

RUOLO DIAGNOSTICO DEL COMPLESSO MAGGIORE DI ISTOCOMPATIBILITÀ DI CLASSE I NELLE MIOPATIE INFIAMMATORIE DEL CANE

DIAGNOSTIC VALUE OF MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS I IN INFLAMMATORY MYOPATHY IN DOG

ORLANDO PACIELLO, DVM, PhD - CAMILLA NOBLER, DVM - SERENELLA PAPPARELLA, DVM

Dipartimento di Patologia e Sanità animale - Settore di Anatomia Patologica

Università degli Studi di Napoli Federico II - Napoli, Italia

Riassunto

Introduzione - Nella diagnosi delle miositi, il rinvenimento di cellule infiammatorie, nonché la valutazione del tipo di infiltrato è di fondamentale importanza. Tuttavia non è sempre possibile rinvenire l'infiltrato infiammatorio nella biopsia.

Scopo del lavoro - Il presente lavoro si pone l'obiettivo di evidenziare il valore diagnostico degli antigeni del Complesso Maggiore di Istocompatibilità di classe I come test più sensibile nella diagnosi di miopatia infiammatoria del cane considerando che l'espressione dell'MHC di classe I sul sarcolemma non è normalmente evidente ma viene sovra-espresso solo in corso di miopatia infiammatoria.

Materiali e metodi - Sono state esaminate 21 biopsie muscolari di cani con: (1) miosite associata a *Neospora caninum*, (6) polimiositi associate a *Leishmania*, (2) polimiositi idiopatiche, (5) miositi dei muscoli masticatori, (1) distrofia muscolare associata a deficit di distrofina, (1) miopatia ipotiroidea, (2) neuropatie periferiche con atrofia muscolare e (3) controlli sani. L'espressione dell'MHC di classe I è stata studiata utilizzando metodiche di immunohistochimica e di doppia-immunofluorescenza.

Risultati - Nei controlli, l'espressione dell'MHC di classe I era limitata alle cellule dell'interstizio e nessuna positività è stata osservata sulle fibre muscolari. Nei cani affetti da miopatia infiammatoria le fibre muscolari esprimevano fortemente l'MHC di classe I sia in presenza che in assenza di infiltrato infiammatorio.

Discussione - Il nostro studio ci ha permesso di concludere che l'espressione dell'MHC di classe I è un test valido nella diagnosi delle miopatie infiammatorie del cane e può essere inserito nella valutazione istologica delle biopsie muscolari, in particolare quando l'infiltrato infiammatorio non è osservabile.

Summary

Introduction - Identification of cellular infiltrates in skeletal muscle tissue is the histological trade marker for the diagnosis of Inflammatory Myopathy. However, these infiltrates are not always present.

Objective - To determine whether MHC class I antigen expression on the sarcolemma, which is absent in normal muscle tissue, is up-regulated in Inflammatory Myopathy and could serve as a diagnostic tool in non informative muscle biopsies.

Materials and methods - The expression of MHC class I was studied by immunohistochemistry and double-immunofluorescence in 21 canine muscle biopsies: (1) myositis associated to *Neospora caninum* (6) polymyositis associated to *Leishmania*, (2) idiopathic polymyositis, (5) masticatory muscle myositis, (1) dystrophin deficient muscular dystrophy (1) hypothyroid myopathy, (2) peripheral neuropathy with muscle atrophy and (3) normal control.

Results - In normal and control muscle tissue, MHC class I expression was detected only in endothelial and interstitial cells. No immunostaining was observed on the sarcolemma. In inflammatory myopathy MHC class I was strongly expressed on the sarcolemma and in the cytoplasm of muscle fibers independently of inflammatory cells.

Conclusions - Our study shows that the detection of sarcolemmal MHC class I is a valid test for the diagnosis of inflammatory myopathies and it should be included in the histological evaluation when the diagnosis of inflammatory myopathy is under consideration or needs to be excluded.

INTRODUZIONE

Il principale obbiettivo dell'esame clinico di un soggetto colpito da una miopia è un'accurata diagnosi per identificare, ove possibile, la causa del disordine^{1,2}.

Per una diagnosi, anche di tipo eziologico, si rende necessaria l'analisi istomorfologica del tessuto muscolare attraverso l'esame di campioni biotici, seguendo una metodologia corretta di prelievo, conservazione e colorazione delle biopsie e applicando metodiche di laboratorio mirate al sospetto diagnostico^{1,2}.

I parametri standard da prendere in considerazione nella diagnosi delle miopatie, ed in particolare quelle infiammatorie, attualmente associano ai caratteri di ordine clinico, valutazioni sierologiche ed istologiche ed includono: la presenza di debolezza muscolare, la perdita di funzionalità di specifici gruppi muscolari, l'incremento della creatina chinasi sierica (CK), variazioni dell'elettromiogramma (EMG), e l'evidenza istologica dell'infiammazione in atto. Non tutti questi criteri sono necessariamente presenti contemporaneamente^{2,3,4}. Da non dimenticare che alla base di una diagnosi di miopia infiammatoria non può mancare una particolareggiata anamnesi ed un esame neurologico accurato. Di fatto molti animali colpiti da una miopia infiammatoria, presentano o hanno presentato intolleranza all'esercizio fisico o perdita di funzionalità di uno specifico gruppo muscolare (es. muscoli masticatori) associata ad un iniziale dolore muscolare che può essere evidenziato con la palpazione o può rendersi manifesto con anomalie nella deambulazione, atteggiamenti particolari dei muscoli facciali, impossibilità ad aprire la mascella^{3,4} (Fig. 1).

Il CK è un enzima muscolare che ha funzione di riserva energetica sottoforma di creatin-fosfato durante periodi di scarsa richiesta energetica. L'energia viene rapidamente ri-

lasciata con produzione di ATP dal creatin-fosfato quando invece la richiesta è elevata⁵.

L'emivita relativamente breve di questo enzima (2-3 ore) ne consente l'utilizzo in test seriali per monitorare la progressione di una patologia muscolare. Un incremento dei livelli di CK può essere dovuto, oltre che ad una patologia muscolare, anche ad una marcata emolisi od iperbilirubinemia, ad incremento dell'endurance relativa ad un aumento di attività fisica del soggetto, a cause iatrogene e a decubito prolungato. Inoltre soggetti di piccola taglia ed animali giovani presentano tassi fisiologicamente più elevati di CK. L'enzima sierico alanina aminotransferasi (ALT) può anch'esso avere un valore diagnostico ed essere aumentato in caso di necrosi muscolare nel cane, ma deve essere esclusa una eventuale patologia epatica sottostante⁶.

L'elettromiografia (EMG) è un test diagnostico ugualmente importante nella valutazione dell'integrità funzionale di muscoli e nervi. L'EMG testa la stabilità delle membrane muscolari. Le cause più frequenti di instabilità delle membrane muscolari sono le denervazioni, le infiammazioni e le anomalie metaboliche della fibra muscolare. L'elettromiografia è ad oggi il mezzo di indagine elettrico di elezione per le miopatie infiammatorie^{7,8}.

L'ultimo step dell'iter diagnostico, ma sicuramente il più importante nella definizione delle patologie muscolari, è la valutazione istopatologica del muscolo.

La biopsia muscolare è relativamente innocua e ben tollerata e consente l'identificazione delle fibre muscolari e della loro morfologia, l'esecuzione di indagini di istoenzimatica, fondamentali per la differenziazione del tipo fibrale e per la diagnosi delle miopatie metaboliche, l'immunohistochemical, soprattutto per lo studio delle proteine di membrana quali la distrofina e le altre proteine associate e di analisi biochimiche. Per le miopatie infiammatorie viene prelevato un minimo di due campioni biotici dai muscoli tricipite e vasto laterale (si tratta infatti di muscoli per i quali sono note la distribuzione e le dimensioni dei diversi tipi di fibre in condizioni normali⁹) o da specifici gruppi muscolari identificati in base a valutazioni cliniche o a studi elettromiografici.

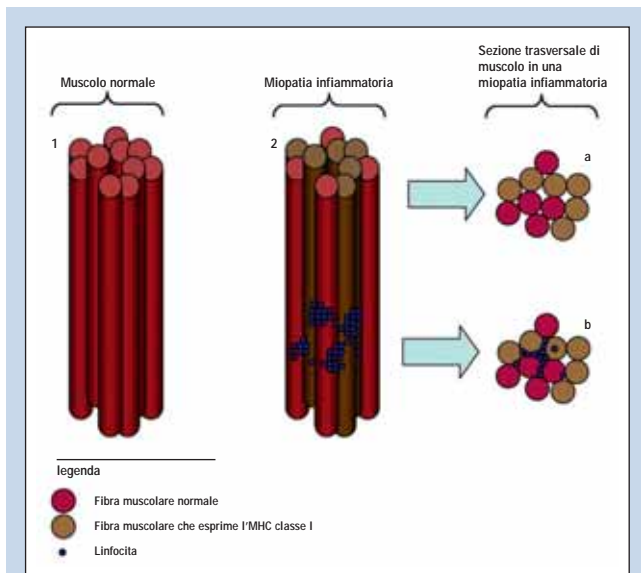
Nella diagnosi delle miopatie infiammatorie, il rinvenimento di cellule infiammatorie, nonché la valutazione del tipo di infiltrato è di fondamentale importanza¹⁰. Recenti studi, in medicina umana, ci indirizzano verso metodiche sempre più specifiche e sensibili al fine di diagnosticare con certezza le miopatie infiammatorie soprattutto quando l'infiltrato cellulare non è rinvenibile nella biopsia muscolare, come nei casi di infiltrati a distribuzione focale^{11, 12} (Schema 1 - immagine a).

Considerando il ruolo di potenziale importanza che gioca l'espressione degli antigeni dell'MHC di classe I nella patogenesi delle miopatie infiammatorie ed il loro possibile utilizzo per la diagnosi di tali patologie sia nell'uomo¹² che nel cane¹³, si è indagata la loro espressione in corso di miopatie infiammatorie del cane attraverso l'utilizzo del microscopio laser confocale associato alle convenzionali tecniche immunoistologiche.

In quest'ottica il presente lavoro si pone l'obiettivo di evidenziare il valore diagnostico dell'espressione degli antigeni del Complesso Maggiore di Istocompatibilità di classe I (MHC classe I) come test più sensibile nella diagnosi di miopia infiammatoria del cane.



FIGURA 1 - Cane, Meticcio, piccola taglia. Grave atrofia dei muscoli temporali con evidenziazione della cresta occipitale, in un caso di Miosite dei Muscoli Masticatori (foto gentilmente fornita dal Dott. Claudio Amore).



SCHEMA 1 - Schematizzazione dell'espressione dell'MHC di classe I nelle miopatie infiammatorie. In condizioni normali, le fibre muscolari non esprimono il Complesso Maggiore di Istocompatibilità di classe I (1). Nelle miopatie infiammatorie (2) le fibre muscolari esprimono l'MHC di classe I per tutta la lunghezza della fibra e non solo in prossimità dell'infiltrato infiammatorio. L'immagine (b), mostra una sezione trasversale di muscolo (così come appare nella biopsia muscolare) in cui si osserva l'infiltrato infiammatorio e fibre muscolari positive all'MHC di classe I. Nell'immagine (a) si osservano fibre muscolari in sezione trasversale senza infiltrato infiammatorio adiacente ma che continuano ad esprimere l'MHC di classe I e quindi diagnostiche per una miopatia infiammatoria.

MATERIALI E METODI

Sono state esaminate 21 biopsie muscolari di cani con: (1) miosite associata a *Neospora caninum*, (6) polimiositi associate ad infezione da *Leishmania*, (2) polimiositi idiopatiche, (5) miositi dei muscoli masticatori, (1) distrofia muscolare associata a deficienza di distrofina, (1) miopatia ipotiroidica, (2) neuropatie periferiche con atrofia muscolare e (3) controlli sani.

I rilievi clinici e i risultati di test diagnostici ausiliari da cui è scaturita la diagnosi del processo miopatico infiammatorio vengono riportati nella Tabella 1.

I soggetti sono stati divisi in 4 gruppi come di seguito riportato:

Gruppo 1: Cani con segni clinici di miosite e presenza di infiltrato infiammatorio diffuso nelle biopsie muscolari: (2) miositi dei muscoli masticatori (casi n° 1 e 2), (2) polimiositi associate ad infezione da *Leishmania* (casi n° 3 e 4), (1) miosite associata a *Neospora caninum* (caso n° 5), (1) polimiosite idiopatica (caso n° 6) (Fig. 2) (Tabella 1).

Gruppo 2: Cani con segni clinici di miosite e piccoli clusters di cellule infiammatorie nella biopsia muscolare: (1) miositi dei muscoli masticatori (caso n° 7), (2) polimiositi associate ad infezione da *Leishmania* (casi n° 8 e 9), (1) polimiosite idiopatica (caso n° 10) (Tabella 1).

Gruppo 3: Cani con segni clinici di miosite ed assenza di infiltrati infiammatori nella biopsia muscolare: (2) miosite dei muscoli masticatori (casi n° 11 e 12), (2) polimiositi associate ad infezione da *Leishmania* (casi n° 13 e 14) (Tabella 1).

Gruppo 4: Cani affetti da miopatie non infiammatorie: (1) distrofia muscolare associata a deficienza di distrofina, (1) miopatia ipotiroidica, (2) neuropatie periferiche con atrofia muscolare.

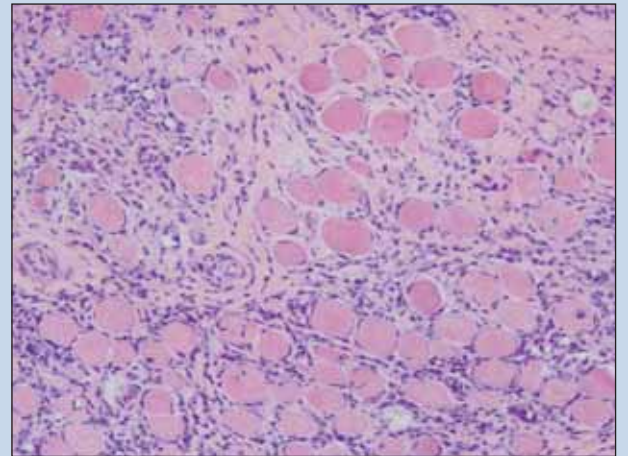


FIGURA 2 - Biopsia muscolare di cane. Grave e diffuso infiltrato infiammatorio tra le fibre muscolari (caso n° 6). Ematossilina ed eosina. Ingrandimento 40X.

I campioni prelevati sono stati congelati in isopentano pre-raffreddato in azoto liquido e conservati alla temperatura di -80°C fino ad ulteriori processazioni. Le sezioni (8 µm) sono state colorate con le seguenti metodiche istologiche ed istochimiche: ematossilina-eosina (EE) e Tricromica di Engel, per la valutazione morfologica della biopsia muscolare e ATPasi a pH 9,4 e 4,3, per la differenziazione del tipo fibrale. Ulteriori sezioni, sono state fissate in acetone a 4°C per 5 minuti e sono state sottoposte al blocco delle perossidasi endogene incubandole in una soluzione di H₂O₂ allo 0,3% e metanolo per 20 minuti. Le sezioni sono state poi incubate per 2 ore a temperatura ambiente con un anticorpo monoclonale contro l'MHC di classe I del cane (diluizione 1:100, clone H58A, VMRD, Inc., USA). I vetrini sono stati lavati tre volte con PBS poi incubati con un secondario biotinilato, seguendo le indicazioni del kit di immunostochimica (LSAB kit; DakoCytomation, Danimarca). La reazione è stata rivelata con 5 minuti di incubazione in diaminobenzidina (DakoCytomation, Danimarca). Le sezioni sono poi state contrastate con l'ematossilina di Mayer.

Come controllo negativo sono state utilizzate sezioni incubate sostituendo l'anticorpo primario con siero normale di topo.

Per la doppia colorazione di immunofluorescenza, le sezioni di muscolo sono state asciugate all'aria, bloccate con siero normale di topo diluito 1:10, poi lavate in 0,01 M PBS (pH 7,4) contenente 0,2% Triton X-100 e 0,1% di albumina sierica bovina. Le sezioni sono state poi incubate per 24 ore a 4°C con un anticorpo monoclonale contro la porzione COOH terminale della distrofina, proteina della membrana sarcolemmatica. (Diluizione 1:50 in 1:5 siero normale. Novocastra Laboratories Ltd.) Le sezioni sono state poi sciacquate in PBS in seguito incubate per un'ora a temperatura ambiente con un frammento Fab di IgG di capra anti-topo coniugato con il fluorocromo TRITC (1:50, Jackson Laboratories). Le sezioni sono state incubate con il secondo anticorpo primario contro l'MHC di classe I canino per 24 ore a 4°C. Dopo lo sciacquo in PBS le sezioni sono state incubate con un secondario di coniglio anti-topo IgG-Fab coniugato con il fluorocromo FITC (1:50 Jackson Laboratories). Alla fine le sezioni sono state sciacquate con PBS e montate con una soluzione di glicerina diluita con

Tabella 1
Dati clinici e risultati dell'espressione dell'MHC di classe I nei cani affetti da miopatie infiammatorie

Caso n°	Razza	Sesso	Età (anni)	CK (<200 IU/L)	Segni clinici	Gruppo di appartenenza	Score di immunoreattività MHC classe I*
1	Dalmata	M	3	300	Miosite dei muscoli masticatori con dolore alla palpazione	Gruppo 1	4+
2	Pastore tedesco	F	4	380	Miosite dei muscoli masticatori, con difficoltà ad aprire la mandibola e dolore alla palpazione	Gruppo 1	4+
3	Rottweiler	F	8	260	Debolezza muscolare, facile affaticabilità, atrofia muscolare; IFAT per leishmania 1/2560	Gruppo 1	4+
4	Meticcio	M	5	315	Debolezza muscolare, facile affaticabilità, atrofia muscolare; IFAT per leishmania 1/2560	Gruppo 1	3+
5	Dogo argentino	M	1	200	Debolezza muscolare generalizzata, atassia, IFAT per <i>N. caninum</i> >1:2560	Gruppo 1	3+
6	Pastore tedesco	M	6	450	Debolezza muscolare generalizzata, facile affaticabilità, dolore alla palpazione	Gruppo 1	4+
7	Meticcio	M	9	307	Miosite dei muscoli masticatori, con difficoltà ad aprire la mandibola e dolore alla palpazione	Gruppo 2	1+
8	Meticcio	FS	12	260	Debolezza muscolare, facile affaticabilità, atrofia muscolare; IFAT per leishmania 1/2560	Gruppo 2	2+
9	Beagle	M	2	280	Debolezza muscolare, facile affaticabilità, atrofia muscolare; IFAT per leishmania 1/2560	Gruppo 2	3+
10	Meticcio	FS	6	300	Debolezza muscolare generalizzata, facile affaticabilità, dolore alla palpazione	Gruppo 2	2+
11	Pastore tedesco	M	8	300	Atrofia dei muscoli masticatori e trisma	Gruppo 3	1+
12	Meticcio	F		315	Atrofia dei muscoli masticatori	Gruppo 3	2+
13	Beagle	M	2	311	Debolezza muscolare, facile affaticabilità, atrofia muscolare; IFAT per leishmania 1/2560	Gruppo 3	2+
14	Beagle	F	2	550	Debolezza muscolare, facile affaticabilità, dolore muscolare; IFAT per leishmania 1/5120	Gruppo 3	3+

M = maschio, F = femmina, FS = femmina sterilizzata; CK = creatine kinase.

PBS in rapporto di 1:1. Per l'osservazione e le fotografie è stato utilizzato un microscopio confocale LSM-510 (Zeiss-Göttingen, Germania).

Per la valutazione dell'espressione immunoistochimica dell'MHC di classe I è stato utilizzato uno score di immunoreattività:

- 0, fibre muscolari negative;
- 1+, cellule endoteliali positive, 1-25% di fibre positive;
- 2+, cellule endoteliali positive, 26-50% di fibre positive;
- 3+, cellule endoteliali positive, 51-70% di fibre positive;
- 4+, cellule endoteliali positive, 71%-100% di fibre positive.

RISULTATI

Controlli normali

Nei soggetti sani, l'espressione dell'MHC di classe I era limitata alle cellule endoteliali delle arteriole, delle venule e dei capillari. Nessuna positività è stata osservata sulle fibre muscolari (Fig. 3).

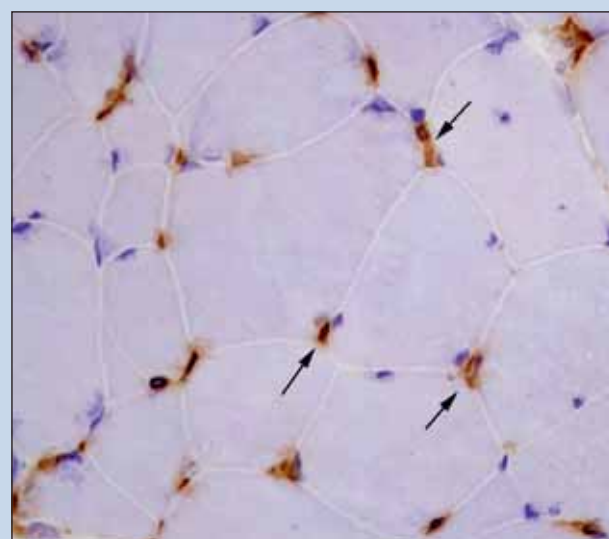


FIGURA 3 - Biopsia muscolare di cane. Espressione dell'MHC classe I nel muscolo normale. Solo le cellule endoteliali, nell'interstizio, appaiono positive (freccie). Metodica IHC. Ingrandimento 40X.

Espressione dell'MHC di classe I

Gruppo 1: L'infiltrato cellulare infiammatorio rappresentato da elementi mononucleati era localizzato nell'endomisio e nel perimisio e aveva anche una distribuzione perivascularare (Fig. 2). L'espressione dell'MHC di classe I era evidente sul sarcolemma della maggior parte delle fibre muscolari (score da 3+ a 4+) e a volte nel citoplasma mentre le cellule infiammatorie e le cellule endoteliali erano sempre fortemente positive (Fig. 4).

Gruppo 2: In questo gruppo le biopsie muscolari mostravano solo rari, piccoli gruppi, di linfociti nell'endomisio. La positività delle fibre muscolari per MHC di classe I (score da 1+ a 3+) era evidente non solo sulle fibre muscolari adiacenti alle aree di infiltrazione cellulare, ma anche sul sarcolemma di fibre distanti dall'infiltrato cellulare. Positività per MHC di classe I era ovviamente presente sulle cellule endoteliali dei capillari, arteriole e venule di tutte le biopsie esaminate.

Gruppo 3: In questo gruppo non si osservavano foci di infiltrazione infiammatoria. L'espressione dell'MHC di classe I era presente sul sarcolemma di diverse fibre muscolari ma in minor numero rispetto a quelle del gruppo 1 (score da 1+ a 3+) (Fig. 5).

Gruppo 4: Le biopsie muscolari dei cani con distrofia muscolare, miopatia ipotiroidea e neuropatia periferica mostravano un pattern di immunoistochimica per MHC di classe I simile alle biopsie di controllo dei cani sani, infatti non si osservava alcuna espressione dell'MHC di classe I sulle fibre muscolari, ma la colorazione era limitata alle strutture interstiziali.

I risultati sono riassunti nella Tabella 1.

Doppia colorazione di immunofluorescenza

Tutte le fibre muscolari, nelle miopatie infiammatorie, erano positive con l'anticorpo anti-distrofina (COOH). Con l'immunofluorescenza, utilizzando il microscopio laser confocale, abbiamo osservato che le membrane delle fibre muscolari esprimevano contemporaneamente l'MHC di classe I e la distrofina e la doppia colorazione era presente sia nelle aree con infiltrato infiammatorio che senza infiltrato (Fig. 6). Questo dimostra che l'MHC di classe I viene espresso in modo inequivocabile dalla membrana delle fibre muscolari.

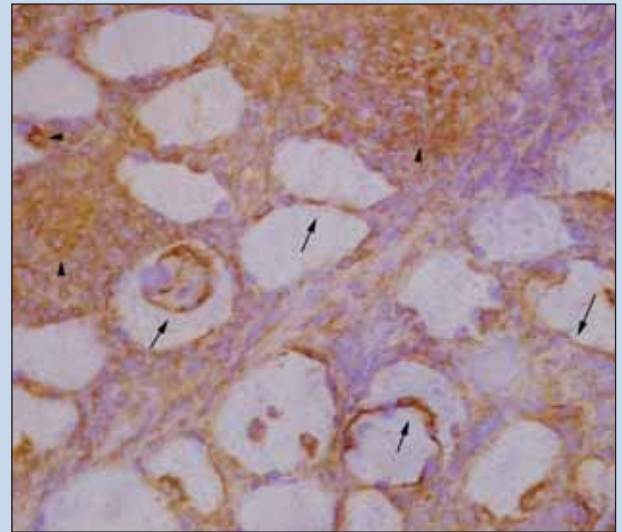


FIGURA 4 - Biopsia muscolare di cane. Espressione dell'MHC classe I in un caso di miosite con presenza di infiltrato infiammatorio diffuso. La positività è evidente sulle fibre muscolari (freccie) e su diverse cellule infiammatorie (teste di freccie) (caso n° 1). Metodica IHC. Ingrandimento 40X.

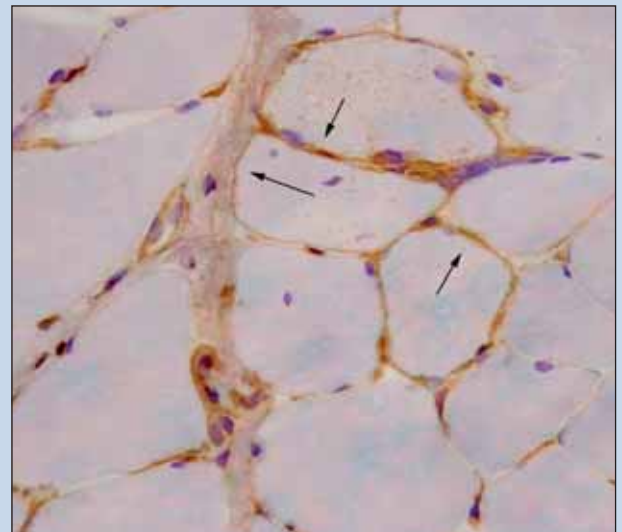


FIGURA 5 - Biopsia muscolare di cane. Espressione dell'MHC classe I in un caso di miosite senza infiltrato infiammatorio (freccie) (caso n° 12). Metodica IHC. Ingrandimento 40X.

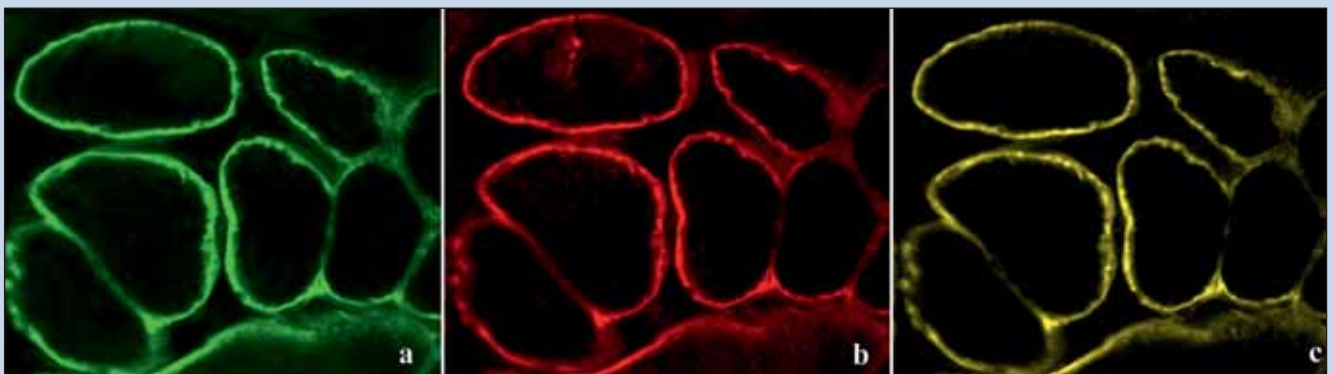


FIGURA 6 - Biopsia muscolare di cane. Il Complesso Maggiore di Istocompatibilità di classe I (rosso) è espresso sulle fibre muscolari e colocalizza (giallo) con la proteina di membrana distrofina (verde) (caso n° 11). Doppia immunofluorescenza; microscopio laser confocale. Ingrandimento 40X.

DISCUSSIONE

In questo studio abbiamo dimostrato che le fibre muscolari, in cani affetti da miopatia infiammatoria, esprimevano l'MHC di classe I sia in presenza che in assenza di infiltrato infiammatorio. Nelle biopsie dei soggetti sani o dei muscoli di altri soggetti affetti da miopatie non infiammatorie non si osservava alcuna espressione dell'MHC di classe I.

I risultati ottenuti appaiono particolarmente significativi perché, pur essendo il numero di miopatie infiammatorie non particolarmente elevato, tuttavia il 100% delle biopsie esaminate esprimeva l'MHC di classe I sul sarcolemma, al contrario, nessuna delle biopsie usate come controllo era positiva.

Questi dati supportano la teoria che l'espressione di queste molecole è indotta e non costitutivamente espressa sulle fibre muscolari^{12,13} ed in accordo con le più recenti ricerche secondo le quali nelle infiammazioni, le fibre muscolari esprimono le molecole dell'MHC di classe I sia nelle vicinanze delle cellule infiammatorie, ma anche su quelle fibre distanti dall'infiltrato infiammatorio^{12,13} (Schema 1).

In vivo, in condizioni fisiologiche, le miofibre non esprimono antigeni MHC di classe I sulla loro superficie^{11,12,15}. Nei cani l'espressione dell'MHC di classe I è stata precedentemente descritta in un caso di polimiosite¹⁶ e nelle miositi dei muscoli masticatori del cane¹³. L'espressione di questi antigeni indica che le fibre muscolari sono immunologicamente attive anche se il meccanismo alla base di questo fenomeno così come le sue conseguenze restano tuttora sconosciute^{11,14}.

È particolarmente interessante notare che nel gruppo 2, l'MHC di classe I era espresso dalle fibre muscolari sia vicino all'infiltrato ma anche su fibre lontane dalle cellule infiammatorie. Inoltre, nei cani del gruppo 3, in cui la diagnosi di miosite era basata solo sulle tipiche manifestazioni cliniche, (elevati livelli di CK, dolore muscolare, debolezza muscolare ecc.) e non sulla presenza dell'infiltrato infiammatorio, le miofibre esprimevano MHC di classe I.

Ciò può essere spiegato considerando che l'MHC di classe I nelle miositi è diffuso a tutta la fibra muscolare e non solo nei segmenti dove è presente l'infiltrato infiammatorio; questo permette di dare delle informazioni diagnostiche utili anche in quelle biopsie dove non è riscontrabile l'infiltrato infiammatorio.

CONCLUSIONI

Il nostro studio conferma che l'espressione dell'MHC di classe I è un test valido nella diagnosi delle miopatie in-

fiammatorie del cane e può essere inserito nella valutazione istologica delle biopsie muscolari, in particolare quando l'infiltrato infiammatorio non è osservabile (Schema 1).

Parole chiave

Miopatie infiammatorie, Complesso Maggiore di Istocompatibilità di classe I, biopsia muscolare.

Key words

Inflammatory myopathy, Major Histocompatibility Complex class I, muscle biopsy.

Bibliografia

1. Dubowitz V, Sewry CA. The Biopsy: normal and diseased muscle in: Muscle Biopsy. A Practical Approach. Philadelphia, Saunders Elsevier 2007, pp 3-247.
2. URL: NeuroMuscular Disease Center. <http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular> Accesso al sito 11 novembre 2007.
3. Podell M. Inflammatory Myopathies. Vet Clin North Am Small Anim Pract 32:v147-167, 2002.
4. Salvadori C, Cantile C, Arispici M. Metodologia e interpretazione delle biopsie di muscolo e nervo. Veterinaria 4: 7-16, 2006.
5. Aktas M, Auguste D, Lefebvre HP. Creatine Kinase in the dog: A review. Vet Res Commun 17: 353-369, 1993.
6. Valentine B, Blue JT, Shelley SM. Increased serum alanine aminotransferase activity associated with muscle necrosis in the dog. J Vet Intern Med 4: 140-143, 1990.
7. Bromberg M. The role of electrodiagnostic studies in the diagnosis and management of polymyositis. Comprehensive Ther 18: 17-22, 1992.
8. Sims MH. Electrodiagnostic techniques in the evaluation of diseases affecting skeletal muscle. Vet Clin North Am Small Anim Pract 13: 145-62, 1983.
9. Braund KG. Diagnostic Techniques in: Clinical Syndrome in Veterinary Neurology. Mosby, Philadelphia, Second Edition 391-415, 1994.
10. Pumarola M, Moore PF, Shelton GD. Canine inflammatory myopathy: analysis of cellular infiltrates. Muscle Nerve 29: 782-789, 2004.
11. Englund P, Lindroos E, Nennesmo I, Klareskog L, Lundberg IE. Skeletal muscle fibers expression major histocompatibility complex class II antigens independently of inflammatory infiltrates in inflammatory myopathies. Am J Pathol 159: 1263-1273, 2001.
12. J van der Pas, GJD Hengstman, HJ ter Laak, GF Borm et al. Diagnostic Value of MHC class I staining in idiopathic inflammatory myopathies. J Neurol Neurosurg Psychiatry 75:136-139, 2004.
13. Paciello O, Shelton GD, Papparella S. Expression of major histocompatibility complex class I and class II antigens in canine masticatory muscle myositis. Neuromuscular disorders 17: 313-320, 2007.
14. Wiendl H, Hohfeld R, Kieseier BC. Immunobiology of muscle: advances in understanding an immunological microenvironment. Trends Immunol 26:373-380, 2005.
15. Karpati G, Pouliot Y, Carpenter S. Expression of immunoreactive major histocompatibility complex products in human skeletal muscles. Ann Neurol 23: 64-72, 1988.
16. Morita T, Shimada A, Yashiro S. Myofiber expression of class I major histocompatibility complex accompanied by CD8+ T-cell-associated myofiber injury in a case of canine polymyositis. Vet Pathol 39: 512-515, 2002.