simmetrica coinvolgendo i muscoli degli arti e/o i muscoli del tronco.^{7,8} La sindrome miopatica è caratterizzata da debolezza generalizzata, intolleranza all'esercizio con facile affaticabilità, andatura rigida talvolta saltellante e ventroflexione della testa e del collo. I riflessi spinali sono generalmente conservati a parte negli stadi finali di malattia caratterizzati da estrema debolezza muscolare o in miopatie specifiche come nella miopatia ereditaria del Labrador Retriever in cui si ha una riduzione/assenza del riflesso patellare. Nelle miopatie la percezione sensitiva e dolorifica rimane conservata e generalmente si presentano con atrofia muscolare. Tra le ecce-

zioni ricordiamo le sindromi miotoniche e la distrofia muscolare felina caratterizzata da ipertrofia dei muscoli prossimali degli arti, del collo e della lingua.⁹

La miosite dei muscoli masticatori rappresenta una miopatia localizzata caratterizzata da trisma mandibolare, atrofia e dolorabilità dei muscoli interessati e talvolta esoftalmo.^{7,8}

La biopsia muscolare è quindi indicata nei casi di debolezza persistente, atrofia o ipertrofia muscolare, mialgia, facile affaticabilità con l'esercizio, rigurgito, disfagia o disfonìa, concentrazioni elevate e durature di creatinfosfochinasi e alterazioni miopatiche all'EMG. È utile sottolineare che la biopsia muscolare non si rivela utile in patologie come la miastenia gravis o la miotonia congenita per le quali altre indagini, rispettivamente la sierologia e l'EMG, permettono di emettere una diagnosi definitiva.^{3,6}

LA BIOPSIA MUSCOLARE

La scelta del muscolo quale sede di biopsia è di fondamentale importanza per arrivare ad una diagnosi. Lo scopo è di prelevare un muscolo colpito dal processo patologico in atto, ma che non sia già ad uno stadio terminale della malattia mostrando marcata atrofia.^{6,10} In quest'ultimo caso istologicamente sarebbero visibili solo alterazioni terminali quali grave atrofia miofibrile e fibrosi. In casi di sintomatologia generalizzata, l'EMG rappresenta un ottimo strumento per selezionare i muscoli da sottoporre a prelievo evitando di effettuare la biopsia nei punti di infissione degli aghi dell'elettromiografo.¹⁰ Generalmente si preferisce prelevare muscoli per i quali in letteratura siano disponibili i normali riferimenti morfometrici quali composizione miofibrile e diametro medio delle fibre e tra questi i siti migliori sono per gli arti pelvici, il muscolo bicipite femorale, il vasto laterale, il capo laterale del gastrocnemio e il tibiale craniale mentre per gli arti toracici sono il capo lungo e il capo mediale del muscolo tricipite brachiale e il muscolo flessore superficiale delle dita.⁶ La metodica chirurgica con incisione della cute, sottocute e fascia muscolare è preferibile al prelievo con punch transcutaneo perché permette di ottenere un campione di dimensioni e orientamento adeguati.^{6,10} Deve essere infatti prelevato un campione cilindrico lungo circa 1,5 cm, largo e spesso 1 cm in cui le fibre siano orientate longitudinalmente secondo la lunghezza del cilindro.⁶ L'orientamento delle miofibre nel campione è fondamentale in quanto permette un corretto posizionamento del campione nella fase di congelamento e l'ottenimento di sezioni trasversali, ottimali per la valutazione istomorfologica del tessuto muscolare. La biopsia dovrebbe essere effettuata a livello del ventre muscolare evitando le zone di inserzione tendinea e le aponeurosi dove le caratteristiche istologiche possono essere alterate.¹⁰

Il cilindro di muscolo ottenuto deve essere avvolto in una garza inumidita con soluzione fisiologica e posto in una provetta di vetro con tappo in gomma per evitare la disidratazione.⁶ I campioni non devono essere immersi in soluzione fisiologica, né devono essere congelati. Il campione deve essere inviato al laboratorio accompagnato da una mattonella refrigerante e deve pervenire entro le 24-36 ore dal prelievo. Un secondo campione muscolare può essere inviato fissato in formalina.

All'arrivo in laboratorio il campione fresco viene congelato per immersione in isopentano preraffreddato in azoto liquido e conservato a -80°C .⁶ Tramite criostato vengono eseguite sezioni seriali che sono colorate con metodi istologici e istochimici di routine quali ematossilina-eosina e tricromica di Gomori (entrambe utili per la valutazione della forma e delle dimensioni delle miofibre, per la valutazione del tessuto connettivo endomisiale e perimysiale e per l'evidenziazione di cellule infiammatorie),¹¹ PAS (per l'evidenziazione di accumuli di polisaccaridi intramiofibrili),^{11,12} Oil Red O (per l'evidenziazione dei lipidi intramiofibrili)¹² e metodi istoenzimatici specifici per il tessuto muscolare quali l'ATPasi con preincubazione acida e alcalina per la tipizzazione miofibrile,^{6,12} l'esterasi per la valutazione delle esterasi non specifiche (presenti nei lisosomi e nelle placche neuromuscolari)¹² e le reazioni istoenzimatiche per la valutazione del pattern enzimatico ossidativo miofibrile quali SDH (succinicodeidrogenasi), NADH-TR (nicotinamide adeninucleotide-tetrazoliodreduttasi),^{6,12} e COX (citocromossidasi).^{3,13} L'importanza di poter disporre di campioni freschi congelati è legata proprio alla necessità di eseguire specifiche tecniche istoenzimatiche per la tipizzazione miofibrile e la localizzazione degli enzimi ossidativi.

La disponibilità del campione fissato in formalina è utile per poter effettuare indagini di microscopia elettronica utili ad esempio per valutare la morfologia mitocondriale o miofibrillare così come indagini di immunoistochimica per la rivelazione di antigeni di *Toxoplasma gondii* o *Neospora caninum* o per la tipizzazione degli infiltrati infiammatori. L'immunoistochimica è un'indagine sensibile anche per la caratterizzazione delle distrofie del cane e del gatto tramite la valutazione della presenza di proteine quali distrofina, sarcoglicano o $\alpha 2$ laminina.¹⁴ I risultati che si ottengono da queste indagini immunoistochimiche possono guidare eventuali indagini genetiche per il riconoscimento di specifiche mutazioni.¹⁵ Le indagini di immunoistochimica così come quelle di immunofluorescenza per la valutazione della presenza di distrofina, distroglicano o $\alpha 2$ laminina possono comunque essere eseguite anche sul campione fresco congelato.^{15,16}

INTERPRETAZIONE ISTOPATOLOGICA DELLE BIOPSIE MUSCOLARI

L'interpretazione delle lesioni riscontrabili nelle biopsie muscolari è basata su una classificazione di tipo patogenetico. Infatti si riconoscono miopatie primarie nelle quali le miofibre sono la sede dell'alterazione patologica primitiva e miopatie secondarie per coinvolgimento primario del nervo periferico. Il trofismo muscolare è infatti strettamente dipendente dall'innervazione, per cui in casi di denervazione il muscolo va incontro ad atrofia neurogena. Quest'ultima è caratterizzata dalla presenza di fibre atrofiche di forma angolare a causa della pressione causata dalle fibre circostanti normalmente innervate e da fibre ipertrofiche (Fig. 1). Le fibre atrofiche possono anche essere riunite in piccoli e grandi gruppi di atrofia a seconda del numero degli assoni coinvolti nella degenerazione.^{1,10} L'atrofia muscolare neurogena cronica è caratterizzata da residui sarcoplasmatici ("nuclear bags") compatibili con stadi ter-

minali di atrofia miofibrile nei quali residuano solo porzioni minime di sarcoplasma con i nuclei (Fig. 1), da necrosi e miofagocitosi, fibrosi a distribuzione perimisiale e dai cosiddetti raggruppamenti miofibrili.¹⁰ Quest'ultimi rappresentano l'esito della reinnervazione. Infatti l'assone innervante determina il tipo biochimico della miofibrilla (I, IIA ecc.) e in condizioni normali le diverse fibre sono disposte a formare un mosaico in cui i vari tipi istochimici sono regolarmente distribuiti.^{1,10} Quando un assone degenera, quello ad esso adiacente va ad innervare le miofibrille rimaste denervate e queste assumono tutte lo stesso tipo biochimico per cui si creano gruppi di fibre identiche sotto il profilo metabolico (Fig. 2).

Con il termine "neuromiopia" si intende un processo patologico che interessa contemporaneamente sia il nervo

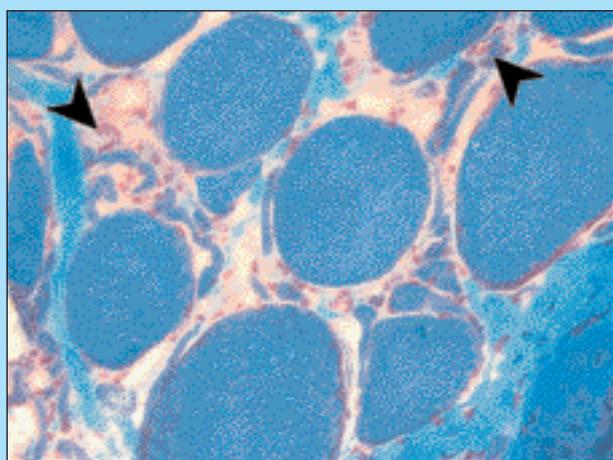


FIGURA 1 - Miopia neurogena cronica attiva. Il muscolo mostra marcato polimetriso miofibrile con numerose fibre atrofiche angolari e fibre ipertrofiche. Si osservano anche gruppi di residui sarcoplasmatici ("nuclear bags") (punte di freccia) e moderata fibrosi perimisiale. Gatto, Europeo, femmina, 1 anno, presentato per debolezza progressiva degli arti posteriori. L'elettromiografia evidenziava potenziali di fibrillazione e onde acute positive soprattutto a livello dei muscoli degli arti posteriori. Muscolo tibiale craniale (Tricromica di Gomori).

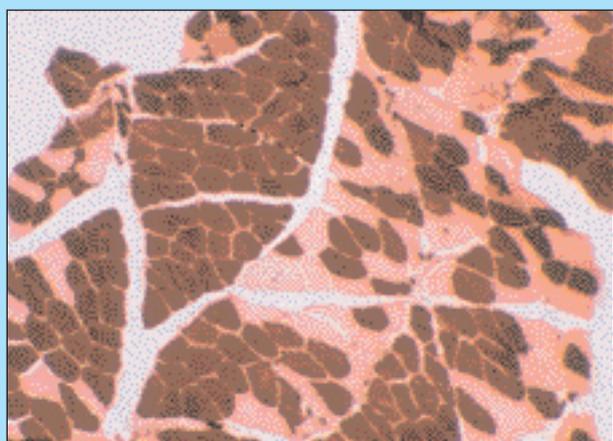


FIGURA 2 - Miopia neurogena cronica attiva. Si osserva lieve alterazione delle dimensioni miofibrili con sparse fibre atrofiche angolari e un intero fascicolo composto unicamente da fibre di tipo I (raggruppamento miofibrile). Cane, Boxer, femmina, 6 anni, presentato per progressiva paraparesi, deficit propriocettivi e deficit dei riflessi spinali soprattutto a carico degli arti posteriori con marcata atrofia muscolare. Muscolo tibiale craniale (ATPasi pH 4,3).

periferico che il muscolo scheletrico e quindi dove le alterazioni delle fibre muscolari non sono conseguenti a denervazione, ma causate dalla stessa patologia coinvolgente anche il nervo. Un esempio classico è la neuromiopia ischemica, frequente nel gatto colpito da tromboembolismo ilioaortico, spesso conseguente a cardiomiopia ipertrofica.¹⁷ I gatti presentano un'insorgenza improvvisa di paraparesi/parapalisi, con perdita della sensibilità dolorifica negli arti posteriori, assenza del polso femorale e cuscinetti digitali che appaiono freddi e cianotici.¹⁸ I nervi periferici mostrano degenerazione assonale e demielinizzazione secondaria più grave nelle regioni centrali dei fascicoli nervosi,^{17,19} mentre i muscoli, soprattutto il tibiale craniale e il gastrocnemio, presentano vari gradi di necrosi miofibrile.^{17,18}

Numerose miopatie primarie sono descritte nel cane e nel gatto (Tab. 2). Le miopatie primarie sono caratterizzate dalla presenza di polimetriso miofibrile con fibre atrofiche ma di forma rotondeggiante, presenza di nuclei centrali alla miofibrilla, necrosi e rigenerazione miofibrile, accumuli intramiofibrili di glicogeno, lipidi o di mitocondri anomali.^{1,3,10} Le alterazioni miofibrili sono accompagnate generalmente da fibrosi endomisiale e perimisiale.³

Le miopatie primarie più frequentemente riscontrate nel cane e nel gatto sono le miopatie infiammatorie.²⁰ Nel cane la miopia infiammatoria più frequente è la miosite dei muscoli masticatori che può colpire cani di qualsiasi sesso ed età anche se le razze di grossa taglia sembrano predisposte,²¹ ed è causata dalla produzione di autoanticorpi diretti contro le fibre di tipo IIM tipiche ed uniche dei muscoli originati dalla prima coppia di archi branchiali (muscolo temporale, massetere, pterigoideo laterale e mediale, tensore del timpano e tensore del velo palatino).^{22,23} Istologicamente è caratterizzata dalla presenza di infiltrati infiammatori multifocali composti prevalentemente da linfociti B, plasmacellule, macrofagi e talvolta granulociti neutrofili ed eosinofili.¹⁶ Precocemente nel corso della malattia si sviluppa fibrosi perimisiale ed endomisiale che compromette la normale funzionalità dei muscoli con la comparsa di trisma mandibolare anche in anestesia profonda.^{20,23,24}

Il termine polimiosite indica invece una patologia infiammatoria generalizzata o multifocale.²⁰ Per quando riguarda il cane la maggior parte delle forme di polimiosite sono di natura idiopatica con sospetta patogenesi immuno-mediata e istologicamente sono caratterizzate da infiltrati infiammatori perimisiali ed endomisiali composti prevalentemente da cellule dendritiche, macrofagi e linfociti T CD8⁺¹⁶ con fagocitosi di fibre non necrotiche (Fig. 3). Sono predisposti a queste forme di polimiosite, cani adulti/anziani di razze di grossa taglia che manifestano progressiva debolezza e intolleranza all'esercizio, andatura rigida, lordosi, ventroflexione del collo e dolore muscolare.²³ In una minoranza dei casi la polimiosite può rappresentare anche una sindrome pre-neoplastica generalmente con sviluppo di linfoma entro i dodici mesi successivi alla diagnosi.²⁰ Le forme di miosite a distribuzione generalizzata possono avere anche una eziologia infettiva (*Neospora caninum*, *Ehrlichia canis* ecc.) oppure possono essere espressione di una sindrome paraneoplastica o di ipersensibilità/tossicità da farmaci (Tab. 2).^{3,23} Le miositi causate da protozoi quali *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* col-

Tabella 2
Classificazione delle miopatie nel cane e nel gatto
 (modificata da Shelton, 2003)³

1. MIOPATIE DEGENERATIVE

a. Miopatie endocrine

- Miopatia da ipotiroidismo
- Miopatia da iperadrenocorticismo (Cushing)
- Miopatia da steroidi

b. Miopatie metaboliche

- Patologie del metabolismo del glicogeno (glicogenosi)
 - Glicogenosi tipo II – Lapland dogs
 - Glicogenosi tipo III – Pastore Tedesco e Akita
 - Glicogenosi tipo IV – Norvegese delle Foreste
 - Glicogenosi tipo VII – Cocker e Springer Spaniel
- Patologie del metabolismo lipidico
 - Deficienza di carnitina primaria e secondaria
 - Miopatie non classificate associate ad acidemia lattica
- Patologie mitocondriali
 - Deficienza di citocromo c ossidasi – Bobtail
 - Deficienza di piruvato deidrogenasi – Clumber e Sussex Spaniels
 - Miopatia mitocondriale del Jack Russel Terrier
- Alterazioni elettrolitiche
 - Alterazioni acquisite del metabolismo del sodio, potassio e fosforo
 - Somministrazione di diuretici
 - Ipotassiemia congenita del Burmese

c. Miopatie razza-specifiche (degenerative o ereditarie)

- Distrofie muscolari
 - Deficienza di distrofina
 - Deficienza di $\alpha 2$ laminina
 - Deficienza di sarcoglicano
- Sindromi miotoniche
 - Miotonia congenita
 - Distrofia miotonica
- Miscellanea
 - Miopatia ereditaria del Labrador Retriever
 - Miopatia “central core-like” - Alano
 - Miopatia “nemaline rod” - Border Collie e gatto
 - Miopatia distale – Rottweiler
 - Miopatia da accumulo di desmina – Meticcio

2. MIOPATIE INFIAMMATORIE

a. Miositi infettive

- Parassiti (Neosporosi, Toxoplasmosi, etc.)
- Batteri (Leptosirosi, Clostridiosi, etc.)
- Rickettsie (*Ehrlichia canis*)
- Virus (FIV)
- Funghi (Sporotricosi, micosi sistemiche)

b. Miositi idiopatiche o autoimmuni

- Miosite dei muscoli masticatori
- Polimiosite
- Dermatomiosite

c. Miositi associate a patologie del tessuto connettivo

- Lupus eritematoso sistemico

d. Miositi paraneoplastiche

- Timoma
- Linfoma
- Mastocitoma
- Altre neoplasie

e. Miositi indotte da farmaci

- D-penicillamina
- Cimetidina
- Trimethoprim-sulfadiazina

3. MIOPATIE VASCOLARI

- Neuromiopia ischemica

4. MIOPATIE TOSSICHE

- Monensin

5. MIOPATIE NUTRIZIONALI

- Miopatia da deficienza di vitamina E e selenio

6. MIOPATIE IDIOPATICHE

- Miopatia fibrotica del muscolo gracile
 - Pastore Tedesco, Rottweiler, Dobermann
- Contrattura muscolare dei muscoli infraspinato e sopraspinato
 - Pointer, Setter Inglese, Labrador Retriever
- Miosite ossificante
 - “Limber tail” - Pointer, Labrador Retriever

piscono cuccioli o animali giovani sotto l'anno di età e si manifestano con andatura rigida, mialgia, atrofia muscolare e concomitante poliradiculoneurite con comparsa di iperestensione rigida degli arti posteriori e grave atrofia muscolare.²³ In questo caso la biopsia muscolare può consentire di emettere una diagnosi di natura eziologica grazie all'identificazione di cisti e/o tachizoiti (Fig. 4). Sia nei casi di polimiosite, sia nella miosite dei muscoli masticatori la rigenerazione miofibrile è sempre esuberante, ma l'espansione del tessuto connettivo fibroso è precoce ed altrettanto vigorosa con perdita della funzionalità muscolare. La terapia delle miopatie infiammatorie deve mirare, pertanto, non soltanto a sopprimere la reazione infiammatoria, ma anche ad inibire la proliferazione del tessuto connettivo permettendo un'adeguata rigenerazione miofibrile.²⁴

In casi di sospette miopatie infiammatorie è consigliabile sempre prelevare campioni bioptici multipli in quan-

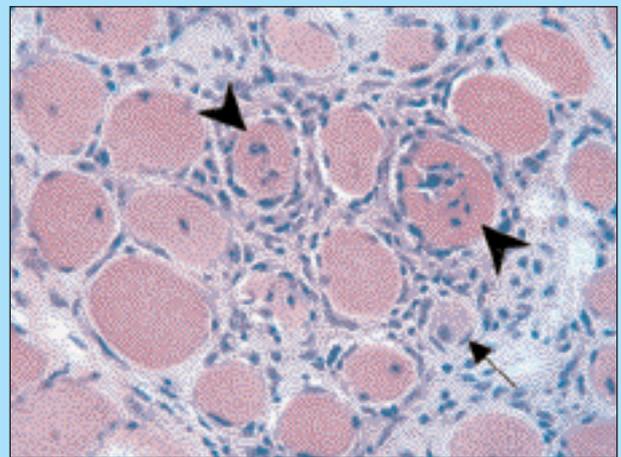


FIGURA 3 - Polimiosite. Si osservano infiltrati infiammatori endomysiali composti prevalentemente da linfociti, plasmacellule e sparsi macrofagi con miofagocitosi di fibre non necrotiche (punte di freccia). Si notano anche fibre rigeneranti (freccia). Cane, meticcio, maschio, 8 anni, presentato per progressiva disfagia, debolezza con andatura rigida e saltellante. Muscolo bicipite femorale (Ematossilina-Eosina).

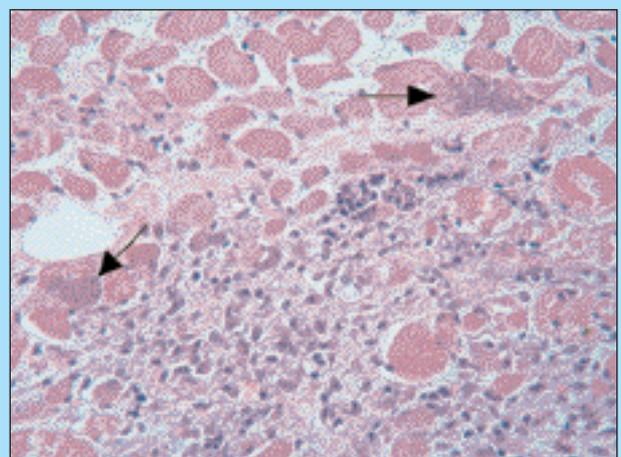


FIGURA 4 - Miosite protozoaria. Si osservano estesi infiltrati endomysiali costituiti da numerosi macrofagi, linfociti e plasmacellule, necrosi miofibrile e gruppi di tachizoiti endomiofibrili (freccie). Cane, Labrador Retriever, femmina, 4 mesi, presentato per mialgia e iperestensione rigida degli arti posteriori con assenza dei riflessi. Muscolo vasto laterale (Ematossilina-Eosina).

to gli infiltrati infiammatori hanno generalmente una distribuzione multifocale e l'analisi di un singolo campione muscolare può dare esito a falsi negativi per assenza di cellule infiammatorie.²⁵

La biopsia muscolare è importante non solo per l'evidenziazione di infiltrati infiammatori, ma anche per il riconoscimento di miopatie degenerative di origine metabolica o causate da malattie endocrine. Condizioni di ipercorticosurrenalismo, ad esempio, causano alterazioni del metabolismo miofibrilare come incremento del catabolismo proteico, inibizione della sintesi di proteine miofibrillari e inibizione dell'enzima fosforilasi coinvolto nella glicolisi anaerobia.²⁶ Infatti, una delle caratteristiche della miopatia da ipercorticosurrenalismo è un'atrofia selettiva delle fibre di tipo II, le cosiddette "fibre a contrazione rapida" cioè caratterizzate da un metabolismo anaerobio (Fig. 5). Le miopatie metaboliche rappresentano un gruppo di patologie muscolari caratterizzate da deficienze biochimiche nel metabolismo energetico delle fibre con conseguente scarsa performance muscolare.³ Tra queste rive-

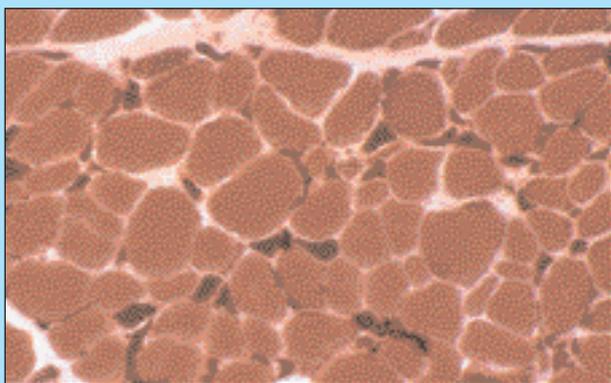


FIGURA 5 - Miopatia da iperadrenocorticismo. Si osserva marcato polimetricismo miofibrilare con presenza di numerose fibre atrofiche angolari e rotondeggianti prevalentemente di tipo II (fibre di colore scuro) e fibre ipertrofiche. Cane, Barbone medio, maschio, 11 anni, presentato per estrema debolezza, marcata atrofia muscolare e carcinoma surrenalico. Muscolo gastrocnemio (ATPasi pH 9,8).

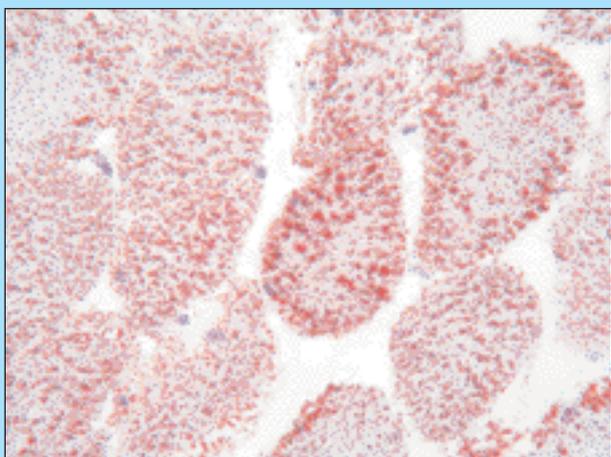


FIGURA 6 - Miopatia da accumulo di lipidi intramiofibrilari. In tutte le miofibre si osservano numerosi vacuoli lipidici di varie dimensioni. Cane, Bobtail, femmina, 9 anni, presentato per facile affaticabilità e tremori muscolari intermittenti, da circa tre anni, localizzati soprattutto agli arti posteriori. Muscolo tibiale craniale (Oil Red O).

stano una notevole importanza le miopatie mitocondriali e le alterazioni del metabolismo lipidico in quanto l'ossidazione mitocondriale degli acidi grassi è una fonte essenziale di energia per il muscolo scheletrico. Una deficienza di carnitina,³ ad esempio, causa inibizione del trasporto di acidi grassi all'interno dei mitocondri con conseguente accumulo di lipidi nel sarcoplasma (Fig. 6), mentre le patologie mitocondriali sono caratterizzate da accumulo di mitocondri anormali soprattutto alla periferia delle miofibre che, colorandosi in rosso con la colorazione tricromica, formano le cosiddette "fibre rosse frastagliate".¹¹ Tramite le varie reazioni enzimatiche ossidative che vengono eseguite sulle biopsie è possibile evidenziare alterazioni dell'attività enzimatica mitocondriale così come distribuzioni patologiche dei mitocondri (Fig. 7). Una diagnosi definitiva di miopatia mitocondriale può essere formulata comunque solo con il dosaggio dell'attività biochimica mitocondriale e l'analisi genetica,¹³ ancora poco sviluppata in medicina veterinaria.

Tra le miopatie degenerative congenite rivestono particolare importanza le distrofie muscolari. La più conosciuta è la distrofia con deficienza di distrofina che è stata segnalata in numerose razze canine e feline.²⁷ Il gene della distrofina, proteina fondamentale per la stabilizzazione delle fibre muscolari durante la contrazione, è localizzato sul cromosoma X pertanto i sintomi clinici sono più evidenti nei soggetti maschi ma è importante sottolineare che anche le femmine possono essere affette in quanto portatrici.²⁸ Una distrofia muscolare con assenza di distrofina può essere sospettata in qualsiasi animale giovane (maschio o femmina, meticcio o di razza) con debolezza persistente, atrofia o ipertrofia muscolare, alterazioni dell'andatura, o contratture nei primi mesi di vita che spesso portano a deformità scheletriche.^{15,27} Da un punto di vista istopatologico si osserva degenerazione e rigenerazione delle miofibre, fibrosi e depositi di calcio.¹⁵ Nel cane e

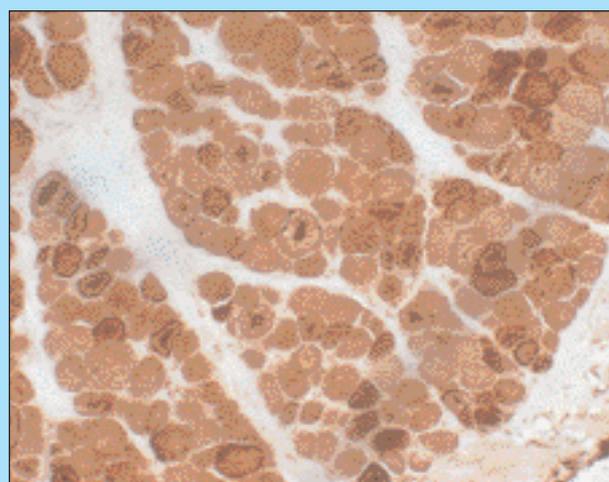


FIGURA 7 - Miopatia primaria metabolica (sospetta miopatia mitocondriale). Il muscolo mostra moderato polimetricismo miofibrilare con numerose fibre atrofiche rotondeggianti e rare fibre ipertrofiche. Numerose fibre mostrano un'alterata reattività degli enzimi ossidativi con accumulo di mitocondri al centro o alla periferia delle miofibre. Cane, Pastore Belga, femmina, 5 anni, con un'anamnesi di paraparesi da 4 mesi, moderato incremento della creatinfosfochinasi, normali riflessi spinali e propriocezione. Muscolo tricipite brachiale (COX).

nel gatto sono segnalate anche altre forme di distrofie analoghe ad alcune descritte nell'uomo, come la deficienza di $\alpha 2$ laminina segnalata nel gatto^{29,30} e in una femmina di meticcio di Springer Spaniel²⁸ o la deficienza di sarcoglicano descritta nel Boston Terrier, nel Cocker Spaniel e nel Chihuahua.²⁷

Un'altra importante miopatia degenerativa congenita razza-specifica è rappresentata dalla miopatia ereditaria del Labrador Retriever. I soggetti colpiti presentano un'insorgenza a 3-4 mesi di età di debolezza, atassia, paraparesi, andatura "a coniglio" e atrofia muscolare coinvolgente principalmente gli arti posteriori con diminuzione o assenza dei riflessi patellari. La debolezza tende a peggiorare con l'esercizio, l'eccitazione e le basse temperature. I valori sierici della creatinofosfochinasi possono essere nella norma o leggermente più elevati. La sintomatologia clinica tende a progredire nel primo anno di vita dopodiché si stabilizza e i soggetti possono condurre una vita normale anche se non in grado di svolgere prestazioni atletiche elevate.¹⁵ È riconosciuto che la miopatia è trasmissibile con modalità autosomica recessiva anche se le alterazioni geniche non sono conosciute.³¹ La distrofina, il sarcoglicano, α -actinina, la disferlina e la calpaina 3 sono normalmente espresse nei soggetti colpiti e i motoneuroni spinali non presentano alcuna alterazione genica.^{31,32} Inizialmente denominata miopatia da atrofia delle fibre di tipo II, la miopatia ereditaria del Labrador Retriever è caratterizzata da un pattern istologico variabile con presenza di alterazioni di natura distrofica o aspetti di atrofia neurogena con fibre atrofiche caratterizzate da un centro basofilo anche riunite in piccoli gruppi di atrofia, fibre ipertrofiche (Fig. 8), necrosi e rigenerazione miofibrile e presenza di nuclei centrali alle miofibre.^{15,32} Nonostante la presenza di aspetti di atrofia neurogena, istologicamente non si riscontrano alterazioni del nervo o del midollo spinale e la velocità di conduzione dei nervi è nella norma.¹⁵

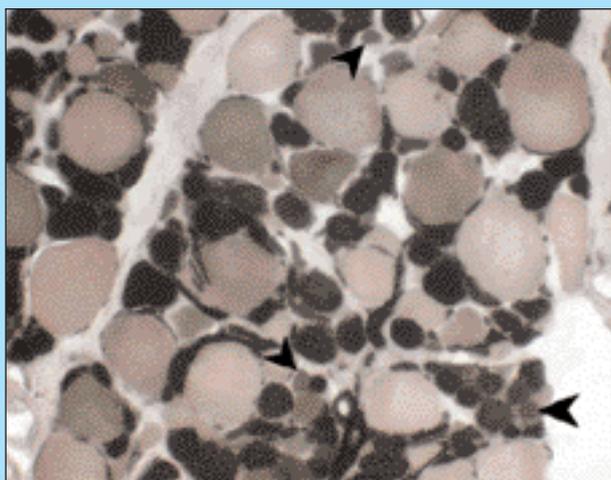


FIGURA 8 - Miopatia ereditaria del Labrador Retriever. Il muscolo mostra marcato polimorfismo miofibrillare con numerose fibre atrofiche rotondeggianti e angolari riunite in gruppi di atrofia, sparse fibre ipertrofiche e fibre di tipo II C rigeneranti di colore intermedio (punte di freccia). L'atrofia colpisce sia le fibre di tipo I (colore scuro), sia le fibre di tipo II (colore chiaro) ed è evidente moderata fibrosi perimisiale. Cane, Labrador Retriever, maschio, 3 mesi, con progressiva debolezza e ventroflexione del collo, deficit dei riflessi patellari, e marcata atrofia dei muscoli appendicolari e masticatori. Muscolo vasto laterale (ATPasi pH 4,3).

LA SINDROME NEUROPATICA

Le polineuropatie, patologie che coinvolgono contemporaneamente più nervi, hanno generalmente una distribuzione bilaterale e simmetrica, spesso coinvolgendo inizialmente gli arti pelvici.⁹ Le polineuropatie possono coinvolgere la porzione prossimale del nervo come nella poliradiculoneurite o la porzione distale come ad esempio nella neuropatia da organofosforici. Per quanto riguarda la progressione, le neuropatie possono avere una insorgenza acuta come la poliradiculoneurite e la neuromiopia ischemica secondaria a tromboembolismo ilioaortico oppure una insorgenza subdola con decorso cronico.^{3,9} La sindrome neuropatica è caratterizzata da riduzione o assenza di riflessi spinali (iporiflessia, ariflessia), riduzione o assenza del tono muscolare (ipotonia, atonia), debolezza, paresi, paralisi e dopo 1-2 settimane si osserva anche marcata atrofia muscolare neurogena. Le neuropatie possono essere caratterizzate anche da una perdita di grado variabile della sensibilità dolorifica in quanto la maggior parte dei nervi contiene sia una componente motoria, sia una sensitiva. In casi di neuropatie primariamente sensitive (come ad esempio quelle descritte nel Pointer o nel Boxer) si può sviluppare parestesia, anestesia, perdita della propriocezione e riduzione dei riflessi spinali, ma senza marcata atrofia muscolare.⁹

LA BIOPSIA DI NERVO PERIFERICO

Come per le biopsie muscolari, deve essere sottoposto a biopsia un nervo coinvolto dalla patologia identificabile per la presenza di alterazioni neurologiche nelle aree innervate dal nervo stesso (atrofia, iporiflessia, etc.).³ Quando la localizzazione della sintomatologia neurologica è generalizzata è preferibile sottoporre a biopsia nervi localizzati più superficialmente e per i quali siano disponibili in letteratura dati elettrofisiologici, morfologici e morfometrici della composizione delle fibre mieliniche. Questi requisiti sono soddisfatti dal nervo peroneo comune nell'arto pelvico e dal nervo ulnare nell'arto toracico.⁶ Entrambi questi nervi sono misti, cioè contengono sia fibre motorie, sia sensitive. In casi di sospette neuropatie sensitive è preferibile prelevare nervi sensitivi cutanei, quali il nervo cutaneo antibrachiale caudale nell'arto toracico e il nervo surale cutaneo caudale nell'arto pelvico.¹⁰ Una esauriente descrizione della metodica chirurgica per l'esecuzione di una biopsia di nervo può essere reperita nelle pubblicazioni di Braund (1994)⁶ e Dickinson & LeCouter (2002).¹⁰

Il campione prelevato deve essere posto in leggera tensione su un supporto rigido (es. abbassalingua, cottonfioc) fissato alle due estremità con aghi sottili o tramite legatura del filo di sutura al supporto.^{6,10} La fissazione ideale prevederebbe l'uso di una soluzione di glutaraldeide al 2,5% con osmolarità di 367-370 mOsm, preparata fresca per ogni campione. L'utilizzo di soluzioni di glutaraldeide con osmolarità diverse porta alla presenza di artefatti nelle fibre nervose quindi, nei casi di più frequente riscontro nella pratica ambulatoriale in cui non sia possibile avere una soluzione ottimale di glutaraldeide, è preferibile usare la comune formalina tamponata al 10%.

All'arrivo in laboratorio il campione viene ridotto, sezionato, post-fissato in osmio e incluso in resina Spurr per l'ot-

tenimento di sezioni semifini trasversali di 1 μm di spessore che vengono colorate con blu di toluidina e osservate al microscopio ottico per la valutazione quantitativa delle fibre nervose, della loro morfologia, diametro e spessore del rivestimento mielinico. In particolare è importante osservare il rapporto tra fibre di grosso, medio e piccolo diametro e il rapporto tra lo spessore della guaina mielinica e il calibro assonale.⁶ Anche alterazioni dell'endonevrio quali edema, fibrosi, presenza di infiltrati infiammatori o di macrofagi con detriti mielinici sono facilmente riconoscibili con questo tipo di sezioni. Se necessario lo stesso campione incluso in resina, viene utilizzato per ottenere sezioni ultrafini da osservare con il microscopio elettronico. Se il campione originario è di dimensioni sufficienti, una porzione di esso viene utilizzata per ottenere le cosiddette "fibre dissociate". In questo caso, dopo post-fissazione in osmio, le fibre vengono separate singolarmente per poterle osservare lungo il loro decorso longitudinale.⁶ Questa metodica è sicuramente più sensibile per rivelare alterazioni segmentali della mielina.¹⁹

Quando il campione ha dimensioni adeguate, una porzione di esso può anche essere inclusa in paraffina sia per ottenere sezioni in trasversale che in longitudinale.⁶ Su queste possono essere eseguite colorazioni specifiche per la mielina come il Luxol Fast Blue o per l'evidenziazione degli assoni quale l'impregnazione argentea di Bielschowsky, oppure metodiche di immunistochemica per la caratterizzazione degli infiltrati infiammatori.

L'INTERPRETAZIONE ISTOPATOLOGICA DELLE BIOPSIE DI NERVO PERIFERICO

Numerose sono le segnalazioni di neuropatie nel cane e nel gatto (Tab. 3). Da un punto di vista istopatologico è difficile raggiungere una diagnosi di tipo eziologico in quanto il nervo reagisce agli innumerevoli insulti con due alterazioni patologiche fondamentali: la degenerazione assonale e la demielinizzazione segmentale, a seconda che l'insulto interessi l'assone o le cellule di Schwann che formano la guaina mielinica.¹ Le lesioni più comuni in biopsie di nervo periferico sono lesioni non specifiche a livello assonale quali degenerazione, perdita di fibre e rigenerazione (Fig. 9). Generalmente infatti, sia le neuropatie ereditarie sia le acquisite, da un punto di vista istopatologico si presentano come degenerazioni assonali.^{3,19} In seguito alla resezione di un nervo periferico il moncone distale va incontro alla cosiddetta "degenerazione walleriana". In realtà la degenerazione delle fibre nervose con gli stessi aspetti morfologici della degenerazione walleriana avviene distalmente come conseguenza di qualsiasi tipo di insulto che interessa i segmenti prossimali e che può essere non solo di tipo traumatico, ma anche di tipo funzionale (ad esempio deficit del trasporto assonale).³³ Inizialmente si sviluppa un accumulo focale di organelli nell'assoplasma con rigonfiamento dell'assone per danno al normale flusso assoplasmatico, dopodiché comincia la disintegrazione granulare delle componenti citoscheletriche e assoplasmatiche con scomparsa dell'assone stesso.^{3,19} La guaina mielinica rimasta intatta collassa per mancanza dell'assone e comincia a degenerare formando i cosiddetti ovoidi di mielina. Questi diventano sempre più piccoli e vengono rimossi inizialmente dalle cellule di Schwann e dopo anche dai macrofagi.¹⁹ La degenerazione della guaina mielinica causata da

Tabella 3
Classificazione delle neuropatie nel cane e nel gatto
(modificata da Braund, 1996)³⁸

- 1. NEUROPATIE DEGENERATIVE**
 - Neuropatia ipomielinizante congenita
 - Polineuropatia dell'Alaskan Malamute
 - Polineuropatia distale del Birmano
 - "Dancing Dobermann Disease"
 - Neuropatia familiare del Pastore Tedesco
 - Neuropatia gigantoassonale
 - Neuropatia ipertrofica
 - Complesso polineuropatia-paralisi laringea
 - Polineuropatia distale sensitivo-motoria del Rottweiler
 - Assonopatia progressiva del Rottweiler
 - Neuropatia sensitiva del Pointer e del Bassotto a pelo lungo
 - Neuropatia demielinizante associata alla distrofia muscolare con deficienza di $\alpha 2$ laminina
 - Sfingolipidosi (Niemann-Pick)
 - Leucodistrofia a cellule globoidi
 - Glicogenosi tipo IV
 - Gangliosidosi
- 2. NEUROPATIE METABOLICHE**
 - Neuropatia diabetica
 - Neuropatia da iperadrenocorticismo (Cushing)
 - Neuropatia da ipotiroidismo
 - Neuropatia da ipoglicemia
 - Iperlipidemia
 - Iperossaluria
- 3. NEUROPATIE NUTRIZIONALI**
 - Deficienza di fenilalanina (neuropatia sensitiva - gatto)
 - Deficienza di tirosina (neuropatia sensitiva - gatto)
- 4. NEUROPATIE INFIAMMATORIE**
 - Parassitarie (*N. caninum*, *T. gondii*)
 - Neuropatia-neurite del plesso brachiale
 - Neurite ottica
 - Poliradiculoneurite
 - Poliradiculoneurite della cauda equina
 - Neurite del nervo trigemino
 - Ganglioradiculite sensitiva
- 5. NEUROPATIE IMMUNOMEDIATE**
 - Lupus eritematoso sistemico
 - Neuropatia con produzione di autoanticorpi contro la mielina del nervo periferico
- 6. NEUROPATIE VASCOLARI**
 - Neuromiopia ischemica
- 7. NEUROPATIE TRAUMATICHE**
 - Avulsione del plesso brachiale
 - Neuropatia traumatica
- 8. NEUROPATIE TOSSICHE**
 - Cisplatino
 - Vincristina
 - Tallio
 - Organofosforici
- 9. NEUROPATIE PARANEOPLASTICHE**
 - Insulinoma
 - Linfosarcoma
 - (Adeno)carcinoma
 - Sarcoma
- 10. NEUROPATIE IDIOPATICHE**
 - Degenerazione assonale cronica
 - Malattia da denervazione distale
 - Polineuropatia distale simmetrica

degenerazione assonale è detta demielinizzazione secondaria. La degenerazione assonale acuta è quindi caratterizzata da rigonfiamento assonale e disintegrazione dell'assone, spesso accompagnate da edema subperinevrionale e endonevrionale. La degenerazione assonale cronica è caratterizzata invece da perdita di fibre mieliniche, fibrosi endonevrionale (Fig. 10) e spesso da rigenerazione assonale.³⁴ Infatti, a seguito di un qualsiasi danno focale che abbia causato assonotomia, la rigenerazione avviene per la produzione di "gemmazioni multiple" (*axonal sprouting*) da parte dell'estremità assonale prossimale. Queste tenderanno ad accrescersi distalmente all'interno delle "bande di Büngner" formate dalla proliferazione delle cellule di Schwann.^{1,35} La presenza di una rigenerazione assonale esuberante permette di emettere una prognosi più favorevole in corso di neuropatia.

Riassumendo, quindi, quando un nervo mostra gli aspetti classici della degenerazione assonale, la causa può essere una neuronopatia cioè un danno al corpo neuronale, un'ischemia acuta, o un danno assonale locale causato da mediatori dell'infiammazione, da tossine, o traumi.¹⁹

La demielinizzazione segmentale primaria avviene invece in seguito ad una alterata funzione delle cellule di Schwann o a un danno primario alla guaina mielinica.¹ Le cellule di Schwann danneggiate o con un deficit metabolico non sono in grado di formare una normale guaina mielinica che comincia a degenerare e ritirarsi a partenza dai nodi di Ranvier. Se il danno alla cellula è più grave, l'intero internodo mielinico scompare e si può instaurare un blocco della conduzione nervosa con comparsa dei sintomi neurologici.³⁴ A differenza della degenerazione assonale, nella demielinizzazione segmentale primaria l'assone rimane integro e tramite la metodica delle fibre dissociate sono evidenti segmenti demielinizzati frammisti ad altri di normale aspetto lungo il decorso dell'assone (Fig. 11). Nelle patologie demielinizzanti autoimmuni come la polineuropatia demielinizzante infiammatoria cronica del cane, sono i linfociti e i macrofagi che aggrediscono la mielina e, questi ultimi in particolare, rimuovono il rivestimento mielinico inserendo gli pseudopodi tra le membrane della cellula di Schwann.^{34,35}

Un assone demielinizzato fornisce lo stimolo alla proliferazione delle cellule di Schwann e quindi alla rimielinizzazione.¹ Sarà poi solo una delle cellule proliferate a rivestire l'assone e a formare l'internodo mielinico mancante. In seguito a ripetuti episodi di demielinizzazione e rimielinizzazione, le cellule di Schwann soprannumerarie non degenerate rimangono attorno all'assone e creano delle strutture denominate "bulbi di cipolla" per la disposizione concentrica delle membrane basali e dei processi delle cellule di Schwann.^{1,19}

Nelle fasi acute della demielinizzazione primaria segmentale si osservano assoni nudi e fibre con un rivestimento mielinico di spessore ridotto, mentre nelle forme croniche sono frequenti i "bulbi di cipolla". La demielinizzazione primaria non è generalmente associata ad atrofia muscolare neurogena in quanto raramente causa una perdita di fibre nervose.^{19,34}

Alcune neuropatie ereditarie sono caratterizzate da ipomielinizzazione. In questo caso la guaina mielinica non raggiunge mai lo spessore adeguato rispetto al calibro assonale e non si osservano fenomeni di demielinizzazione attiva.³⁵ Una polineuropatia ipomielinizzante congenita è stata descritta in due cuccioli di Golden Retriever³⁶ ed è stata osservata in associazione alla distrofia muscolare con deficienza di $\alpha 2$ laminina nel gatto.^{29,30}

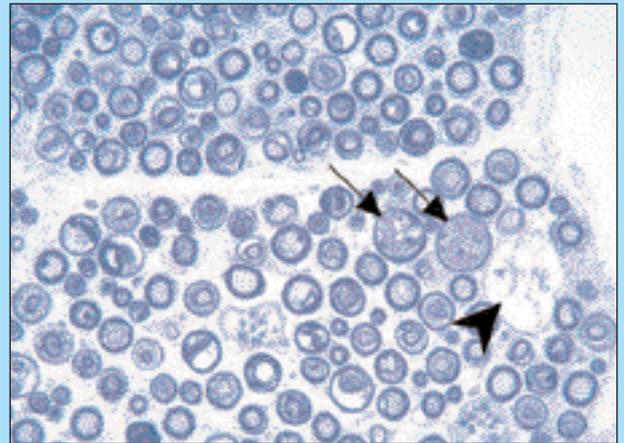


FIGURA 9 - Neuropatia assonale acuta. Il nervo mostra degenerazione assonale multifocale con rigonfiamento assonale, accumulo di organelli assoplasmatici (freccie) e disintegrazione assonale (punta di freccia). Cane, meticcio, maschio, 7 anni, con progressiva debolezza degli arti posteriori, difficoltà a saltare e a salire le scale, diminuzione dei riflessi flessori e presenza di potenziali di fibrillazione e onde acute positive generalizzati all'elettromiografia. Nervo peroneo comune (Blu di Toluidina).

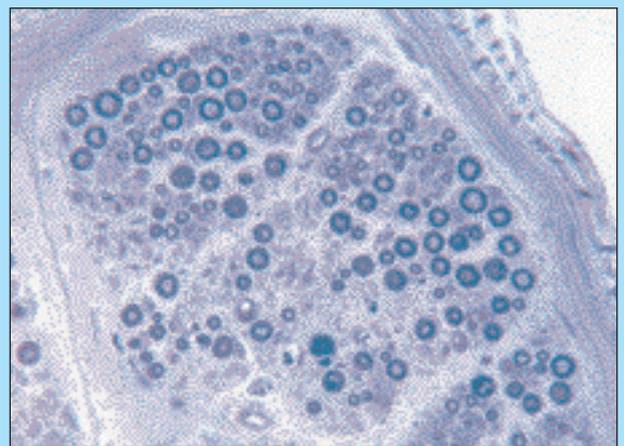


FIGURA 10 - Neuropatia assonale cronica. Si osserva marcata perdita di fibre mieliniche di grosso e medio diametro con marcata fibrosi endonevrionale e rare degenerazioni assonali. Cane, Pastore Maremmano, femmina, 2 anni, presentato per progressiva tetraparesi, debolezza, deficit propriocettivi e dei riflessi dei nervi spinali. Nervo peroneo comune (Blu di Toluidina).

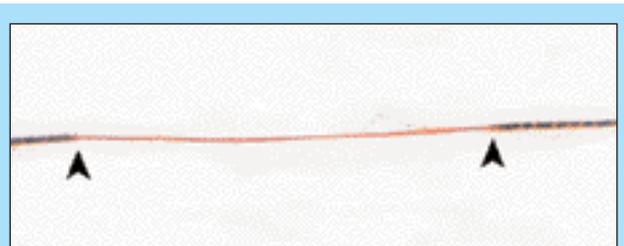


FIGURA 11 - Neuropatia demielinizzante. Un intero internodo (compreso tra le punte di freccia) appare demielinizzato, mentre gli internodi adiacenti mostrano un normale rivestimento mielinico. Cane, Pastore Tedesco, maschio, 3 anni, con moderata tetraparesi, lievi deficit propriocettivi e diminuzione della velocità di conduzione nervosa a carico del nervo peroneo comune. Nervo peroneo comune (fibra dissociata; tetrossido di osmio).

CONCLUSIONI

I risultati ottenibili dallo studio istomorfologico e istoenzimatico di biopsie muscolari e di nervo periferico, devono essere sempre valutati insieme ai dati forniti da esami clinici ed elettrofisiologici, sebbene in qualche caso possano di per sé fornire elementi diagnostici eziologici (per esempio in caso di miositi protozoarie). Le alterazioni morfologiche del muscolo scheletrico e del nervo periferico, sebbene caratteristiche, sono infatti raramente patognomoniche di una singola malattia ed è quindi necessaria una stretta correlazione clinicopatologica. Una diagnosi di patologia neuromuscolare basata solo sulla morfologia può essere errata e responsabile della mancata esecuzione di ulteriori approfondimenti diagnostici. È anche importante evidenziare però che, nonostante i progressi ottenuti nella pratica clinica e la disponibilità di attrezzature diagnostiche più sofisticate, l'esame microscopico di campioni biotici rimane fondamentale per definire la diagnosi, e per la comprensione dei meccanismi patogenetici. Lo studio delle malattie neuromuscolari del cane e del gatto si presta quindi in modo ottimale all'approccio integrato tra indagine clinica, diagnostica strumentale ed esami neuropatologici. È solo grazie alla sinergia di queste discipline e alla collaborazione tra le diverse figure professionali specializzate, che può essere raggiunta la correlazione clinico-patologica della malattia neuromuscolare e il miglioramento delle potenzialità diagnostiche, nonché l'individuazione di patologie rare, che potrebbero altrimenti risultare ulteriormente sottostimate negli animali da compagnia. Inoltre, la stretta correlazione tra neurologo e neuropatologo potrà permettere di condurre studi retrospettivi al fine di individuare più precisi criteri prognostici, sulla base della corretta caratterizzazione delle lesioni e del follow-up del soggetto.

Lo studio delle alterazioni morfologiche in biopsie di nervo e muscolo in futuro dovrà essere accompagnato da specifiche indagini biochimiche per la caratterizzazione dei deficit enzimatici come ad esempio nelle miopatie mitocondriali¹³ o nelle miopatie metaboliche per deficit di enzimi lisosomiali, così come da indagini di biologia molecolare per la caratterizzazione delle malattie genetiche ereditarie e il miglioramento della selezione delle razze canine e feline.³⁷ Queste metodiche sono importanti non solo a scopo diagnostico, ma sono di grande interesse anche per la ricerca in quanto le malattie neuromuscolari del cane e del gatto rappresentano ottimi modelli per lo studio di analoghe malattie nell'uomo.²⁷

Nota: ulteriori informazioni pratiche sulle metodiche di prelievo dei tessuti per le analisi neuropatologiche possono essere reperibili al sito web: <http://www.vet.unipi.it/DPAT/neuro>

Bibliografia

- De Girolami U, Anthony DC, Frosch MP: Peripheral nerve and skeletal muscle. In: Robbins. Pathologic basis of disease. Ed by RS Cotran, V Kumar, T Collins. Philadelphia, WB Saunders Co, 1999, pp 1269-1291.
- Glass EN, Kent M: The clinical examination for neuromuscular disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 32 (1):1-29, 2002.
- Shelton GD: Neuromuscular pathology and diseases. Annual Course in Veterinary Neuroscience and Advanced Clinical Neurology and Neurosurgery, Raleigh, North Carolina, 2003, pp 135-148.
- Platt SR, Garosi LS: Neuromuscular weakness and collapse. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 34 (6):1281-1305, 2004.
- Cuddon PA: Electrophysiology in neuromuscular disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 32 (1):31-62, 2002.
- Braund KG: Clinical syndromes in veterinary neurology. 2nd edition. St. Louis, Missouri, Mosby, 1994.
- Blot S: Myopathies in domestic carnivores. Part 1. The skeletal striated muscle: structure, function and symptomatology. *Europ J Comp Anim Pract*, 6(1): 42-55, 1996.
- Braund KG: Myopathies in dogs and cats. *Vet Med*, 7(6): 607-634, 1997.
- Vite CH, Braund KC: Braund's Clinical Neurology in Small Animals: Localization, Diagnosis and Treatment. Available from: <http://www.avis.org/advances/Vite/toc.asp>
- Dickinson PJ, LeCouter RA: Muscle and nerve biopsy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 32 (1): 63-102, 2002.
- Sato Y: Histochemical staining techniques for examination of skeletal muscle. In: *Skeletal Muscle. Diagnosis and Management of Disease*. Ed by Preedy VR, Peters TJ. London, Greenwich Medical Media, 2002, pp 341-351.
- Loughlin M: Muscle biopsy. A Laboratory Investigation. Oxford, Butterworth-Heinemann Ltd, 1993.
- Taylor RW, Schaefer AM, Barron MJ, et al: The diagnosis of mitochondrial muscle disease. *Neuromuscul Disord*, 14(4): 237-245, 2004.
- Shelton GD: Muscular dystrophies: expanding our knowledge in companion animals. *Vet J*, 168 (1):6-8, 2004.
- Shelton GD, Engvall E: Muscular dystrophies and other inherited myopathies. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 32 (1):103-124, 2002.
- Pumarola M, Moore PF, Shelton GD: Canine inflammatory myopathy: analysis of cellular infiltrates. *Muscle Nerve*, 29(6):782-789, 2004.
- Dickinson PJ, LeCouter RA: Feline neuromuscular disorders. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 34 (6):1307-1359, 2004.
- Flanders JA: Feline aortic thromboembolism. *Comp Contin Educ*, 8 (7): 473-484, 1986.
- Midroni G, Bilbao JM: Biopsy diagnosis of peripheral neuropathy. Boston, Butterworth-Heinemann, 1997.
- Evans J, Levesque D, Shelton GD: Canine inflammatory myopathies: a clinicopathologic review of 200 cases. *J Vet Intern Med*, 18:679-691, 2004.
- Shelton GD, Cardinet GH, Bandman E: Canine masticatory muscle disorders: A study of 29 cases. *Muscle Nerve*, 10 (8):753-766, 1987.
- Orvis JS, Cardinet GH: Canine muscle fiber types and susceptibility of masticatory muscles to myositis. *Muscle Nerve*, 4 (4):354-359, 1981.
- Podell M: Inflammatory Myopathies. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 32 (1):147-167, 2002.
- Salvadori C, Peters IR, Day MJ, et al: Muscle regeneration, inflammation, and connective tissue expansion in canine inflammatory myopathy. *Muscle Nerve*, 31 (2):192-198, 2005.
- Carpenter S, Karpati G: Pathology of skeletal muscle. Second edition. New York, Oxford University Press, 2001.
- Platt SR: Neuromuscular complications in endocrine and metabolic disorders. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 32 (1):125-146, 2002.
- Shelton GD, Engvall E: Canine and feline models of human inherited muscle diseases. *Neuromuscul Disord*, 15 (2):127-138, 2005.
- Shelton GD, Liu LA, Guo LT, et al: Muscular dystrophy in female dogs. *J Vet Intern Med*, 15 (3): 240-244, 2001.
- O'Brien DP, Johnson GC, Liu LA, et al: Laminin $\alpha 2$ (merosin)-deficient muscular dystrophy and demyelinating neuropathy in two cats. *J Neurol Sci*, 189 (1-2):37-43, 2001.
- Poncelet L, Resibois A, Engvall E, Shelton GD: Laminin alpha2 deficiency-associated muscular dystrophy in a Maine coon cat. *J Small Anim Pract*, 44 (12): 550-552, 2003.
- Bley T, Gaillard CL, Bilzer TH, et al: Genetic aspects of Labrador Retriever myopathy. *Res Vet Sci*, 73(3): 231-236.
- Green SL, Tolwani RJ, Varma S, Shelton GD: Absence of mutations in the survival motor neuron cDNA from Labrador Retrievers with an inherited myopathy. *Vet Rec*, 157(9): 250-254.
- Krinke GJ, Vidotto N, Weber E: Teased-fiber technique for peripheral myelinated nerves: methodology and interpretations. *Toxicol Pathol*, 28 (1): 113-121, 2000.
- Richardson EP, De Girolami U: Pathology of the peripheral nerve. Philadelphia, WB Saunders Co, 1995.
- King R: Atlas of peripheral nerve pathology. London, Arnold Publishers, 1999.
- Braund KG, Metha JR, Toivio-Kinnucan M, et al: Congenital hypomyelinating polyneuropathy in two Golden Retriever Littermates. *Vet Path*, 26 (3): 202-208, 1989.
- Fyfe JC: Molecular diagnosis of inherited neuromuscular disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 32 (1):287-300, 2002.
- Braund KG: Recognizing the manifestations of peripheral nerve damage. *Vet Med*, 6 (8): 721-769, 1996.