



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICO-VETERINARIE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA VETERINARIA

**La Famiglia dei Tetraodontidi, la loro diffusione nel Mar
Mediterraneo e la tetrodotossina**

***Tetraodontidae* Family, its diffusion in the Mediterranean Sea
and the tetrodotoxin**

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa Silvia Bonardi

Laureando:

Chiara Giannetti

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

INDICE

RIASSUNTO.....	4
INTRODUZIONE.....	5
CAPITOLO I.....	6
1.1 I TETRAODONTIDI	6
1.1.1 Caratteristiche generali.....	6
1.1.2 Distribuzione geografica	7
1.1.3 Caratteristiche fisiche.....	7
1.1.4 Comportamento	8
1.1.5 Nutrizione.....	9
1.1.6 Riproduzione	9
1.1.7 Predatori.....	11
1.1.8 Locomozione	11
1.2 I TETRAODONTIDI RILEVATI NEL MEDITERRANEO IN PROSSIMITA' DELLE COSTE ITALIANE	12
1.2.1 <i>Lagocephalus sceleratus</i>	12
1.2.2 <i>Lagocephalus lagocephalus</i>	14
1.2.3 <i>Sphoeroides pachygaster</i>	16
CAPITOLO II.....	18
2.1 LA TETRODOTOSSINA (TTX).....	18
2.1.1 Introduzione.....	18
2.1.2 Le origini.....	18
2.1.3 Caratteristiche chimiche	19
2.1.4 La tetrodotossina in natura	21
2.1.5 Meccanismo di accumulo ed eliminazione della TTX nei pesci palla.....	22
2.1.6 I pesci palla.....	30
2.1.7 Tossicità e meccanismo d'azione.....	31
2.1.8 Fasi del potenziale d'azione.....	34
2.1.9 Sintomi e segni clinici in corso di intossicazione da TTX.....	40
2.1.10 Descrizione di un focolaio verificatosi in Bangladesh.....	42
2.1.11 Altri di focolai di intossicazioni da TTX.....	46
2.1.12 Approccio terapeutico per la gestione dei casi di intossicazione da TTX.....	46
2.1.13 Applicazioni mediche della TTX	55
CAPITOLO III.....	66
3.1. UNA PROBLEMATICATA ATTUALE: LA DIFFUSIONE DEI TETRAODONTIDI NEL MAR MEDITERRANEO	66

3.1.1 Introduzione generale.....	66
3.1.2 La frode di sostituzione del pesce palla.....	73
CAPITOLO IV	78
4.1 IL GIAPPONE E LA CULTURA DEL FUGU.....	78
4.1.1 Introduzione generale.....	78
4.1.2 Il pesce palla nella storia del Giappone	78
4.1.3 Pesce palla pescati in Giappone e riconosciuti come privi di rischio per la salute umana	82
4.1.4 Prescrizioni legislative giapponesi relative al pesce palla.....	83
4.1.5 Fugu chorishi menkyo.....	83
4.1.6 Lavorazione del fugu in Giappone in ambito di ristorazione	84
4.1.7 Le pietanze a base di pesce palla.....	86
4.1.8 Celebrità giapponesi decedute per avvelenamento da TTX conseguente al consumo di piatti a base di fugu.....	90
4.1.9 Il fugu e l'arte giapponese	90
4.1.10 Dati e andamento produttivo annuo di pesce palla <i>Takifugu rubripes</i> in Giappone	91
4.1.11 Andamento di mercato del pesce palla tigre <i>Takifugu rubripes</i>	93
4.1.12 Il pesce palla e la quotidianità del Giappone.....	95
CONCLUSIONI	96
BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA.....	98

RIASSUNTO

La diffusione dei pesci appartenenti alla Famiglia dei *Tetraodontidae* tramite il processo migratorio noto come “migrazione lessepsiana” sta destando grande preoccupazione nei Paesi che si affacciano sul bacino del Mediterraneo. Tale evento, oltre che essere la prova di un più globale cambiamento climatico, sta comportando l’introduzione, tra le altre, di specie alloctone potenzialmente tossiche, essendo in grado di accumulare nei loro tessuti una potente neurotossina, la tetrodotossina (TTX). Tutto questo li rende un reale rischio per la salute umana qualora entrassero accidentalmente nella filiera ittica.

Il grande interesse che il panorama scientifico mondiale sta mostrando per la TTX sta comunque permettendo di comprenderne sempre meglio le caratteristiche e il meccanismo d’azione, basato su un blocco selettivo dei canali del sodio voltaggio dipendenti, mostrandone anche i pregi in vista di un suo futuro potenziale utilizzo a scopo terapeutico per la gestione di diverse patologie.

Prendere in considerazione anche l’approccio extraeuropeo a questa tossina e ai Tetraodontidi, da parte di Paesi che ne hanno da più tempo conoscenza, potrà permettere una più semplice gestione dell’attuale problematica e la ricerca di adeguate soluzioni.

ABSTRACT

The spread of fish belonging to the *Tetraodontidae* Family through the migratory process known as "Lessepsian migration" is causing great concern in countries bordering the Mediterranean Sea. This event, in addition to being evidence of a more global climate change, is resulting in the introduction of, among others, potentially toxic allochthonous species, being able to accumulate in their tissues a powerful neurotoxin, the tetrodotoxin (TTX). All this makes them a real risk to human health if they accidentally enter the fish supply chain.

However, the great interest that the world scientific community has about TTX is giving the chance to understanding its characteristics and mechanism of action, based on a selective blockade of voltage-dependent sodium channels, also showing its potential future use for therapeutic purposes in the management of various diseases.

Considering also the non-European approach to this toxin and to the *Tetraodontidae* in countries that have been familiar with them for longer, an easier management of the problem and appropriate solutions might be found.

INTRODUZIONE

Il presente elaborato di tesi ha come fine ultimo quello di raccogliere il maggior numero possibile di informazioni e realizzare un compendio di quella che è la Famiglia ittica dei Tetraodontidi, la loro recente massiva diffusione nel Mar Mediterraneo e i pericoli sanitari che ne possono derivare, essendo essi portatori di una delle più letali tossine parolitiche marine. Tuttavia l'intenzione è anche quella di allargare maggiormente lo sguardo verso altre realtà al di fuori dell'Italia e dell'Europa, in cui i Tetraodontidi sono visti e considerati in modo tutt'altro che negativo.

La tesi è suddivisa in quattro capitoli. Dapprima vi è una presentazione di quelli che sono Tetraodontidi, le loro caratteristiche fisiche ed etologiche, con particolare interesse per i generi e le specie individuate nell'area costiera italiana. Segue una descrizione della tetrodotossina (TTX), la principale tossina di cui i Tetraodontidi sono portatori e che li rende un pericolo da non sottovalutare per i diversi casi di intossicazioni alimentari. Della tossina verranno analizzate le sue caratteristiche chimico-fisiche, il suo meccanismo d'azione, la sintomatologia manifestabile in corso di assunzione della stessa, ma anche le potenzialità che gli studiosi hanno scorto in essa a scopo terapeutico.

Il terzo capitolo comprende una rielaborazione di precedenti studi e ricerche relative alla diffusione sempre più imponente di questa Famiglia nel bacino del Mediterraneo, causata da modifiche geofisiche ed ambientali.

Il quarto ed ultimo capitolo pone infine l'attenzione su come i Tetraodontidi vengano sfruttati in paesi extra europei dove il loro commercio non è vietato, soffermandosi in particolare sul Giappone.

CAPITOLO I

1.1 I TETRAODONTIDI

1.1.1 Caratteristiche generali

I Tetraodontidi (Tetraodontidae, BONAPARTE 1831) o più gergalmente chiamati “Pesci palla” per la loro capacità di gonfiare il corpo e, in tal modo, più che raddoppiare il proprio volume corporeo assumendo appunto la forma di una sfera, sono una Famiglia di pesci teleostei appartenenti all’Ordine dei Tetraodontiformes. All’interno della medesima Famiglia si contano, ad oggi, 28 generi e 205 specie differenti.

Il loro nome deriva dal greco Tetra “quattro” e Odontides “denti”, ossia letteralmente “quattro denti”, loro assegnato per la particolare arcata dentale a forma di becco, costituita in entrambe le mascelle da denti fusi insieme a formare due placche dentarie, separate però da una sutura mediana (Fig.1) (Fishbase, 2024). I denti, molto forti e robusti vengono usati per frantumare conchiglie e i carapaci di molluschi e crostacei, le prede naturali di cui i Tetraodontidi prevalentemente si cibano. La loro dentatura è sufficientemente resistente da poter ferire gravemente chi li maneggia dopo la cattura. La particolarità dell’arcata dentale dei Tetraodontidi è una delle caratteristiche principali che li contraddistingue e che permette di distinguerli da un’altra Famiglia ittica morfologicamente molto simile, quella dei Diodontidi o Pesci istrice, i quali presentano sempre due placche dentarie fuse insieme, ma non suddivise dalla sutura mediana (Shellis e Berkovitz, 2017).Quest’ultimi mostrano evidenti spine su tutta la superficie del proprio corpo, spine che nei Tetraodontidi sono invece completamente assenti o molto meno visibili se non nella parte inferiore del corpo quando viene gonfiato introducendo a scopo difensivo acqua o aria all’interno di una sacca di espansione posta sulla superficie ventrale dello stomaco (Wilson e Castro, 2010).

Molte specie di Tetraodontidi sono velenose, la componente tossica principale che accumulano, in modo più o meno concentrato e in diverse parti del corpo, è la tetrodotossina, sebbene sia stata rilevata anche un’altra tossina marina, la saxitossina, che però non verrà presa in considerazione nel presente studio per il minore interesse riservatole da parte del mondo scientifico (Fazio, 2022).

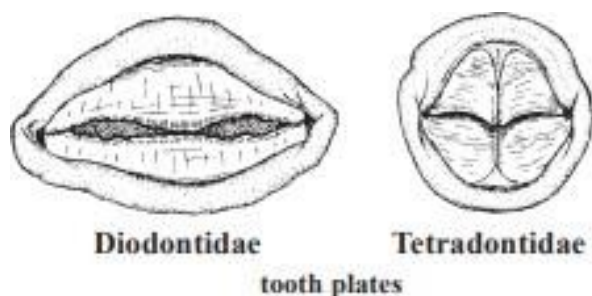


Fig. 1) Differenza morfologica dell’arcata dentaria dei Diodontidi e dei Tetraodontidi (Shipp, 2006)

1.1.2 Distribuzione geografica

I Tetraodontidi popolano prevalentemente acque salate, senza però escludere completamente quelle salmastre e dolci. La loro localizzazione geografica, fino a poco tempo fa, era confinata alle aree Tropicali e Subtropicali dell'Atlantico e dell'Indo-Pacifico, ma tramite il Canale di Suez, seguendo il processo noto come “migrazione lessepsiana” (tale definizione deriva dal nome dell'ingegnere che fu promotore ed esecutore della realizzazione del suddetto canale, Ferdinand de Lesseps), i ritrovamenti nelle acque del Mar Mediterraneo hanno cominciato ad essere sempre più diffusi (Al-Sulaimani et al., 2022)

1.1.3 Caratteristiche fisiche

Nella Famiglia dei Tetraodontidi non vi è un dimorfismo sessuale evidente tra maschi e femmine. Sono pesci di medie dimensioni. Generalmente la loro lunghezza, misurata a partire dall'apice del muso a bocca chiusa, fino all'estremità del lobo più lungo della pinna caudale, si aggira tra i 35 e i 40 cm in base alla specie. Tuttavia non è infrequente trovare anche esemplari di dimensioni superiori ai 50 cm. La lunghezza massima registrata è stata quella di un soggetto maschio adulto di “pesce palla stellato” o “pesce palla gigante” (*Arothron stellatus*) di ben 130cm.

La colorazione della pelle è molto variabile, condizione facilmente spiegabile anche dal fatto che alla Famiglia appartengono numerosi generi e specie. Si va dal brunastro al bruno-verdastro sul dorso e sui fianchi, mentre sul ventre la colorazione varia dal biancastro al bianco-giallastro; talvolta possono essere presenti macchie scure sui fianchi al fine di una migliore mimetizzazione nell'ambiente circostante.

Le pinne sono raggiate e si osservano da 7 a 18 raggi molli per la pinna dorsale, anale e nelle pinne pettorali, mentre la pinna caudale presenta 11 raggi molli e può avere un aspetto che va da leggermente biforcuto ad arrotondato; le pinne ventrali sono assenti (Fig. 1b) (Shipp, 2006).

I pesci teleostei normalmente non possiedono palpebre, ma i pesci palla presentano una membrana, chiamata appunto palpebra, che copre i loro occhi. Quest'ultima però non si apre e chiude in modo istantaneo, ma lo fa lentamente in un periodo di tempo che può raggiungere addirittura i 10 secondi (Ueno e Sakamoto, 2004).

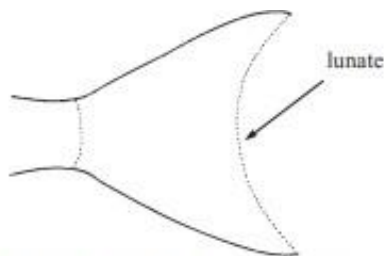
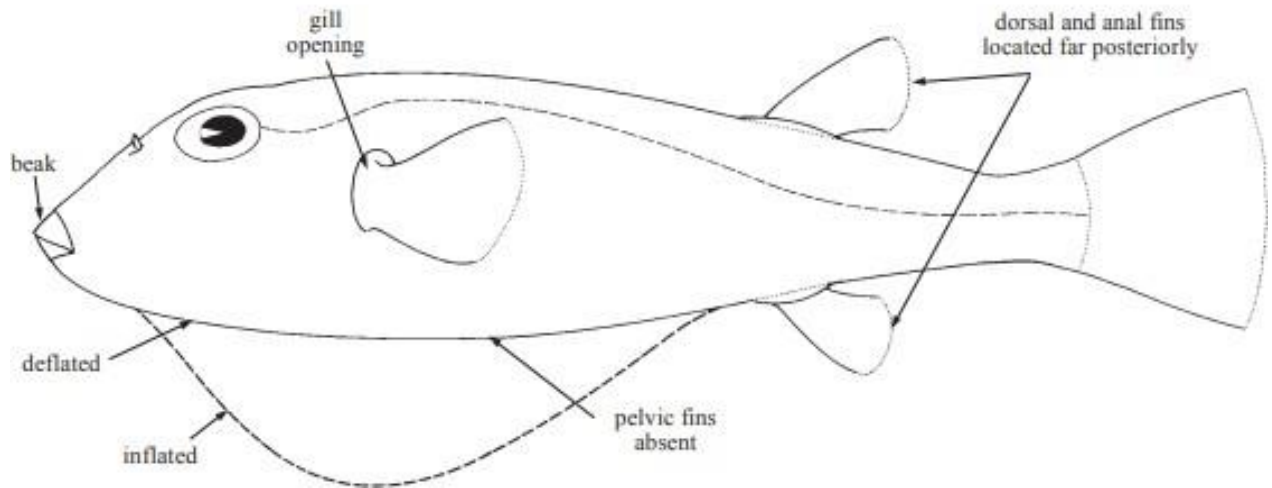


Fig. 2 caudal fin (*Lagocephalus*)

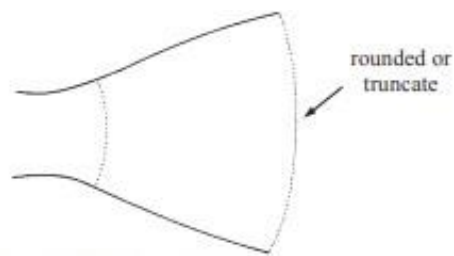


Fig. 3 caudal fin (*Sphoeroides*)

Fig 1b) Caratteristiche fisiche principali degli appartenenti alla famiglia Tetraodontidae e particolare delle due principali conformazioni che la pinna caudale dei Tetraodontidi può assumere (Shipp, 2006)

1.1.4 Comportamento

I pesci palla sono fortemente aggressivi e territoriali, tanto da attaccare o gonfiarsi a scopo di difesa nell'esatto momento in cui percepiscono una possibile minaccia (Zooplus magazine, 2024). Qualora venissero allevati in un acquario o in stabilimenti di acquacoltura la possibilità che, a causa dello stress a cui sono sottoposti, attacchino e uccidano gli altri esemplari presenti non è remota. Per questo motivo soprattutto negli allevamenti a scopo commerciale, al fine di evitare perdite economiche ingenti o di peggiorare eccessivamente la qualità del prodotto finale, viene spesso eseguita la pratica del "taglio" dei denti. In un acquario privato sarebbe, invece, opportuno prendere adeguate precauzioni e separarli a scopo preventivo (Fususatosanchokumuravillage.it, 2018).

1.1.5 Nutrizione

I pesci palla sono onnivori e molte specie non seguono una dieta particolare, mentre alcune mostrano predilezione per certi invertebrati o alghe che possono trovare abbondantemente in aree rocciose o barriere coralline. Le specie di taglia maggiore possono nutrirsi anche di crostacei e molluschi (Fazio, 2022).

1.1.6 Riproduzione

I Tetraodontidi sono animali ovipari e la riproduzione avviene in modo differente in base alla specie considerata.

Sembra che il meccanismo riproduttivo più diffuso sia strettamente legato al ciclo lunare. Nel 2022 un gruppo di ricercatori e biologi giapponesi, affiliati all'Università di Nagoya, con a capo il professor Takashi Yoshimura (Chen et al., 2022), ha studiato il fenomeno che induce migliaia di esemplari a deporre le uova lungo le coste in corrispondenza della marea primaverile.

Tramite tecniche di ecogenomica sono stati identificati i 125 geni coinvolti nel comportamento riproduttivo dei Tetraodontidi, scoprendone alcuni che codificano per recettori di uno specifico feromone, la Prostaglandina E₂ (PGE₂). L'ipotesi che questi recettori abbiano un ruolo chiave nel processo di riproduzione è stata dimostrata tramite una sperimentazione condotta *in vivo* in un acquario contenente esemplari di entrambi i sessi di pesce palla. È stato osservato che, poco dopo la diffusione nel mezzo acquoso del PGE₂, è avvenuta un rapido cambiamento nel comportamento in tutti gli individui, equivalente a quello che sarebbe avvenuto nel periodo riproduttivo. Grazie a ciò si è giunti alla conclusione che i pesci palla, nel momento della deposizione delle uova, rilasciano contestualmente anche PGE₂, inducendo così anche gli esemplari vicini a fare lo stesso, con un finale processo di sincronizzazione riproduttiva (Rapinese, 2022).

I soggetti adulti raggiungono in media la maturità sessuale intorno ai 5 anni. Il maschio tramite corteggiamento attira la femmina vicino alla riva dove l'acqua è più bassa, lì lei depone le uova mentre il partner rilascia gli spermatozoi per permettere la fecondazione esterna. Le uova deposte sono di forma sferica, da 2 a 7mm di diametro e galleggiano sulla superficie dell'acqua (Fistola, 2018).

Nei pesci palla è il maschio che si dedica maggiormente alle cure parentali, occupandosi del nido fino alla dischiusa delle uova, evento che avviene nel giro di 6-8 giorni. Al momento della schiusa i piccoli non sono ancora completamente formati e possiedono un guscio protettivo che si spezzerà solo quando si saranno formate la coda e le pinne. In questo lasso di tempo le larve vengono condotte in un luogo sicuro dal maschio, che le proteggerà fino a che non saranno in grado di sopravvivere in mare aperto raggiungendo lo stadio di sviluppo chiamato "avannotto".

Nelle specie di acqua dolce la riproduzione è leggermente diversa: il maschio possiede, infatti, creste e chiglie ornamentali che vengono messe in evidenza al fine di attirare la femmina. Nel caso in cui lei lo accettasse, lo condurrebbe in una zona piena di alghe, più al sicuro dai predatori, dove potrebbe avvenire la fecondazione delle uova (Rivamar srl, 2024).

Nella descrizione del comportamento riproduttivo, non si può escludere un vero artista dei mari, il piccolo pasce palla *Torquigener albomaculosus*, ritrovato nelle acque oceaniche dell'arcipelago giapponese delle "Ryukyu islands". Il maschio di questa specie non utilizza mai due volte lo stesso nido (Fig. 2) e lo allestisce durante la fase di corteggiamento per impressionare la femmina. Lavora per circa una settimana, controllandolo costantemente al fine di impedire che la corrente distrugga il frutto della propria fatica. L'opera d'arte che ne risulta è un'incredibile composizione geometrica circolare, finemente decorata con sassi e conchiglie che può raggiungere la considerevole dimensione di 2m di diametro (Matsura, 2015).



Fig. 2) Questa splendida immagine mostra l'abilità artistica che il maschio del piccolo pesce palla *Torquigener albomaculosus* possiede durante il periodo di accoppiamento. La perfetta simmetria geometrica, associata alle notevoli dimensioni dell'opera (circa 2m di diametro), non possono che stupire (Ookata, 2015)

1.1.7 Predatori

I pesci palla in linea teorica avrebbero molti predatori naturali, ma dispongono di abilità e tecniche che sfruttano in caso di necessità. Grazie alla loro capacità di gonfiarsi rendono infatti disagiata la prensione e ciò permette loro di sfuggire alla morte nella maggior parte dei casi (Bottasini, 2019). Oltretutto qualora venissero catturati ed ingeriti, il predatore molto probabilmente andrebbe incontro a morte per azione della tetrodotossina (TTX), la potente neurotossina che essi accumulano nei visceri, nelle gonadi e, durante la stagione di riproduzione, anche nelle uova. Tuttavia non tutte le specie accumulano TTX ed, inoltre, gli squali sembrano aver sviluppato una resistenza nei suoi confronti (Keywestaquarium.it, 2024).

1.1.8 Locomozione

I Tetraodontidi seguono un meccanismo di locomozione molto particolare, tanto da essere stato definito dagli esperti “Tetraodontiform mode”. Le loro pinne anali e dorsali, di ridotte dimensioni, si sono evolute per assumere una conformazione che ricorda quella di una pagaia. Usandole come se fossero un’unità, grazie a movimenti ondulatori rapidi e complessi, sono in grado di muoversi. I muscoli erettori e depressori delle pinne anali e dorsali, nel corso dei secoli, si sono modificati affinché i movimenti fossero laterali piuttosto che verticali. La pinna caudale funge da timone per la maggior parte del tempo e solo in caso di necessità è riservata a scatti di velocità. Le pinne pettorali si trovano in uno stato di quasi costante vibrazione, permettendo così una finezza di controllo dei movimenti che risulta insolita anche tra i pesci (Lindsey, 1978).

1.2 I TETRAODONTIDI RILEVATI NEL MEDITERRANEO IN PROSSIMITA' DELLE COSTE ITALIANE

Nelle acque del Mar Mediterraneo, in prossimità delle coste italiane, sono state individuate tre specie di Tetraodontidi (*Lagocephalus sceleratus*, *Lagocephalus lagocephalus* e *Sphoeroides pachygaster*) che saranno oggetto di trattazione dettagliata.

1.2.1 *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) “pesce palla argenteo o pesce rospo dalle guance argentate”

Pesce teleosteo appartenente alla Famiglia *Tetraodontidae*. L'etimologia del suo nome deriva dal greco *lagos* = lepre e *kephale* = testa.

Abita generalmente ambienti marini con annessa barriera corallina, sebbene lo si ritrovi anche in zone con fondali sabbiosi, fangosi e rocciosi.

La sua distribuzione geografica comprende l'Oceano Indopacifico e, ultimamente, anche il Mar Mediterraneo.

La dimensione media degli esemplari si aggira intorno ai 40 cm, mentre la massima registrata per un esemplare di questa specie è stata di 110 cm con un peso di 9kg (Fishbase, 2024).

Il suo corpo è cilindrico e schiacciato ventro-lateralmente.

La colorazione della pelle va dal verde al marrone con macchie nere sul dorso. Presenta una banda grigia che si estende dalla bocca alla pinna caudale, mentre il ventre è bianco. In corrispondenza degli occhi mostra una macchia argentata.

La pinna dorsale presenta da 10 a 13 raggi molli, la pinna anale da 8 a 12 (Carbonara et al., 2017).

Questa specie è in grado di accumulare TTX e per questo è spesso associata a casi di intossicazione anche fatali.

Ha una grande capacità di adattamento ambientale, cosa che ne ha favorito la diffusione rendendolo un abile colonizzatore in grado di competere efficacemente anche con specie autoctone carnivore (Bottasini, 2019).

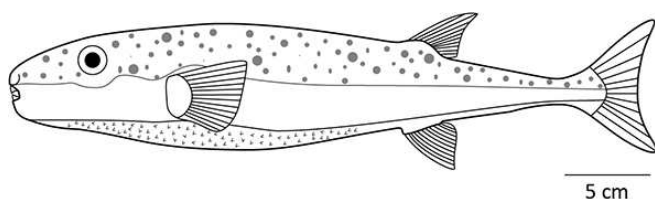
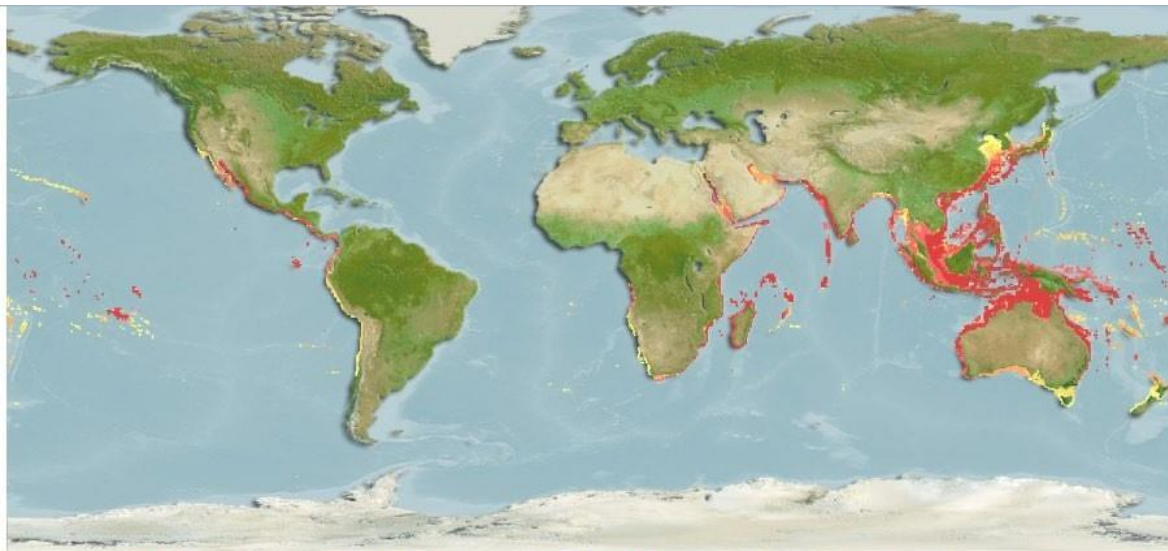


Fig. 3) *Lagocephalus sceleratus* (Chu, 2021)



Note: Distribution range colours indicate degree of suitability of habitat which can be interpreted as probabilities of occurrence.

<p>Relative probabilities of occurrence</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ 0.80 - 1.00 ■ 0.60 - 0.79 ■ 0.40 - 0.59 ■ 0.20 - 0.39 ■ 0.01 - 0.19 	<p>Explore:</p> <ul style="list-style-type: none"> Native range map Suitable habitat map Point map <p>Show mapping parameters</p> <p>Create your own map</p>	<p>Download native range data:</p> <ul style="list-style-type: none"> csv format NetCDF (view in Godiva) <p>About AquaMaps</p>	<p>More species info:</p> <ul style="list-style-type: none"> List of countries List of FAO areas List of ecosystems <p>Comments & Corrections</p>	<p>Session no. 3</p> <p>-Close window-</p> <p><i>Please use -Close window-link just above to exit instead of the browser's X button.</i></p>
---	--	---	---	---

Fig. 4) Distribuzione geografica di *Lagocephalus sceleratus* generata tramite computer (Fishbase, 2024)

1.2.2 *Lagocephalus lagocephalus* (Linnaeus, 1758) “pesce palla oceanico”

Pesce teleosteo appartenente alla Famiglia *Tetraodontidae*. Abita ambienti marini con un atteggiamento bentopelagico oceanico essendo rinvenibile sia in prossimità dei fondali sia al livello medio dell'acqua, compresi gli estuari. La sua distribuzione geografica lo vede diffuso in tutto il mondo, preferenzialmente in acque tropicali o aree marittime temperate.

La dimensione massima registrata è stata di 61cm, con un peso di 3,2kg.

La pinna dorsale presenta da 13 a 16 raggi molli, la pinna anale da 11 a 13.

I soggetti adulti hanno una livrea che può variare dal verde, al grigio-marrone, al blu dorsalmente, mentre il ventre è bianco. Durante lo stadio giovanile, gli esemplari mostrano 9 linee sul dorso, che si estendono dagli occhi fino alla pinna dorsale. Sono presenti macchie scure che occupano la parte anteriore del corpo fino alla parte media del ventre e del fianco (Shipp, 2006).

Si nutre di crostacei e molluschi.

Si sospetta sia responsabile di numerose intossicazioni umane a causa della sua capacità di accumulare TTX (Fishbase, 2024).

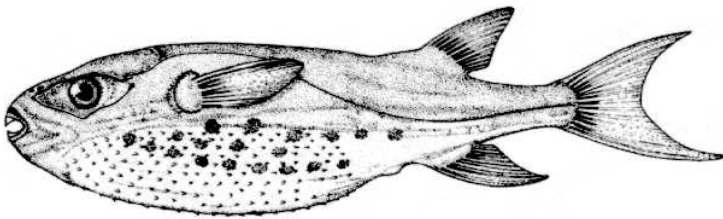
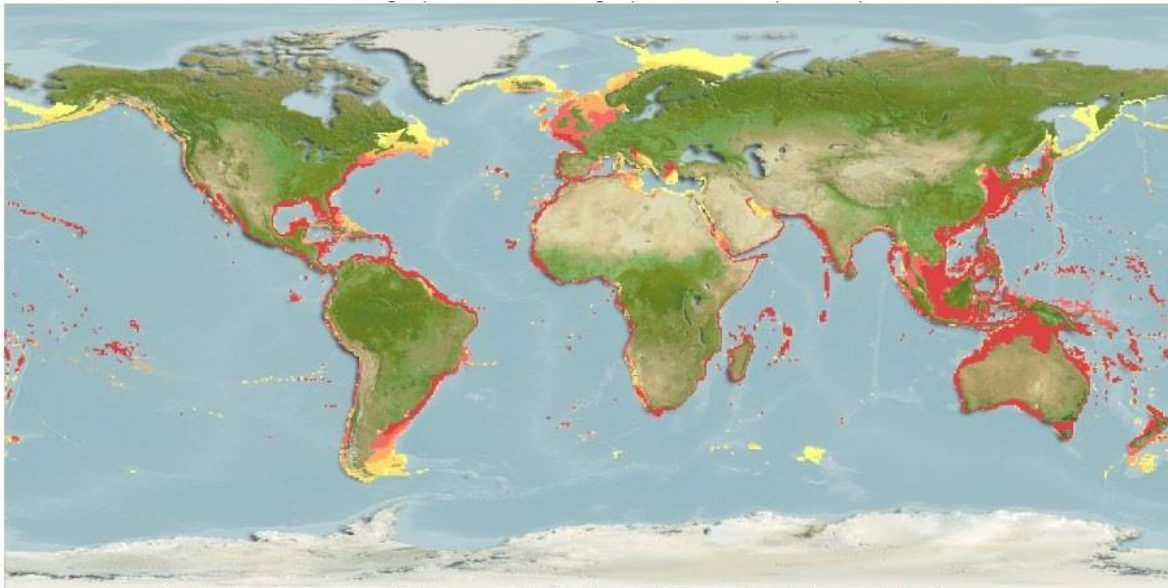


Fig. 5) *Lagocephalus lagocephalus* (Lane, 2001)



Note: Distribution range colours indicate degree of suitability of habitat which can be interpreted as probabilities of occurrence.

<p>Relative probabilities of occurrence</p> <ul style="list-style-type: none"> 0.80 - 1.00 0.60 - 0.79 0.40 - 0.59 0.20 - 0.39 0.01 - 0.19 	<p>Explore:</p> <ul style="list-style-type: none"> Native range map Suitable habitat map Point map Show mapping parameters Create your own map 	<p>Download native range data:</p> <ul style="list-style-type: none"> csv format NetCDF (view in Godiva) About AquaMaps 	<p>More species info:</p> <ul style="list-style-type: none"> List of countries List of FAO areas List of ecosystems Comments & Corrections 	<p>Session no. 85</p> <p>-Close window-</p> <p><i>Please use -Close window-link just above to exit instead of the browser's X button.</i></p>
---	--	---	---	--

Fig. 6) Distribuzione geografica di *Lagocephalus lagocephalus* generata tramite computer (Fishbase, 2024)

1.2.3 *Sphoeroides pachygaster* (Muller e Troschel, 1848) “pesce palla dalla testa smussata”

Pesce teleosteo appartenente alla Famiglia dei *Tetraodontidae*. L'etimologia del nome deriva dal greco *sphaira*= palla + il suffisso *oides*= simile a. Il nome gli è stato dato per la forma particolarmente rotondeggiante del muso.

Abita ambienti marini con atteggiamento bentopelagico negli adulti, mentre i soggetti giovani sono pelagici. La sua distribuzione geografica lo vede presente in tutto il mondo con prevalenza di rilevamento in aree tropicali e nei mari temperati con fondali sabbiosi, fangosi o rocciosi.

La dimensione massima registrata è stata di 40,5cm, ma più comunemente si aggira attorno ai 26cm (Fishbase, 2024).

La testa è grande con grandi occhi ovali e il corpo è sprovvisto di spine.

La colorazione sul dorso va dal brunastro al verde oliva, con talvolta macchie nerastre che si estendono anche sui fianchi; il ventre è biancastro (Carbonara et al., 2017).

La pinna dorsale presenta da 7 a 9 raggi molli, la pinna anale da 8 a 10.

Si nutre prevalentemente di molluschi.

Sphoeroides pachygaster, al contrario delle altre due specie prese in esame, non è chiaro se possa considerarsi un pericolo per la salute umana poiché non è certo che accumuli TTX (Fishbase, 2024).

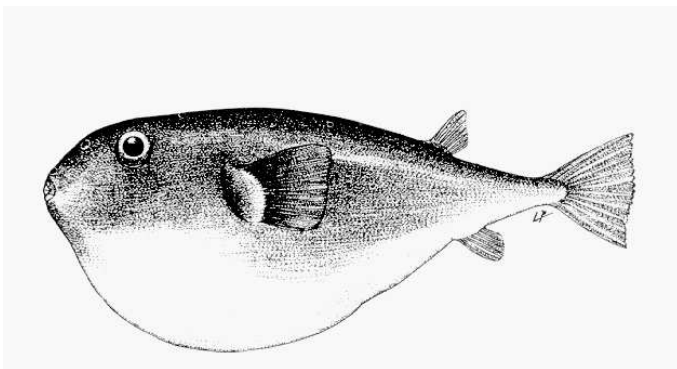
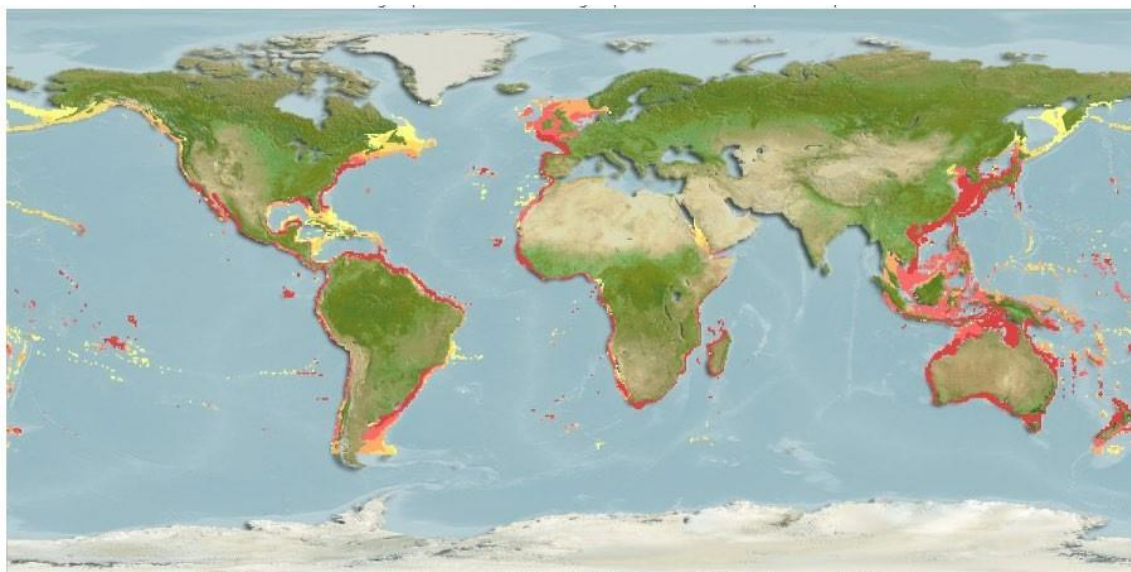


Fig. 7) *Sphoeroides pachygaster* (FAO, 2001)



Note: Distribution range colours indicate degree of suitability of habitat which can be interpreted as probabilities of occurrence.

<p>Relative probabilities of occurrence</p> <ul style="list-style-type: none"> 0.80 - 1.00 0.60 - 0.79 0.40 - 0.59 0.20 - 0.39 0.01 - 0.19 	<p>Explore:</p> <ul style="list-style-type: none"> Native range map Suitable habitat map Point map Show mapping parameters Create your own map 	<p>Download native range data:</p> <ul style="list-style-type: none"> csv format NetCDF (view in Godiva) About AquaMaps 	<p>More species info:</p> <ul style="list-style-type: none"> List of countries List of FAO areas List of ecosystems Comments & Corrections 	<p>Session no. 88</p> <ul style="list-style-type: none"> -Close window- <i>Please use -Close window-link just above to exit instead of the browser's X button.</i>
--	--	---	---	---

Fig. 7) Distribuzione geografica di *Sphaeroides pachygaster* generata tramite computer (Fishbase, 2024)

CAPITOLO II

2.1 LA TETRODOTOSSINA (TTX)

2.1.1 Introduzione

La tetrodotossina (TTX) è una delle più potenti tossine marine ad oggi conosciute, più potente di circa 1000 volte del cianuro di potassio (KCN) (Katikou et al., 2022)

La TTX ha come meccanismo d'azione quello di bloccare i canali di Na^+ a potenziale di membrana dipendenti e ridurre notevolmente l'eccitabilità di membrana dei tessuti vitali, in particolare del tessuto muscolare scheletrico e del sistema nervoso periferico (SNP).

La TTX è responsabile di numerosi casi di intossicazioni alimentari nell'uomo, talvolta fatali se la dose ingerita supera i 1,5-2,0 mg TTX (equivalente ad una concentrazione di TTX nel sangue di 9ng/ml). Queste forme di intossicazione sono legate prevalentemente al consumo di pesci appartenenti alla Famiglia Tetraodontidae, perchè accumulatori della tossina e facenti parte della tradizione alimentare locale in paesi asiatici come Giappone e Bangladesh.

Nonostante la nota pericolosità della TTX, alcuni ricercatori ritengono sia possibile prendere in considerazione la possibilità di sfruttare il suo meccanismo d'azione a scopo terapeutico (Bucciarelli et al., 2021).

2.1.2 Le origini

Nel corso della storia l'uomo è entrato in contatto con varie tossine di origine marina, tra cui la TTX. A causa di questa, che viene accumulata da diversi organismi superiori come i pesci appartenenti alla Famiglia dei Tetraodontidae, si sono verificate frequentemente intossicazioni alimentari nell'uomo.

I primi europei di cui si ha documentazione scritta di una probabile intossicazione da TTX da consumo di pesci palla, ipotesi desunta dalla descrizione della sintomatologia, sono stati il Capitano J. Cook e i naturalisti J.R. Forster e G. Forster intorno alla metà del 1700. Nel diario di bordo del comandante fu registrato l'accaduto, in quanto Cook e gli uomini al suo seguito, si trovarono a mangiare le parti muscolari di pesci palla pescati nei Tropici, lasciando gli scarti, tra cui i visceri, ai maiali in stiva. Da quanto descritto con dovizia di particolari, gli uomini manifestarono alcuni dei più tipici sintomi associabili ad intossicazione da TTX come debolezza generalizzata, diaforesi, sintomi gastrointestinali e ottundimento del sensorio, mentre i suini vennero trovati morti. Questa differenza di epilogo presumibilmente fu dovuta al fatto che, mentre Cook e i suoi compagni assunsero le parti contenenti una dose minore di TTX, ai maiali furono destinate quelle con una maggior concentrazione della tossina (come gonadi e fegato) e l'esito di conseguenza fu letale.

All'epoca di Cook non si riuscì certo a capire la causa di tale intossicazione e ci volle ancora molto tempo prima che la tossina venisse scoperta e descritta nel modo in cui oggi la conosciamo (Doherty, 2005).

Il 1894 è una data cardine, ossia quando il dott. Yoshizumi Tahara mostrò al “Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan” una tossina isolata dalle ovaie di un pesce palla, lo *Sphaeroides rubripes* (*Takifugu rubripes*). Questo evento può considerarsi la prima vera presentazione della TTX al mondo scientifico. Il metodo di estrazione e di purificazione fu poi implementato e migliorato da Tahara stesso nel corso degli anni. Nel 1909 egli confermò che il pesce palla contenesse una sostanza tossica che nominò tetrodotossina dal nome della Famiglia di pesci da cui tale sostanza fu primariamente isolata, i Tetraodontidi (Lago et al., 2015).

Lo studio approfondito della molecola fu comunque tutt'altro che semplice e richiese molto tempo e impegno da parte degli studiosi e ricercatori coinvolti.

A metà del secolo scorso tre diversi gruppi di ricercatori, arrivarono in modo indipendente a determinarne la struttura chimica, ma solo nel 1964 gli scienziati Toshio Narahashi e John W. Moore (Narahashi et al., 1964) ne scoprirono e compresero definitivamente il meccanismo d'azione.

L'esistenza di un principio tossico mortale associato ai pesci della Famiglia dei Tetraodontidae è comunque nota fin dall'antichità, come documentato da reperti archeologici e scritti di antiche civiltà vissute in Egitto e in Cina. In alcuni geroglifici egizi, datati al 2500 a.C., si parla della morte di un faraone della V Dinastia dopo che si era cibato di un pesce palla.

Nella Legge Mosaica (1451 a.C.) vigeva il divieto di “consumare pesci senza squame o senza pinne...” (caratteristiche tipiche dei Tetraodontidi), mentre in vari documenti cinesi del 618 d.C si attestava la morte di alcuni imperatori della Dinastia Han a causa di Tetraodontidi.

In Giappone le gonadi femminili di pesci palla erano ingerite in taluni contesti per togliersi la vita nel modo il più rapido possibile, ma il consumo di questi pesci fu vietato per alcuni secoli, dall'epoca della dinastia Tokugawa (1600) fino al “periodo del Regno illuminato” o “periodo Meiji” (1900) (Fazio, 2022).

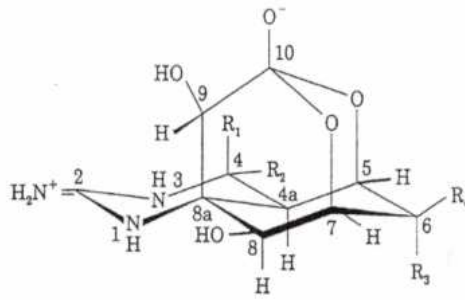
2.1.3 Caratteristiche chimiche

La TTX è un composto organico eterociclico della peridrochinazolina (perhydroquinazolin). La sua formula molecolare è $C_{11}H_{17}N_3O_8$, con un basso PM pari a 319.

La molecola è costituita da un gruppo guanidinico costituito da tre atomi di azoto, caricato positivamente e da un anello pirimidinico, caricato negativamente, con strutture cicliche fuse, contenenti gruppi idrossili (-OH) (Zhang et al., 2020).

Sono stati individuati 30 suoi diversi analoghi strutturali, a loro volta suddivisi in tre gruppi: emilattali, lattoni e 4,9-anidrotetraodotossine, ciascuno con un diverso grado di tossicità (Fig. 8) (Katikou et al., 2022). Pare che il grado di tossicità sia legato alla struttura stessa. Diversi studi hanno dimostrato che gli analoghi contenenti dei sostituenti idrossilici siano più tossici della TTX stessa, mentre quelli presentanti sostituenti desossi lo siano meno. Il numero e la posizione dei gruppi idrossilici all'interno della TTX e dei suoi analoghi e l'effetto che questo comporta è stato preso in considerazione nel 1999 dal professor Yotsu-Yamashita et al. A tale scopo è stata valutata la loro differente capacità di attraversare la membrana ematoencefalica di ratto. Secondo quanto evidenziato la presenza dei gruppi idrossilici in posizione C-6 e C-11 ha una valenza fondamentale sul legame che le molecole mostrano con i canali del Na⁺ voltaggio dipendenti per la compartecipazione al legame idrogeno. Invece, il dr. Pires e collaboratori (2003) hanno dimostrato che l'analogo 11-ossotetrodotossina è da 4 a 5 volte più tossico della TTX stessa (Madejska et al., 2019).

Dal punto di vista fisico si mostra come una sostanza cristallina, incolore e debolmente basica. I cristalli di TTX sono insolubili in solventi organici, ma solubili in soluzioni idroalcoliche e acide. Risulta infine stabile se riscaldata in una soluzione debolmente acida, ma instabile se viene riscaldata in una soluzione neutra o alcalina o fortemente acida (Katikou et al., 2022).



	R1	R2	R3	R4
tetrodotossina	H	OH	OH	CH ₂ OH -
4-epitetrodotossina	OH	H	OH	CH ₂ OH -
6-epitetrodotossina	H	OH	CH ₂ OH -	OH
11-desossitetrodotossina	H	OH	OH	CAP ³
11-Nortetrodotossina-6(R)-olo	H	OH	H	OH
11-Nortetrodotossina-6(S)-olo	H	OH	OH	H
11-nortetrodotossina-6,6-diolo	H	OH	OH	OH
11-ossotetrodotossina	H	OH	OH	CH(OH) ²

Fig. 8) Struttura della tetrodotossina e dei suoi principali analoghi strutturali. (Ministero della Salute, del Lavoro e del Benessere del Giappone, 2005).

2.1.4 La tetrodotossina in natura

Inizialmente si era pensato che tale tossina fosse presente solo nella famiglia ittica dei Tetraodontidi, sebbene non fosse chiaro il modo in cui questa si accumulasse nei loro tessuti e se il principio tossico fosse da considerarsi endogeno, ossia che prodotta dal pesce palla stesso o esogeno, legato quindi alla catena alimentare. Fu suggerita anche l'ipotesi che fossero coinvolte microalghe Dinoflagellate che si suppose contenessero batteri simbiotici, i reali produttori della TTX. Le microalghe contenenti TTX sarebbero state consumate da altri organismi marini bentonici, come molluschi e stelle marine, dei quali a loro volta si sarebbero cibati i pesci palla con conseguente accumulo di TTX nella catena alimentare e la sua biomagnificazione.

Nel momento in cui la TTX venne rilevata non solo in organismi terrestri e acquatici non filogeneticamente correlati, ma anche in sedimenti ambientali marini e di acqua dolce, l'ipotesi della produzione endogena venne definitivamente scartata e fu rafforzata quella secondo cui i metazoi accumulerebbero la TTX tramite la dieta, per cui in modo esogeno (Noguchi e Arakawa, 2008).

Sono state inoltre condotte diverse sperimentazioni basate sulla somministrazione di specifiche diete, contenenti o meno il principio tossico della TTX per dimostrare l'ipotesi dell'accumulo esogeno della tossina nei pesci palla. Nel corso di queste si è osservato che esemplari di pesce palla,

originariamente allevati come “atossici”, avevano acquisito tossicità dopo una dieta contenente TTX. L’accumulo si è osservato in zone corporee diverse in base all’età dei soggetti: per esempio negli adulti è stato più coinvolto il fegato, mentre nei giovani la TTX si è accumulata soprattutto nella cute.

Consapevoli di quanto detto, pesci palla “tossici” dovrebbero dunque diventare atossici dopo un periodo di disintossicazione a base di diete “TTX free” (Honda et al., 2005).

L’accumulo di TTX e la cinetica di trasferimento valutata in diverse specie di pesce palla come *Takifugu rubripes*, *Takifugu porphyreus*, *Takifugu poecilonotus* e *Takifugu alboplumbeus* hanno indicato come la distribuzione, l’accumulo e l’eliminazione di TTX possa variare tra le diverse specie (Lago et al., 2015).

Negli ultimi anni, in Giappone nella parte pacifica della regione del Tohoku e nella prefettura di Ibaraki, si è registrato un aumento del numero di ibridi, nati dall’unione tra il nativo Shosaifugu (*Takifugu synderi*) e il Gomafugu (*Takifugu*), probabilmente importato dal Mar del Giappone. In queste specie ibride pare che le regole riguardanti l’individuazione delle parti corporee tossiche non siano applicabili in modo assoluto e dunque la loro gestione deve richiedere maggior cautela (Ministero della Salute, del Lavoro e del Benessere del Giappone, 2005).

2.1.5 Meccanismo di accumulo ed eliminazione della TTX nei pesci palla

Il meccanismo di accumulo ed eliminazione della TTX può essere spiegato prendendo in considerazione il progetto condotto da un gruppo di ricercatori cinesi presso il “Laboratory of Aquatic Product Processing and Quality Safety, Marine Fisheries Research Institute of Zhejiang” (Zhang et al., 2020)

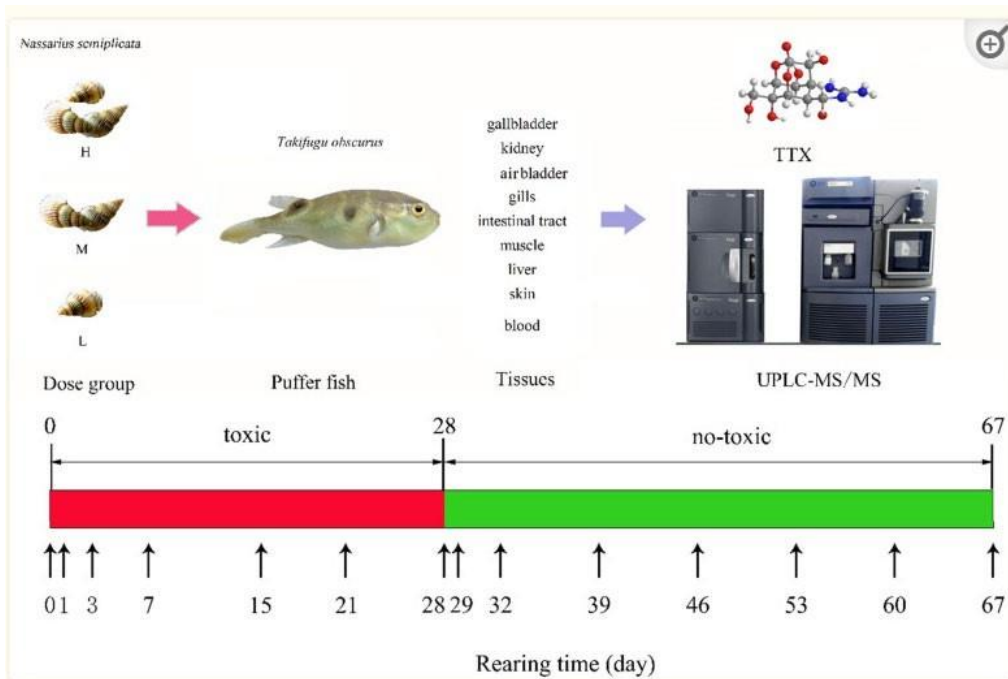


Fig. 9) Diagramma riassuntivo dei materiali e metodi utilizzati per la valutazione del processo di accumulo e dell'escrezione della tossina TTX dai tessuti dei pesci palla (per esempio in *Takifugu obscurus*) (Zhang et al., 2020)

La specie presa in considerazione è stata *Takifugu obscurus*. Lo scopo era quello di simulare l'accumulo e l'eliminazione di TTX che sarebbe avvenuto in condizioni naturali alimentando i pesci con la lumaca marina *Nassarius semiplicata*, la quale ha la capacità di accumulare TTX. Lo studio ha descritto i modelli spatio-temporali della distribuzione della TTX nei diversi tessuti evidenziando i modelli di accumulo ed eliminazione della TTX in *T. obscurus* in condizioni naturali.

La prima parte dell'esperimento, ha previsto la presa in esame di soggetti "atossici" di *T. obscurus* di 3 mesi. Essi sono stati suddivisi in 3 gruppi ed alimentati per 28 giorni ciascuno con una diversa dieta a dose crescente di TTX (rispettivamente a 100, 210 e 600 ng di TTX per g di alimento). Da ciascun gruppo sono stati selezionati in maniera casuale 3 individui e in essi è stato calcolato l'accumulo e la distribuzione della TTX nei vari tessuti. Successivamente i medesimi gruppi sono stati alimentati con una dieta priva di TTX fino al 67° giorno (Fig. 9).

Exposure Dose Group	TTX in Feed (ng/g)	Feed Intake (g)	Total TTX (ng)	Actual Accumulation of TTX (ng)	Accumulation Ratio (%)
Low-dose group	100	25.67 ± 2.1	2567 ± 210	1032 ± 104	40.20 ± 5.2
Medium-dose group	210	26.03 ± 3.2	5466 ± 320	1955 ± 110	35.76 ± 4.9
High-dose group	600	23.75 ± 2.4	14250 ± 240	5420 ± 173	38.03 ± 4.1

Tabella 1) Rapporto di accumulo della tetrodotossina TTX in tutti i gruppi a diverso grado di esposizione (Zhang et al., 2020)

Da quanto è possibile osservare nella Tabella 1 il quantitativo di mangime assunto è stato simile in tutti i gruppi e l'effettivo accumulo di TTX è andato via via aumentando in parallelo con l'accrescersi della tossina all'interno dell'alimento. Inaspettatamente, il tasso di accumulo della TTX nei tessuti ha assunto valori diversi. La percentuale maggiore di accumulo (40,2%), è stata rilevata nei soggetti appartenenti al gruppo alimentato a minore dosaggio, mentre l'accumulo minore (35,76%) si è osservato nel gruppo a medio dosaggio. Da questo è stato dedotto che in *T. obscurus* l'efficacia di accumulo della tossina aumenta quando l'esposizione è a basse dosi, ma in ogni caso non si è osservata una relazione lineare tra l'accumulo di TTX e la dose di TTX somministrata.

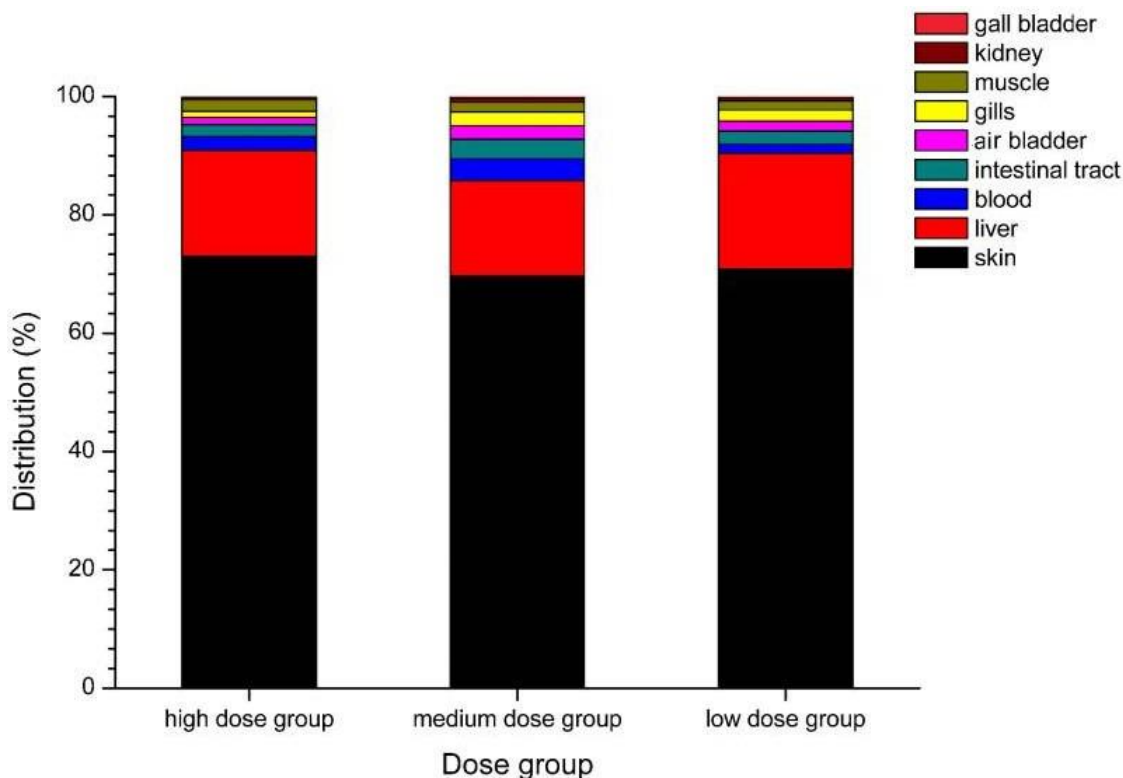
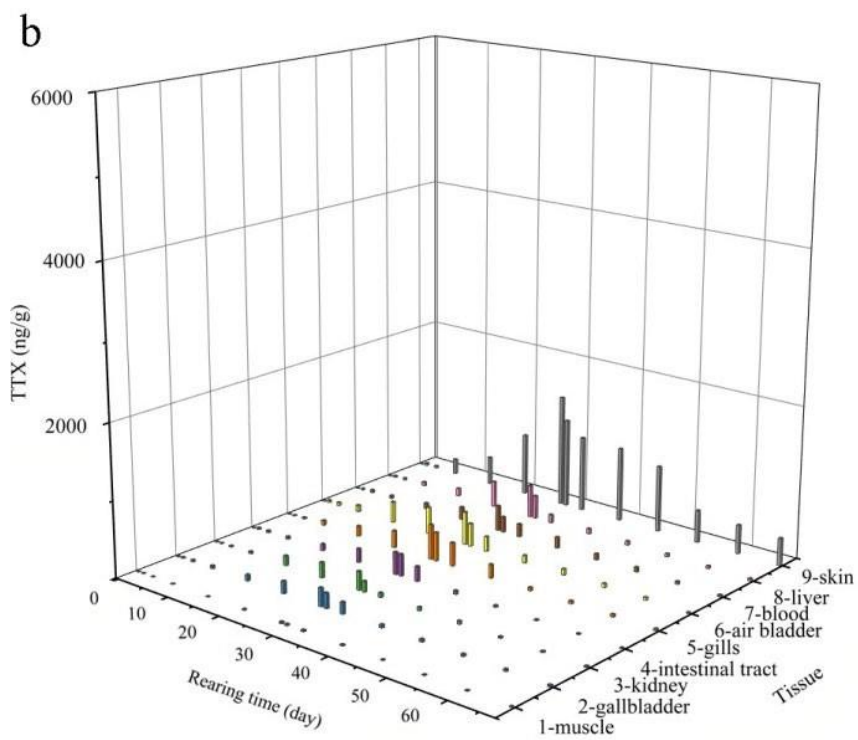
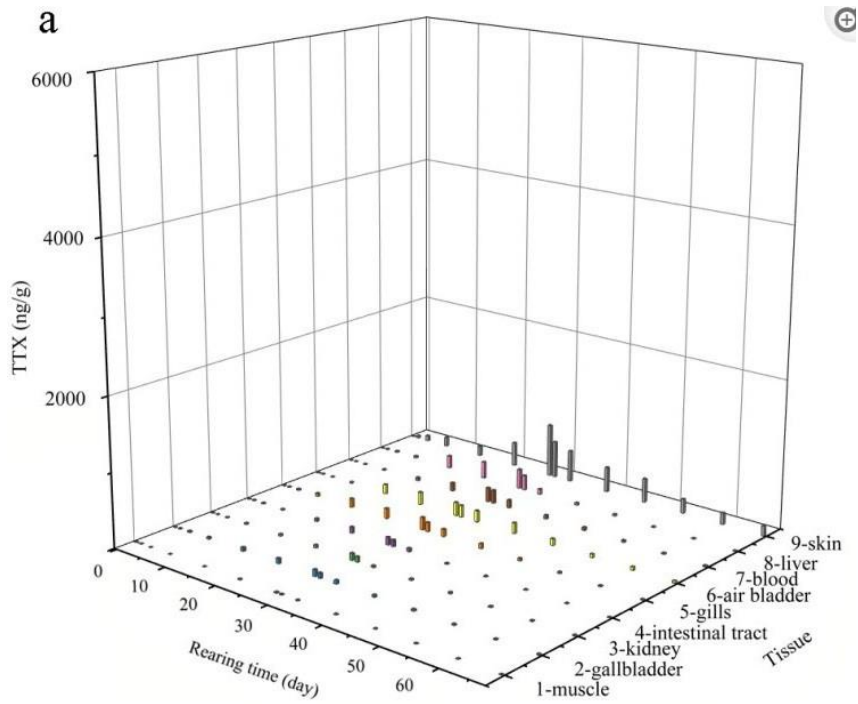


Grafico 1) Distribuzione anatomica della TTX nei 3 gruppi a diverso dosaggio di somministrazione. (Zhang et al., 2020)

L'accumulo di TTX nei diversi tessuti di *T. obscurus* è illustrato nel Grafico 1. L'analisi è stata eseguita al giorno 28 di sperimentazione tramite tecnica UPLC-MS/MS (Ultra-high performance liquid chromatography-MS/MS), facendo passare il campione attraverso due spettrometri di massa in successione. La distribuzione di TTX è stata successivamente analizzata combinando i dati della sua concentrazione con il peso del tessuto.

L'accumulo si è mostrato maggiore nella pelle (69,7% - 73%) e nel fegato (16,05% - 19,58%), rispetto agli altri organi considerati; tra cute e fegato si supera l'85% della TTX presente nel pesce. Sono state inoltre osservate differenze nella distribuzione della TTX tra i diversi gruppi. La proporzione di TTX nel sangue dei soggetti a dosaggio medio e alto era superiore a quella

nell'intestino, nella vescica, nelle branchie e nei muscoli, mentre la proporzione di TTX nel sangue del gruppo a dosaggio basso era significativamente inferiore.



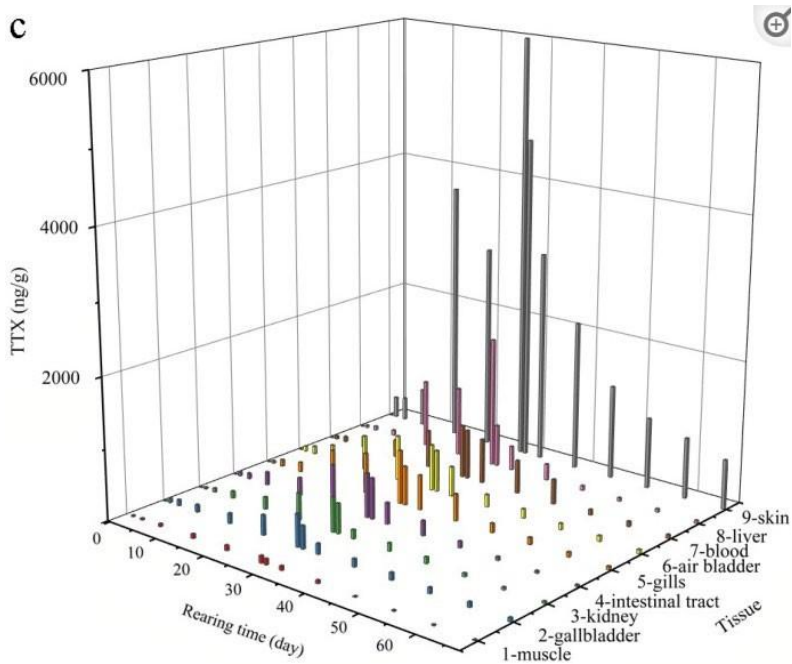


Grafico 2) Tasso di accumulo e di eliminazione di TTX nei diversi tessuti dei 3 gruppi di *T. obscurus*. (Zhang et al., 2020)

Legenda:(a) basso dosaggio. (b) medio dosaggio. (c) alto dosaggio.

Si può notare come durante il periodo di accumulo durato 28 giorni, il livello di TTX nei tre gruppi sia aumentato progressivamente con il passare del tempo (Grafico 2).

In tutti i tessuti, i tassi di accumulo iniziali si sono mostrati più lenti (giorni 1-7), variando da 0,17 ng/g/giorno a 39,20 ng/g/giorno, mentre quelli più rapidi si sono verificati nel periodo centrale (giorni 7-21), passando da 0,86 ng/g/giorno a 338,09 ng/g/giorno. Infine nella fase finale (giorni 21-28), i tassi di accumulo sono nuovamente rallentati, scendendo da 328,57 ng/g/giorno a 0,33 ng/g/giorno. Raggiunto il 28° giorno, la concentrazione di TTX nella pelle ha raggiunto i valori più alti, con 717,4, 1.484 e 6.000 ng/g nei gruppi a dosaggio basso, medio e alto, rispettivamente.

La costante di velocità di accumulo di TTX è stata calcolata utilizzando la relazione tra la concentrazione di accumulo e la concentrazione di alimentazione. Successivamente l'analisi della varianza ha mostrato che non vi è stata alcuna differenza significativa ($p > 0,05$) nella costante di velocità di accumulo nello stesso tessuto tra i tre gruppi.

I diversi tessuti sono stati divisi in quattro gruppi in base al valore ottenuto della costante di velocità di accumulo:

- I. gruppo rapido-costante: tessuto cutaneo, con un massimo di 8,06
- II. gruppo sub-rapido-costante: fegato (2,58), vescica natatoria (1,74), branchie (1,62) e sangue (1,58)
- III. gruppo medio-rapido-costante: intestino (1,15), rene (0,96) e cistifellea (0,93)
- IV. gruppo basso-costante: tessuto muscolare, con un valore minimo di 0,12.

Dose Group	Tissues	TTX-C ₀ Day 28 (ng/g)	TTX-C _t Day 67 (ng/g)	Elimination Rate K (d ⁻¹)	Half-Life Period B _{1/2} (d)
Low-dose group	gallbladder	87.96	9.53	0.084	8.25
	kidney	91.53	8.55	0.391	1.77
	air bladder	178.1	29.04	0.042	16.50
	gills	170.29	6.72	0.088	7.88
	intestinal tract	101.23	3.33	0.236	2.94
	muscle	10.68	2.32	0.040	9.16
	liver	262.18	4.42	0.387	1.79
	skin	717.34	135.66	0.042	16.50
	blood	189.35	14.42	0.105	6.60
Medium-dose group	gallbladder	238.84	19.79	0.132	5.25
	kidney	244.47	14.03	0.496	1.40
	air bladder	458.22	22.909	0.138	5.02
	gills	435.86	10.49	0.100	6.93
	intestinal tract	291.46	8.14	0.156	4.44
	muscle	20.51	2.79	0.056	12.38
	liver	427.62	27.88	0.399	1.74
	skin	1484.20	358.79	0.035	19.80
	blood	333.96	22.25	0.068	10.19
High-dose group	gallbladder	460	50.25	0.100	6.93
	kidney	486.47	29.07	0.320	2.17
	air bladder	757	43.86	0.098	7.07
	gills	650.12	54.82	0.075	9.24
	intestinal tract	622.93	18.1	0.12	5.78
	muscle	99.36	7.4	0.092	7.53
	liver	1840.3	41.18	0.952	0.73
	skin	6000	699.35	0.076	9.12
	blood	750.13	50.1	0.059	11.75

Tabella 2) Parametri della cinetica di eliminazione di TTX dai tessuti dei 3 gruppi di *T. obscurus*. (Zhang et al., 2020)

Facendo riferimento alla Tabella 2, durante il periodo di eliminazione, che ha seguito il periodo di somministrazione di TTX con la dieta. Il contenuto di TTX nei tessuti ha mostrato un andamento

decescente, con il declino più rapido dal 29° al 39° giorno, molto più lento nel periodo successivo (giorni 39-67).

Calcolando la costante K di eliminazione della tossina e la varianza ad essa riferita, si è osservata una trascurabile differenza nella velocità di eliminazione tra i diversi gruppi ($p < 0.05$). Naturalmente la velocità di eliminazione è stata diversa in base al tessuto considerato.

I tessuti con i tassi di eliminazione più elevati sono stati il fegato, i reni e l'intestino che hanno presentato valori di K rispettivamente 0,952, 0,496 e 0,236.

La cistifellea, la vescica natatoria e le branchie, hanno mostrato valori di K intermedi, rispettivamente di 0,132, 0,138 e 0,100.

I tessuti con il tasso di eliminazione più basso sono stati i muscoli e la pelle, con valori K rispettivamente di 0,040 e 0,035.

Dopo 39 giorni dalla sospensione dell'alimentazione con TTX, il contenuto residuo di TTX nel muscolo è risultato il più basso in tutti i gruppi presi in esame, raggiungendo 2,32 ng/g, 2,79 ng/g e 7,4 ng/g, rispettivamente nei gruppi a dosaggio basso, medio e alto.

La pelle conteneva invece il quantitativo più elevato di TTX residuo in tutti i gruppi, con valori rispettivamente di 135,66, 358,79 e 699,35 ng/g, a seconda del dosaggio somministrato (basso, medio e alto). Al giorno 28, ossia al termine del periodo di accumulo, nella pelle la concentrazione massima di TTX era di 6.000 ng/g, ovvero tre volte il limite normativo stabilito in Giappone. Ipotizzando di considerare il valore limite (2.000 ng/g) nel modello di eliminazione, si è stimato che la TTX nella pelle potrebbe scendere al di sotto del limite di sicurezza dopo 12,3 giorni.

I risultati ottenuti da questo studio sembrano dimostrare che i pesce palla siano in grado di accumulare TTX o purificarsi da essa in base al tipo di alimentazione, quindi alla catena alimentare (Zhang et al., 2020).

Riguardo alla capacità di accumulo tramite la catena alimentare ci sono però ancora quesiti irrisolti dal momento che studi condotti su altre cultivar giovanili di specie di pesce palla diverse, allevate in ambienti privi di TTX, e quindi "atossiche", non riacquisivano la capacità di accumulare la tossina sebbene fossero introdotte in ambienti naturali in cui era possibile acquisirla o venissero nutriti con fegati di pesci palla contenenti TTX.

Per questo motivo si ritiene che alcune specie di pesce palla hanno capacità più spiccate di altre nell'eliminare o accumulare TTX all'interno del proprio corpo (Lago et al., 2015).

Tuttavia, è stato dimostrato nel 2019 da un gruppo di ricerca giapponese, con a capo il professor Masafumi Amano, che un'alimentazione esclusivamente a base di mangimi privi di TTX, come richiedono le nuove tecniche di acquacoltura al fine di ottenere un prodotto sicuro per l'alimentazione umana, provoca comportamenti anomali nei pesci palla, come ad esempio una

maggior aggressività. Per questo motivo si ritiene che una certa quantità di tossina sia necessaria per la loro normale attività fisiologica, poiché il comportamento alterato può essere poi annullato somministrando loro alimenti contenenti TTX (Marcil et al., 2006).

Sempre a supporto dell'ipotesi che la TTX svolga anche una importante funzione etologica importante per i pesci palla, vi è la dimostrazione che essa funge da feromone di accoppiamento in *Takifugu niphobles*, attirando i maschi vicino alle femmine in ovulazione.

Gli studi citati mettono in evidenza come molti aspetti circa il veleno del pesce palla non sono ancora pienamente compresi (Masafumi et al., 2019).

Alla base della catena alimentare, che consta di vari step, pare che vi siano alcuni batteri, i quali sono da considerarsi come gli effettivi produttori della tossina, nonostante il quantitativo di produzione troppo basso per giustificare la quantità ritrovata negli organismi superiori. Oltre a questa incongruenza, ad oggi manca anche un vero e proprio metodo scientificamente valido per dimostrare che la TTX abbia un'origine microbica. Nonostante questo, molte specie marine che presentano la TTX sono portatrici nel proprio microbioma di tali batteri.

Finora sono stati identificati più di 150 diversi ceppi batterici capaci di produrre la TTX e tra questi il 30% è costituito da specie appartenenti al genere *Vibrio*, il 15% al genere *Bacillus*, mentre un ulteriore 7% comprende i generi *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Aeromonas*, *Streptomyces* e *Roseobacter*. Considerando nello specifico i pesci palla, le specie di batteri isolate da essi appartengono ai generi *Vibrio spp.* e *Aeromonas* (Magarlamov et al., 2017)

Secondo alcuni ricercatori il numero di batteri produttori di TTX potrebbe essere stato sovrastimato, mentre altri studi suppongono che non tutti i microrganismi TTX-produttori siano coltivabili in laboratorio, o che, sebbene possiedano il corredo genetico per produrre TTX, non riescano a sintetizzarla ex situ. Tra i generi batterici considerati il genere *Bacillus* ha dimostrato la più spiccata capacità ed efficacia nel produrre TTX alle condizioni di laboratorio standard, mantenendo tale capacità fino a cinque anni dopo il suo primo isolamento, mentre nella maggior parte degli altri microrganismi si è riscontrata una perdita di efficacia nella sintesi di TTX, forse per contaminazione da parte di altri microrganismi (Katikou et al., 2022).

2.1.6 I pesci palla

Sebbene molti organismi marini siano in grado di produrre e/o accumulare nei loro tessuti la TTX, di certo i pesci palla ne sono la fonte più conosciuta e a cui è associata la maggior parte delle intossicazioni umane specialmente in paesi che si affacciano sull'Oceano Indiano o nell'Estremo Oriente come il Giappone, dove tradizionalmente tale pesce è consumato e apprezzato. La comprensione di come i pesci palla riescano ad accumulare la TTX nel proprio corpo è sicuramente un argomento affascinante, oggetto di studio ancora oggi. Recenti ricerche hanno dimostrato la presenza di alcune proteine plasmatiche in grado di legarsi alla TTX permettendone il trasporto nei diversi organi. Inoltre, i livelli della tossina stessa variano in base alla specie considerata, all'habitat in cui questa vive, al periodo fisiologico e alla stagione (Al-Sulaimani et al., 2022). Di seguito si elencano alcune motivazioni che chiariscono il ruolo dei pesci palla nell'accumulo di TTX.

- Pare che le specie marine accumulino maggiormente TTX nel fegato, nell'intestino e durante la stagione riproduttiva nelle ovaie a scopo protettivo per la prole.

La comprensione di quest'ultimo aspetto è stato l'obiettivo di uno studio sperimentale condotto da un gruppo di ricerca giapponese. In soggetti adulti femmine e larve di *T. rubripes* hanno dimostrato che vi è una trasmissione materna verticale di TTX, con un suo successivo accumulo sulla superficie corporea delle larve (evidenziato tramite tecnica di immunoistochimica con l'uso di anticorpi monoclonali anti-TTX).

Grazie ad analisi in Liquid Chromatography- tandem Mass Spectrometry (LC-MSMS) si è visto come il livello cutaneo di TTX raggiunto non fosse sufficientemente alto da risultare letale per i predatori ma, come osservato in esperimenti di predazione, li inducesse a rigettare immediatamente le larve ingerite, raggiungendo così l'autoconservazione prevista (Itoi et al., 2013).

- Nelle specie di acqua dolce, invece, la tossicità raggiunge livelli maggiori nella pelle, come si evidenzia anche in specifici momenti della vita del pesce palla, ad esempio quando si trova in condizioni di pericolo. Per questo motivo è ragionevole pensare che l'accumulo di TTX abbia, in ultima analisi, un fine difensivo.
- Generalmente il tessuto muscolare e i testicoli sono atossici o presentano una concentrazione minima di tossina, ad eccezione però di alcune specie come *Chelonodontops patoca*, *Lagocephalus lunaris*, e *Lagocephalus sceleratus*.
- È stata inoltre rilevata la presenza di un sistema di trasporto per la tossina nel fegato di alcune specie di pesce palla ed è stato dimostrato che la risorsa principale di TTX, in questi casi, proviene da un batterio endosimbionte che abita normalmente il loro intestino. Si è

dunque supposto che, in principio, il pesce palla acquisisca il batterio produttore di TTX, che in seguito possa persistere come ospite a livello intestinale.

A questo proposito, recentemente è stato isolato dall'intestino del pesce palla *Takifugu niphobles* un nuovo batterio produttore di TTX: *Raoultella terrigena*. Tramite il sequenziamento del suo genoma si è individuata la regione codificante la tossina ed il suo effetto tossico è stato testato accuratamente tramite saggio biologico su topi, tecnica ELISA e spettrometria di massa (Lago et al., 2015).

- Un fatto curioso è che i pesci palla sono certamente molto resistenti alla TTX e, pertanto, riescono ad accumularla senza risentire dei suoi effetti tossici. Tuttavia ciò non significa che non possano subirne gli effetti, dato che sono in grado di tollerare notevoli concentrazioni di TTX solo se accumulate in condizioni naturali, mentre in caso di somministrazione artificiale e in un breve lasso di tempo questi ne subirebbero gli effetti dannosi (Ueno e Sakamoto, 2004).

2.1.7 Tossicità e meccanismo d'azione

La TTX è una sostanza idrosolubile e, non essendo su base proteica, è un composto caratterizzato da termostabilità. Proprio questa caratteristica fa sì che la cottura di alimenti contaminati non possa essere considerata efficace per renderli edibili e sicuri per il consumatore.

La tossina agisce bloccando in modo selettivo i potenziali d'azione dei canali del Na⁺ a voltaggio dipendenti a livello del sistema nervoso periferico, delle cellule muscolari cardiache e scheletriche, senza però avere alcun tipo di influenza sui potenziali di riposo (Lago et al., 2015).

Se da una parte è risaputo come tutte le cellule siano in grado di cambiare la loro permeabilità ai vari ioni e di generare potenziali elettrici a livello delle membrane cellulari, esistono però anche le cosiddette cellule eccitabili, quali cellule nervose, cellule muscolari e cellule neuroendocrine, che generano una risposta attiva agli stimoli elettrici, chiamata Potenziale d'azione.

A scopo esplicativo prendiamo in considerazione una cellula nervosa che normalmente ha un potenziale di membrana di riposo pari a -70mV (Fig. 10). Il fatto che esista questo potenziale significa che la sua membrana è polarizzata anche in assenza di stimoli, con la zona citoplasmatica carica negativamente e quella esterna carica positivamente. Se il potenziale di membrana diventa più negativo si parla di iperpolarizzazione, se diventa invece più positivo si parla di depolarizzazione. Dopo che è avvenuta la depolarizzazione, tramite un processo chiamato ripolarizzazione, la membrana torna al suo stato di potenziale basale di riposo.

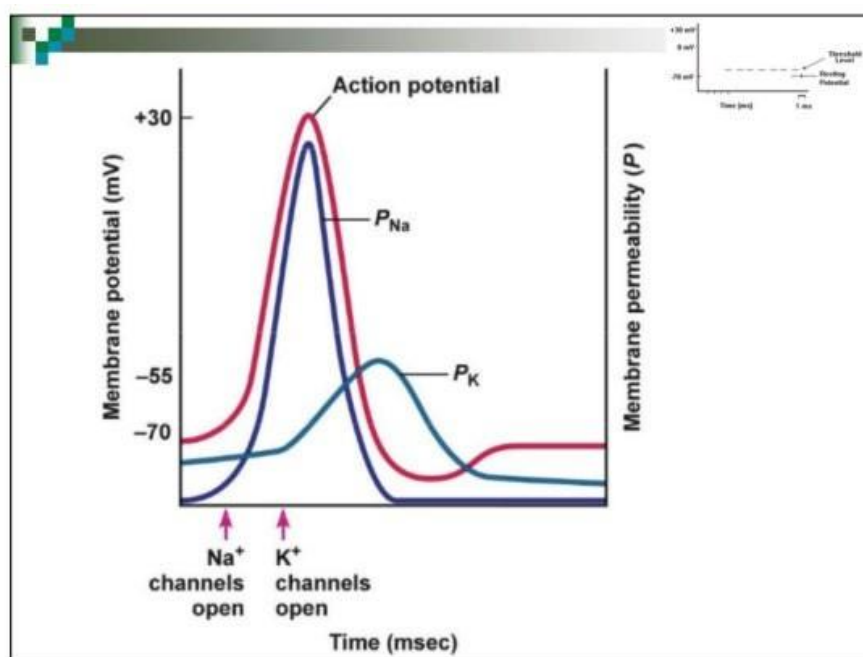


Fig. 10) Rappresentazione schematica del meccanismo alla base di un potenziale d'azione in una cellula nervosa. (Unisalento, 2018)

Nelle cellule eccitabili, se lo stimolo depolarizzante supera un certo valore soglia, si scatenerà una risposta attiva autorigenerativa del tipo “tutto o niente”, che procede spontaneamente senza arrestarsi finché non sia tornata alle sue condizioni iniziali. Con la dicitura “tutto o niente” si vuole richiamare il fatto che uno stimolo o non è sufficientemente intenso per scatenare il potenziale d'azione (stimolo sottosoglia) o ne provoca uno completo a prescindere da quanto intenso sia stato esso stesso.

Il potenziale d'azione prevede una depolarizzazione molto rapida che porta ad un'inversione di polarità di membrana, fino al raggiungimento di un apice corrispondente a +50mV. Il processo poi prosegue con, in ultima analisi, il ritorno della membrana ai valori di potenziale di riposo. Dopo che è avvenuta la fase di ripolarizzazione, si osserva per un certo tempo un'iperpolarizzazione transitoria, detta “postuma” che scompare in brevissimo tempo.

Il potenziale d'azione dipende da una modifica sequenziale del passaggio di ioni Na^+ e K^+ attraverso specifiche proteine canale di membrana voltaggio dipendenti. I canali del Na^+ sono responsabili della depolarizzazione veloce, mentre quelli del K^+ della fase di ripolarizzazione (Unisalento, 2018).

Da un punto di vista strutturale i canali del Na^+ sono delle proteine di membrana costituite da una subunità alfa di grandi dimensioni, affiancata da due subunità beta minori. La subunità alfa comprende quattro domini, ciascuno dei quali contiene sei segmenti che attraversano la membrana.

I segmenti transmembrana sono collegati tramite brevi anse peptidiche intracellulari ed extracellulari ed anse intracellulari più grandi collegano a loro volta i domini. La subunità alfa è responsabile della sensibilità alla tensione e della selettività ionica e forma un poro centrale attraverso il quale gli ioni Na^+ fluiscono nella cellula. Le subunità beta modulano invece la cinetica del canale e svolgono un ruolo cardine nell'adesione cellulare, nella trasduzione del segnale e nell'espressione della membrana (Fig. 12). I canali del Na^+ sfruttano due cancelli per regolare il passaggio ionico, il cancello di attivazione e quello di inattivazione (Fig. 11) (Bucciarelli et al., 2021).

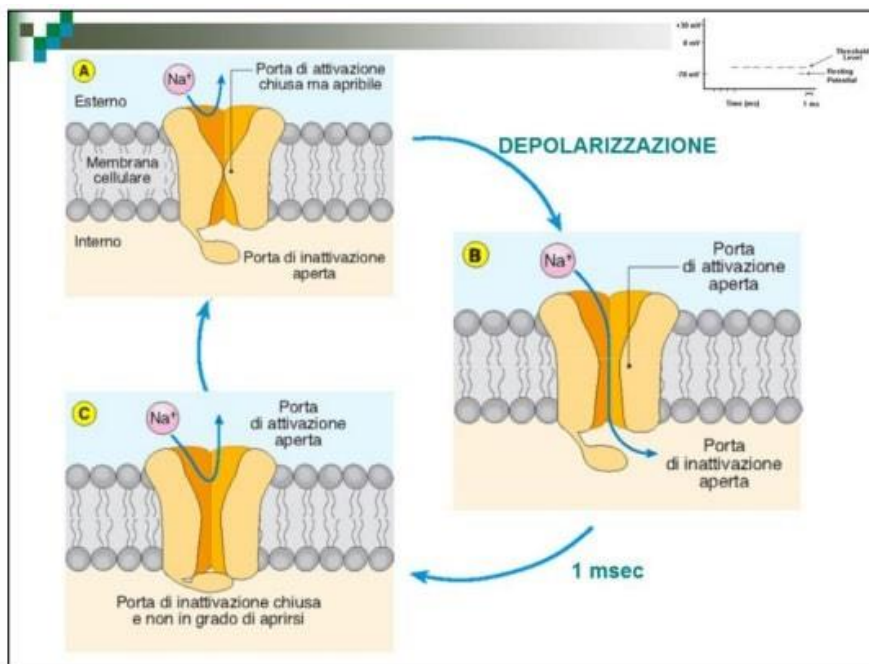


Fig. 11) Meccanismo di funzionamento dei canali del Na^+ voltaggio dipendenti, tramite il processo concertato di apertura e chiusura dei cancelli di attivazione ed inattivazione del canale stesso. (Unisalento, 2018)

Sapendo che la TTX agisce a livello di questi canali ionici, gli organismi accumulatori della stessa prevengono l'autotossicità attraverso due meccanismi:

1. Hanno sviluppato alcune mutazioni a carico dei canali del Na^+ che coinvolgono i pori e permettono di prevenire il legame della tossina, riducendo o eliminando completamente il suo effetto bloccante. Ad esempio, mutazioni a carico del gene che codifica per il Canale del Na^+ 1.4 ha comportato la sostituzione di una catena di amminoacidi aromatici con una non aromatica nell'anello dei pori del dominio I della proteina canale, riducendo in questo modo la capacità di legame della TTX nel pesce palla *Takifugu pardalis*. È stato verificato che tra i pesci palla, mutazioni di questo genere si sono verificate nel corso

dell'evoluzione circa quattro volte in modo indipendente, probabilmente perché solo un sottoinsieme di possibili mutazioni può conferire resistenza alla TTX pur consentendo un'adeguata funzione del canale.

Tali modifiche genomiche si sono verificate non solo negli animali portatori di TTX, ma anche nei soggetti che consumano prede tetrodotossiche.

2. Un secondo meccanismo si basa sulla produzione di proteine leganti la TTX da parte dei soggetti che accumulano la tossina. Tra i pesci palla che sfruttano questo meccanismo ricordiamo *Takifugu niphobles* e *Takifugu pardalis* (Venkatesh et al., 2005).

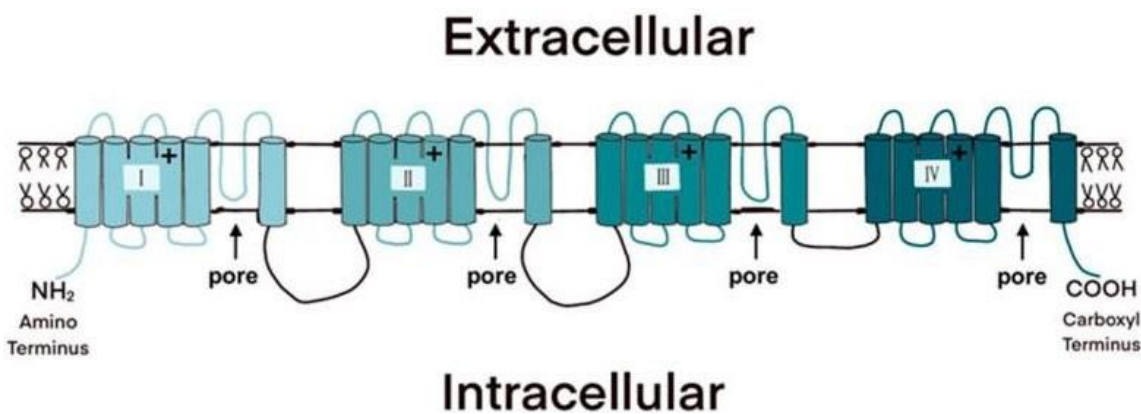


Fig. 12) Rappresentazione strutturale dei Canali del Na^+ a dipendenza di voltaggio (Na_v). Si osservano i 4 domini, costituiti ciascuno da 6 segmenti che attraversano la membrana cellulare. Gli anelli presenti tra il quinto e il sesto segmento transmembrana in ciascun dominio sono i responsabili della selettività ionica e ad essi si lega TTX. (Bucciarelli et al., 2021)

2.1.8 Fasi del potenziale d'azione

Allo stato di riposo, il cui valore di potenziale (-70mV) è dovuto alla permeabilità al K^+ permessa da pochi canali del K^+ rimasti aperti, il cancello di attivazione del canale del Na^+ è chiuso, mentre quello di inattivazione è aperto. In questa condizione gli ioni Na^+ non sono in grado di attraversare la membrana (Fig. 13).

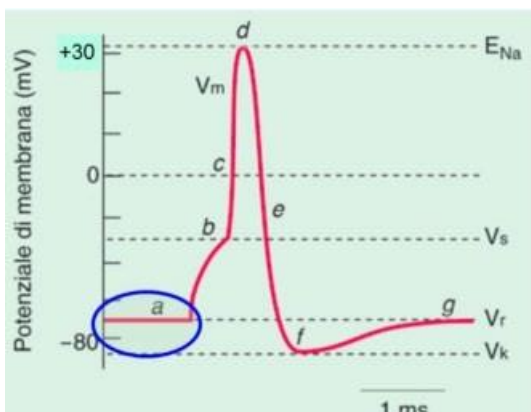


Fig.13) Fase 1 potenziale d'azione (Unisalento, 2018).

Nel momento in cui giunge uno stimolo depolarizzante la porta di attivazione dei canali del Na^+ si apre e permette il veloce passaggio dello ione all'interno della cellula spinto da un potenziale elettrochimico e superando contestualmente la quantità di K^+ in uscita (Fig. 14).

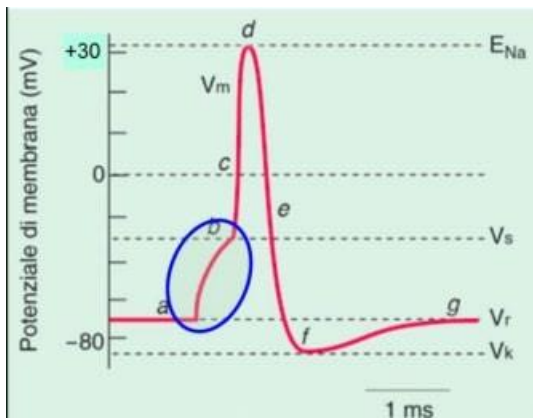


Fig. 14) Fase 2 potenziale d'azione (Unisalento, 2018)

L'interno della cellula diventa sempre più depolarizzato e tramite un processo a retroazione positiva, sempre più canali del Na^+ si aprono con la prosecuzione della fase di depolarizzazione. Nel momento in cui si raggiungono gli 0mV di potenziale di membrana la conduttanza del Na^+ è massima (Fig. 15).

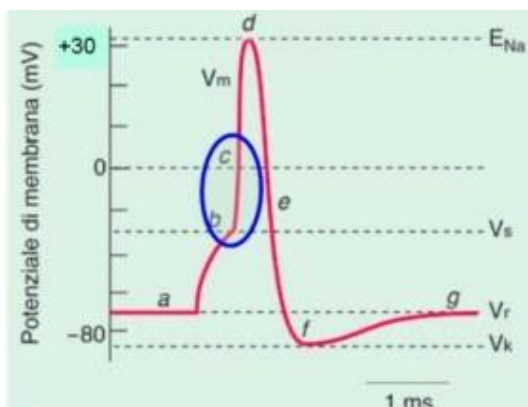


Fig.15) Fase 3 potenziale d'azione (Unisalento, 2018).

Anche il cancello di inattivazione risponde alla depolarizzazione chiudendosi, ma lo fa in modo più lento di quanto non faccia il cancello di attivazione, permettendo dunque quanto detto finora. Nel momento in cui il cancello di inattivazione si chiude, il Na^+ smette di entrare ed il potenziale d'azione ha raggiunto il picco (Fig. 16).

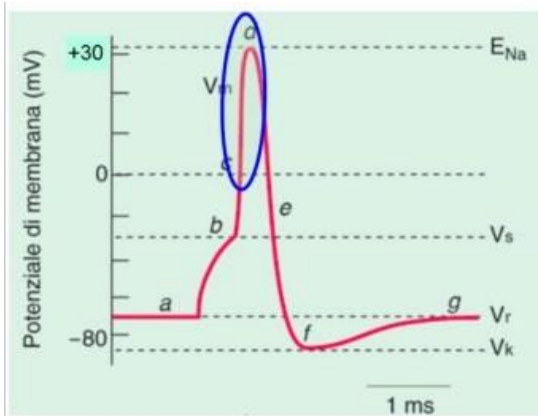


Fig. 16) Fase 4 potenziale d'azione (Unisalento, 2018).

Contestualmente anche i canali del K^+ iniziano ad aprirsi e questo, insieme all'inattivazione dei canali del Na^+ , permette la discesa del potenziale d'azione per la fuoriuscita del K^+ dalla cellula. In questa fase la conduttanza al K^+ è massima (Fig. 17).

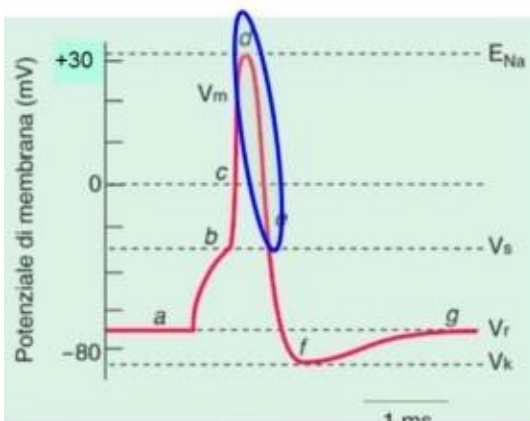


Fig. 17) Fase 5 potenziale d'azione (Unisalento, 2018).

A questo punto il potenziale ha raggiunto il valore di equilibrio del K^+ . Questa fase di iperpolarizzazione postuma è detta “undershoot” (Fig. 18).

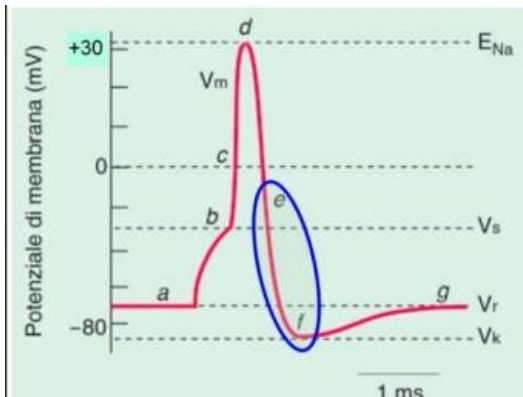


Fig. 18) Fase 6 potenziale d'azione (Unisalento, 2018).

I canali del K^+ cominciano a chiudersi e solo una minima frazione rimane aperta per mantenere il potenziale di riposo. I canali Na^+ iniziano il processo di recupero che consiste nel modificare il loro stato da “inattivo” a “chiuso”, che potrà permettere l’insorgenza di un nuovo eventuale potenziale d’azione. La velocità con cui avviene la fase di recupero determina la durata del periodo refrattario in cui anche qualora ci fossero stimoli che, in teoria, sarebbero sufficienti a scatenare un potenziale d’azione in questo momento non possono farlo proprio per l’inattività dei canali del Na^+ (Fig. 19).

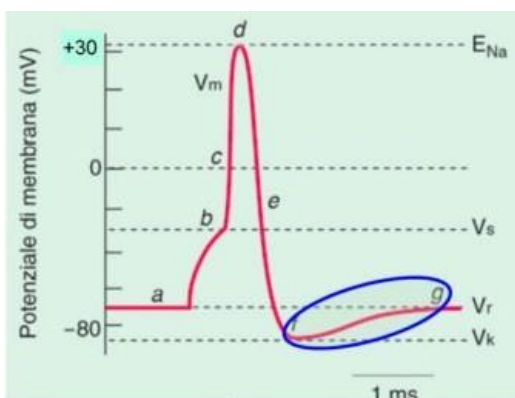


Fig. 19) Fase 7 potenziale d'azione (Unisalento, 2018).

Il neurone è tornato a questo punto alle sue condizioni iniziali di riposo e il potenziale d'azione è terminato. La pompa Na^+/K^+ ATP-dipendente permette il ripristino delle concentrazioni di Na^+ e K^+ originali portando al di fuori della cellula il primo ione che era entrato e rimpiazzando il secondo ione che era uscito (Fig. 20) (Unisalento, 2018).

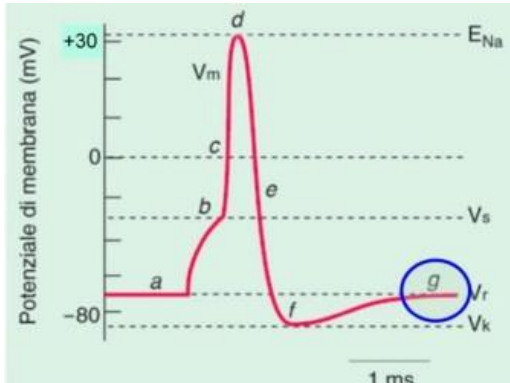


Fig. 20) Fase 8 potenziale d'azione (Unisalento, 2018).

Vista l'importanza cruciale rivestita dai canali del Na^+ voltaggio dipendenti (Na_v) nel regolare il potenziale di riposo e l'eccitabilità neuronale, che sono alla base della generazione e della propagazione dei potenziali d'azione, diversi studi si sono concentrati su di essi per comprendere meglio il ruolo della TTX capace di bloccarli. Tutto questo avviene grazie alla sua alta affinità per tali proteine canale, collocandosi all'interno del poro da esse formato (Fig. 21).

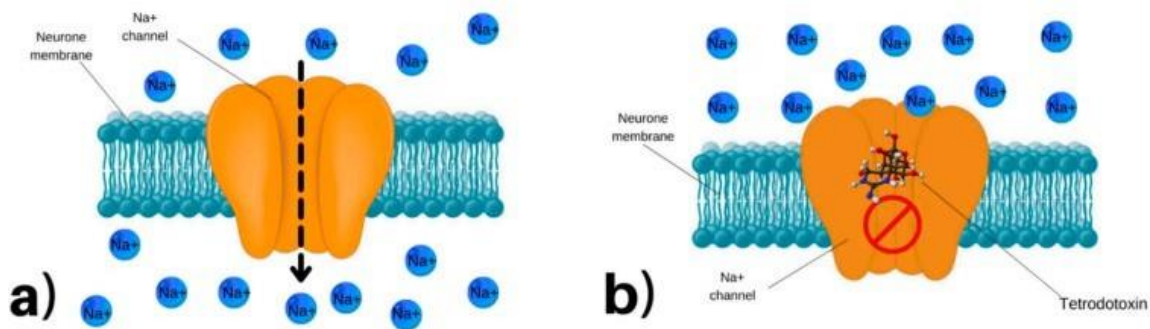


Fig. 21) Meccanismo d'azione della TTX che blocca i canali del sodio voltaggio dipendenti (Na_v) posizionandosi all'interno del poro del canale. (a) Condizione normale in cui è concesso il passaggio ionico. (b) Canale bloccato per la presenza della TTX. (Katikou et al., 2022)

I diversi tessuti, in differenti animali, hanno una variabile resistenza alla TTX. Questo può essere riconducibile all'esistenza di almeno 9 isoforme dei canali del Na^+ , come risulta nel tessuto nervoso dei mammiferi.

Tra queste nove, tre, localizzate nel sistema nervoso, nel tessuto muscolare scheletrico e cardiaco, hanno dimostrato un'evidente resistenza alla TTX, valutata tramite il calcolo della concentrazione inibente 50 (IC₅₀), ossia la dose di inibitore enzimatico necessario a bloccare il 50% del bersaglio preso in esame.

- Nav 1.5 > IC₅₀ = 5,7 µM
- Nav 1.8 > IC₅₀ = 60 µM
- Nav 1.9 > IC₅₀ = 40 µM

Le altre isoforme, prevalentemente localizzate nel tessuto muscolare scheletrico e nel sistema nervoso, si sono dimostrate più o meno sensibili.

- Nav1.1 > IC₅₀ = 6 nM
- Nav1.2 > IC₅₀ = 18 nM
- Nav1.3 > IC₅₀ = 4 nM
- Nav1.4 > IC₅₀ = 25 nM
- Nav1.6 > IC₅₀ = 6 nM
- Nav1.7 > IC₅₀ = 40 nM

La prima conseguenza della capacità da parte della tossina di bloccare i canali del Na⁺ voltaggio dipendenti, è quella di determinare un blocco del tronco encefalico, della percezione somato sensoriale e del sistema nervoso autonomo.

I canali del Na⁺ non sono però coinvolti solo nelle attività elettrofisiologiche dei neuroni, ma sono anche responsabili del manifestarsi di patologie neurologiche, per cui il loro blocco potrebbe rappresentare una soluzione a queste patologie (Shen et al., 2017)

Sfruttati diversi modelli animali, in particolari murini e lagomorfi, per avere conferma della tossicità e del meccanismo d'azione della TTX (Tabella 4).

- Nei topi, i maschi sono risultati più sensibili e la dose letale media (DL₅₀) risultata pari a 10.7 - 12.5 - 532 µg/kg, rispettivamente per la somministrazione intraperitoneale (i.p.), sottocutanea (s.c.) e intragastrica (i.g.) della tossina. Da questo si può evincere come la somministrazione per via orale (i.g.) si sia dimostrata ben 50 volte meno efficace rispetto alla somministrazione i.p.

In aggiunta nei ratti è stata contestualmente studiata la farmacocinetica e i parametri di tossicità della TTX dopo la sua somministrazione orale tramite pellet.

La DL₅₀ è risultata pari a circa 530 µg/kg, mentre la concentrazione massima nel plasma (C_{max}) è stata raggiunta dopo 2 ore, con un tempo di dimezzamento (t_{1/2}) di 3.23 ±1.74h dopo la somministrazione intragastrica di 100 µg/kg.

- Nei conigli la dose letale minima (MDL) è risultata pari a 5.3 e 3.1 µg/kg, mentre la dose letale 50 (DL₅₀) è risultata pari a 5.8 o 3.8 µg/kg, rispettivamente per la somministrazione intramuscolare (i.m.) o intravenosa (i.v.).

Da questi studi si è compreso come la tossicità della TTX dipenda anche dalla specie presa in esame, sebbene essa si sia dimostrata molto tossica in generale in tutti i mammiferi (Katikou et al., 2022).

Species	Route	Minimum LD	Median LD ₅₀	LD ₁₀₀	NOAEL
Human			2 mg (estimation for 50kg BW)		13.33 µg/kg
Rats	oral	10 µg/kg	517.43 µg/kg		
Rabbit	im	5.3 µg/kg		5.8 µg/kg	
	iv	3.1 µg/kg		3.8 µg/kg	
Mice	oral		232 µg/kg		75 µg/kg
	ip		10.7 µg/kg		
	sc		12.5 µg/kg		
	ig		532 µg/kg		
	ip	40 µg/kg (for 4-CysTTX) and 860 µg/kg (for 4-GSTTX)			
	ip		71 µg/kg (for 11-deoxyTTX)		
	ip		10 µg/kg		
	sc		16 µg/kg		
	oral		332 µg/kg		
	oral		619-700 mg/kg		1200 µg/kg
	ip		10.7 µg/kg		
	sc		12.5 µg/kg		
	ig		532 µg/kg		

Tabella 4) Parametri di tossicità di TTX rispettivamente tramite somministrazione orale (oral), intraperitoneale (ip), sottocutanea (sc), intragastrica (ig) e intravenosa (iv) in animali da laboratorio (ratti, conigli e topi) (Katikou et al., 2022)

2.1.9 Sintomi e segni clinici in corso di intossicazione da TTX

La TTX diffonde rapidamente attraverso quello che è il sistema circolatorio, può infiltrare il liquido cerebrospinale e viene escreta con le urine. Attraverso gli studi fatti e i dati ottenuti in corso di intossicazioni umane da TTX, sono stati catalogati i principali sintomi e segni clinici manifestatisi e si fa ancora riferimento ad una classificazione, comprendente quattro gradi crescenti di gravità, redatta da Fukuda e Tani nel 1941. È risultato evidente che la loro rapidità di insorgenza e severità di sintomi fossero fortemente sia dose- dipendenti, cioè relative al quantitativo di tossina ingerita, sia tempo-dipendenti, cioè legate al periodo di tempo trascorso dalla sua ingestione, nonché correlate anche allo stato di salute dell'individuo coinvolto (Katikou et al., 2022).

Grado	Sintomi	Insorgenza
1	<ul style="list-style-type: none"> • Sintomi neuromuscolari lievi (parestesia della bocca, mal di testa, diaforesi, midriasi) • Moderati sintomi gastrointestinali (nausea, scialorrea, iperemesi, ematemesi, ipermotilità intestinale, diarrea, dolore addominale) • Malessere e debolezza generale 	Da 5-45 minuti fino a diverse ore
2	<ul style="list-style-type: none"> • Sintomi neuromuscolari moderati (parestesia estesa al tronco e alle estremità, incoordinazione e difficoltà di deambulazione) • Sintomi gastrointestinali moderati 	Da 10-60 minuti fino a diverse ore
3	<ul style="list-style-type: none"> • Sintomi neuromuscolari severi (disartria, disfagia, afagia, letargia, incoordinazione severa, atassia, paralisi dei nervi cranici, fascicolazioni muscolari, afonia) • Sintomi cardiovascolari (ipotensione o ipertensione, blocco vasomotore, aritmia cardiaca compreso bradicardia sinusale, asistole, tachicardia e alterazioni della conduzione del nodo atrioventricolare, cianosi, pallore e dispnea) • Sintomi dermatologici (dermatite esfoliativa, petecchie, vesciche) 	Da 15 minuti a diverse ore
4	<ul style="list-style-type: none"> • Incoscienza, paralisi respiratoria, severa ipotensione e aritmia cardiaca • Collasso cardiovascolare, insufficienza respiratoria e morte. 	Da 15 minuti a diverse ore (Entro 17 minuti può sopraggiungere l'esito fatale)

In caso di intossicazione lieve, dopo l'ingestione della tossina, i primi sintomi cominciano generalmente a manifestarsi entro breve tempo, circa 5-45 minuti, questo a causa del suo rapido assorbimento attraverso il tratto gastroenterico. Non è però inusuale un ritardo fino a 3 ore o più.

In casi di media gravità i sintomi si manifestano tra i 30 minuti e le 6 ore dopo l'ingestione, con recupero totale delle condizioni di salute, senza sequele di alcun genere, dopo 24 ore.

In casi di intossicazione grave i sintomi si manifestano entro 2-15 minuti coinvolgendo dapprima il l'apparato gastrointestinale e successivamente l'apparato neuromuscolare in modo molto severo.

Studi su più modelli animali (specialmente murini) hanno dimostrato quanto la TTX induca modificazioni macroscopicamente evidenti a carico dello stomaco, con effetti ultrastrutturali anche a carico della milza e del piccolo e grande intestino. Questo spiegherebbe i sintomi g.e. come

nausea, vomito, iperemesi, dolore addominale, alterazione della motilità gastrointestinale, ematemesi e diarrea.

Se la dose assunta è elevata è possibile che la morte sopraggiunga molto rapidamente, anche entro 17 minuti dall'ingestione per insufficienza respiratoria e collasso cardiovascolare. Più raramente il decesso è invece legato ad una severa ipotensione o all'insorgenza di complicazioni come insufficienza cardiaca congestizia, in particolare in soggetti che già in precedenza soffrivano di ipertensione, o per polmonite ab ingestis dovuta all'inalazione di materiale alimentare emesso durante l'evento emetico.

Il più caratteristico dei sintomi è sicuramente l'insufficienza respiratoria. Medie o severe intossicazioni comportano lo sviluppo di cianosi, apnea, areflessia (mancanza del seppur minimo riflesso), ipotensione e blocco atrio-ventricolare di II o III grado.

I sintomi cardiovascolari comprendono comunemente ipotensione, bradicardia, depressione della conduzione del nodo atrio-ventricolare, altre aritmie e asistole ventricolare nei casi di intossicazione severa.

L'ipotensione è spesso associata alla bradicardia, che nonostante non ne sia la causa principale, certamente contribuisce a ridurre la pressione sanguigna. L'ipotensione indotta da TTX è infatti dovuta prevalentemente ad una riduzione del tono vascolare, piuttosto che ad un coinvolgimento del cuore o del centro vasomotore.

Al contrario, se da una parte nelle intossicazioni gravi si riscontra spesso ipotensione, è anche vero che in condizioni non letali, non è infrequente evidenziare ipertensione. Sembra che questa sia dovuta ad una risposta esagerata del simpatico alla stimolazione del sistema nervoso autonomo. I casi registrati e contestualmente studiati di intossicazione da TTX negli esseri umani sono stati però molto limitati, come pure il monitoraggio dei parametri ematologici e biochimici dei pazienti, cosa che rende difficoltoso fare una classificazione sistematica e attendibile da poter poi sfruttare per la gestione dei casi che potrebbero presentarsi (Katikou et al., 2022).

2.1.10 Descrizione di un focolaio verificatosi in Bangladesh

L'origine del focolaio: tra i pochi casi a cui è possibile fare riferimento, si cita uno studio di tre grandi focolai di intossicazione da TTX avvenuti in Bangladesh rispettivamente il 9 aprile, il 3 giugno e l'8 giugno 2008 e in cui sono stati coinvolti 141 pazienti (82 maschi e 59 femmine) con età comprese tra 4 e 50 anni.

Tutti i soggetti coinvolti avevano riportato in anamnesi il consumo di pesce palla acquistato in tre diversi mercati locali a Belabo, Narsingdi e Kuliarchar, oppure, a causa delle ristrettezze economiche, per averne consumato i resti trovati presso centri di raccolta rifiuti.

La gente locale era ben informata e a conoscenza dei rischi che poteva comportare il consumo di pesce palla: tuttavia, essendo esposti presso punti vendita, avevano pensato che non vi fosse pericolo di intossicazione, oppure non erano stati in grado di riconoscere la tipologia di pesce. Dal momento che non vi erano dei laboratori attrezzati per le indagini tossicologiche presso le cliniche dove erano stati ricoverati tali soggetti, la supposizione che si trattasse effettivamente di intossicazione da pesce palla venne desunta in base all'anamnesi, ai primi sintomi manifestati, quali parestesia periorale e paralisi muscolare, e all'assenza di sintomi nei familiari che non avevano consumato il pasto incriminato.

Le analisi: La quantità di pesce ingerita era stata stimata sulla base della dichiarazione di ciascun paziente e anche in riferimento all'usanza locale di dividere 1kg di pesce in 20 porzioni circa prima del suo consumo. Grazie a ciò si era stabilito che la dose consumata da ciascuno si aggirava tra poco meno 50 g a più di 200 g: tutte le persone che erano andate incontro a morte prima che si potesse effettuare alcun tipo di trattamento di supporto ne avevano consumato più di 100g.

Non era stato possibile risalire nello specifico a quali parti dei pesci erano state consumate, ma 12 dei 38 soggetti coinvolti in analisi più approfondite, avevano rimosso la pelle e si erano cibati solamente delle porzioni muscolari della testa, del corpo e della coda.

Dal momento che i pesci in questione sparirono molto rapidamente dai mercati dopo l'insorgere dei focolai, non era stato possibile rintracciare dei campioni da analizzare. Tuttavia attraverso prove fotografiche, si era supposto che le specie coinvolte fossero il pesce palla oblungo (*Takifugu oblongus*) e il pesce palla stellato (*Arothron stellatus*).

Da 38 pazienti ospedalizzati erano stati raccolti campioni per le analisi tossicologiche. In principio i pazienti non erano stati selezionati in base alle loro caratteristiche specifiche, ma in seguito avendo sviluppato un'ampia gamma di sintomi, da molto lievi a letali, si erano rivelati efficacemente rappresentativi della sindrome clinica complessiva osservata nei 141 soggetti interessati.

Campioni di sangue citrato e urina, miscelati con 0,5 ml di acido acetico all'1% per stabilizzare la TTX prima del loro trasferimento ai laboratori tossicologici, sono stati analizzati mediante un test immunoenzimatico specifico (ELISA) secondo il metodo di Ngy et al. (2008) e utilizzando un anticorpo monoclonale anti-TTX sviluppato da Kawatsu et al. (1997).

A seguito delle analisi dei 38 campioni di sangue e 37 di urina (Fig. 22), 27 presentavano concentrazioni di TTX da medie ad elevate sia nel sangue che nelle urine, ma in 11 campioni il livello di TTX nel sangue era inferiore alla soglia di rilevabilità (<1,6 ng/ml), mentre nelle urine la concentrazione era compresa tra 0,4 e 24,8 ng/ml (valore medio 5,4 ng/ml).

Questi risultati erano coerenti con precedenti segnalazioni di casi isolati di avvelenamento da TTX, suggerendo che vi fosse una rapida eliminazione della tossina dal circolo ematico e sua escrezione tramite le urine.

In generale, i livelli di TTX nelle urine variavano da 0,4 a 75,4 ng/ml.

Vi è stata evidenza di una forte correlazione tra il livello di TTX nel sangue, lo sviluppo di paralisi e l'arresto respiratorio: cinque pazienti deceduti entro 15-30 minuti ed altri due, morti circa 4 ore dopo al ricovero, presentavano concentrazioni di TTX nel sangue >9 ng/ml (Fig. 22).

Solo tre pazienti, con concentrazioni di TTX comprese tra 9,3 e 10,0 ng/ml, erano sopravvissuti. Tutti i decessi si sono verificati in pazienti di sesso femminile di età compresa tra 14 e 50 anni.

I sintomi: in accordo con quanto previsto dalla letteratura, i primi sintomi, inclusa la parestesia delle labbra e della lingua, si erano verificati da meno di 30 minuti fino a diverse ore dopo l'ingestione del pesce ed erano stati seguiti da parestesie e intorpidimento facciale e degli arti. Ugualmente si erano verificati precocemente sintomi gastroenterici quali scialorrea, nausea, vomito e diarrea associata a dolore addominale, così come debolezza motoria e difficoltà nel parlare. Poiché le manifestazioni cliniche iniziali erano molto simili tra tutti i pazienti, era risultato difficile prevedere chi avrebbe manifestato un peggioramento grave dei sintomi, come la comparsa di paralisi respiratoria. Se l'anamnesi avesse indicato un consumo quantitativamente elevato di pesce palla, si sarebbe potuto prevedere un aggravarsi della sintomatologia clinica. Sintomi quali, visione offuscata e difficoltà respiratoria erano da considerarsi predittori clinici di insufficienza respiratoria, con conseguente necessità di ventilazione assistita e gestione delle vie aeree. L'intervallo di tempo tra l'ingestione del pesce e l'insorgenza dei sintomi era compreso tra 30 minuti e più di 2 ore. Per la maggior parte dei casi (circa il 66%) lo sviluppo era avvenuto entro 30 minuti, mentre solo il 2% li aveva mostrati dopo 2 ore.

In tutti i casi di avvelenamento il sintomo più comune era stato la parestesia periorale, seguito da formicolio su tutto il corpo, nausea, vomito, mal di testa, vertigini e dolore addominale. Debolezza e intorpidimento degli arti era stato notato in 46/141 pazienti (32,62%), di cui 22 avevano sviluppato difficoltà respiratorie gravi, seguito da arresto respiratorio.

Il trattamento: Il trattamento dei pazienti non aveva previsto interventi rapidi, quali ad esempio la lavanda gastrica, proprio per il ritardo nell'ospedalizzazione dei soggetti.

Test di routine, come il dosaggio dell'alanina transaminasi, della creatinina e degli elettroliti e l'elettrocardiografia, erano stati eseguiti nella maggior parte dei casi, ma non in tutti, a causa del grande numero di persone coinvolte. Da queste indagini non era comunque emerso nulla di significativo, indipendentemente dalla gravità dell'intossicazione. Tutti i pazienti erano stati messi sotto rigoroso controllo clinico ed erano stati trattati in modo sintomatico, tramite fluidoterapia.

Le limitate risorse delle strutture sanitarie non avevano reso possibile la ventilazione artificiale, cosa che costò la vita entro 15-25 minuti dall'arrivo in clinica a cinque pazienti che erano stati ricoverati in uno stato critico, incoscienti e con gravi segni di difficoltà respiratoria. In otto pazienti i sintomi di paralisi muscolare erano stati gestiti con una singola dose di neostigmina (50 g/kg s.c.), seguita da atropina (15 g/kg s.c.); due persone sono tuttavia decedute 3 ore e 30 minuti dopo il ricovero.

Altre sette persone avevano ricevuto una singola dose di neostigmina/atropina, ma tre di queste sono decedute.

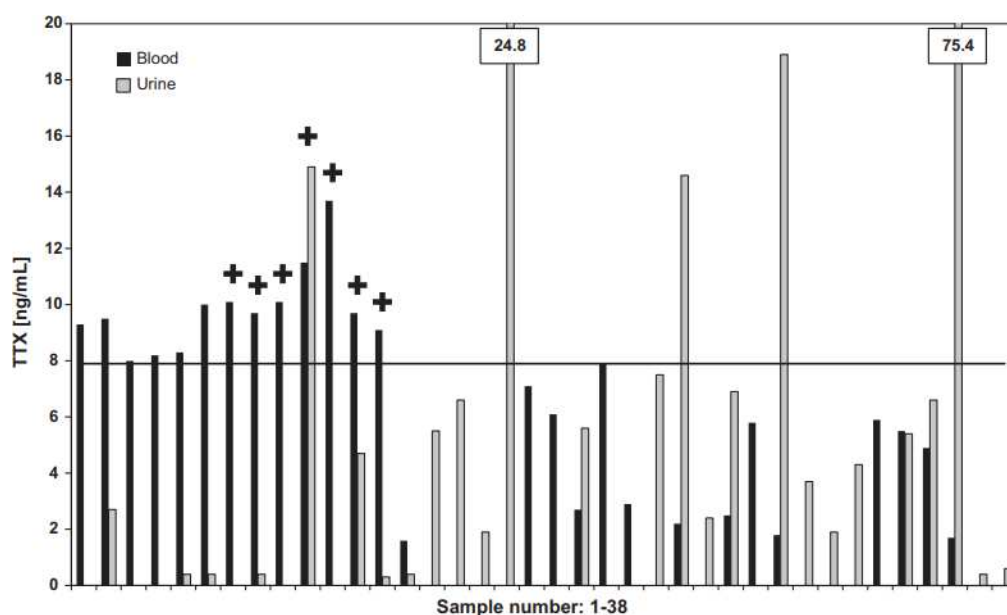


Fig.22) Livello ematico (barra nera) e urinario (barra grigia) di TTX analizzati tramite tecnica ELISA, utilizzando un anticorpo TTX specifico in 38 pazienti del focolaio di intossicazione avvenuto in Bangladesh. Le croci sopra alle barre indicano casi fatali. La presenza di TTX nelle urine era rilevabile anche quando i campioni ematici risultavano negativi. (Islam et al., 2010).

Alla chiusura dei focolai, il tasso di mortalità ha raggiunto 12,1% (17/141). Le persone sopravvissute hanno mostrato un recupero completo senza alcun deficit residuo.

Conclusioni: lo studio di Islam et al. (2011) ha suggerito che concentrazioni di TTX superiori a 9 ng/ml a livello ematico erano correlate con maggiore probabilità ad un esito fatale, causato da arresto respiratorio.

L'uso di farmaci anticolinesterasici come la neostigmina ha dato risultati contrastanti, con risposte talvolta positive, talvolta nulle. Questo era comunque prevedibile poiché la TTX non agisce a livello della placca neuromuscolare del motoneurone, ma a livello dei canali del Na⁺ delle membrane cellulari, rendendo piuttosto improbabile un'azione inibitoria da parte degli anticolinesterasici sulla sua azione bloccante (Islam et al., 2010)

2.1.11 Altri di focolai di intossicazioni da TTX

Altre indagini hanno riportato i dati ematologici e biochimici di pazienti coinvolti in focolai di intossicazione da TTX avvenuti in Bangladesh (11 casi) e in Israele (13 casi). I parametri erano prevalentemente nella norma, eccezion fatta per un caso di ipokaliemia e due casi con, rispettivamente, ipercapnia e aumento della creatinina fosfochinasi (CPK).

Gli esami elettrocardiografici e di radiografia toracica effettuati durante i ricoveri erano risultati nella norma, allo stesso modo la tomografia computerizzata al cranio (CT) eseguita in un paio di casi particolarmente gravi.

Uno studio eseguito a Taiwan su un focolaio comprendente 17 casi di intossicazione, ha messo in luce anomalie nella funzionalità epatica in un paziente su cinque sottoposti ad indagine.

Il coinvolgimento a livello cerebrale spesso comporta areflessia, midriasi e altri sintomi neurologici. Durante il trattamento di primo soccorso è fondamentale non abbandonare prematuramente le pratiche di rianimazione cardiopolmonare, sebbene il paziente possa non rispondere in modo positivo in un primo momento. Se il paziente sopravvive per oltre 24 ore dall'inizio della sintomatologia, la prognosi può essere fausta, in gran parte grazie alle terapie di supporto effettuate con lo scopo di evitare in primo luogo l'arresto cardiopolmonare (Katikou et al., 2022).

2.1.12 Approccio terapeutico per la gestione dei casi di intossicazione da TTX

Oggigiorno non è ancora disponibile un antidoto efficace per contrastare gli effetti della TTX ed il recupero da parte del paziente è strettamente legato alla dose ingerita, a quanto precoce sia stata la diagnosi e all'efficacia della terapia di supporto funzionale, in attesa che la TTX venga eliminata con le urine, garantendo così la risoluzione dell'intossicazione.

È risultato più volte evidente che la terapia di supporto abbia giocato un ruolo fondamentale e che abbia dimostrato grande efficacia nel prevenire l'esito fatale dell'intossicazione da TTX. Essa comprende prevalentemente induzione dell'emesis, il lavaggio gastrico, la fluidoterapia e la ventilazione meccanica.

- L'emesis, qualora non sia già avvenuta in modo spontaneo, viene usualmente indotta farmacologicamente tramite la somministrazione di apomorfina, al fine di ridurre il più possibile il tempo di esposizione della mucosa gastrica alla tossina e prevenirne un ulteriore assorbimento.

Allo stesso scopo viene spesso eseguita anche una lavanda gastrica con soluzione al 2% di bicarbonato di Na. Questa poi viene seguita dalla somministrazione per os di carbone attivo essendo stato osservato che la tossina risulta meno stabile in mezzo alcalino.

Tuttavia la procedura di riduzione dell'assorbimento, perché possa considerarsi efficace, deve essere eseguita non oltre 60 minuti dall'ingestione della TTX. In caso contrario l'assimilazione già avvenuta sarebbe quasi completa e renderebbe inutile nella pratica questo trattamento.

- Come detto in precedenza, l'insufficienza respiratoria è una delle principali cause che portano alla morte il paziente. Per tale ragione il supporto respiratorio tramite ossigenoterapia, fino anche all'intubazione endotracheale ed alla ventilazione assistita, consente di sostenere la funzionalità respiratoria in attesa del completo ristabilimento del paziente.

Grazie a queste tecniche di supporto, uno studio ha evidenziato che in Thailandia, su 245 individui intossicati, 239 (97,5%) si sono ristabiliti senza conseguenze, 1 (0,4%) ha riportato danni cerebrali gravi e 5 (2%) sono deceduti.

- La fluidoterapia ha come scopo quello di favorire l'escrezione urinaria della tossina e di contrastare l'ipotensione che spesso viene rilevata nei pazienti intossicati. Quest'ultima viene comunque trattata anche farmacologicamente. Una sperimentazione eseguita su animali da laboratorio ha mostrato che amfetamina, fenilefrina e norepinefrina sono i principi farmacologici più efficaci per gestire l'ipotensione in corso di intossicazione da TTX grazie al loro effetto adrenergico diretto e indiretto. Recentemente si è utilizzata anche la dopamina come agente inotropo positivo.
- È stato proposto l'uso di anticolinesterasici come la neostigmina o l'edrofonio per ridurre la parestesia e l'intorpidimento percepito dai pazienti, sulla base del fatto che la TTX agisce inibendo la motilità muscolare. L'approccio terapeutico si baserebbe sull'aumento dei livelli di acetilcolina a livello della giunzione neuromuscolare. Tuttavia, non tutti i ricercatori si sono trovati concordi sul supportare l'uso di questi farmaci, dal momento che la TTX non agisce a livello della giunzione neuromuscolare se non a concentrazioni molto elevate, rendendo così gli inibitori delle colinesterasi poco efficaci (Katikou et al., 2022).
- Anche se in letteratura non vi sono molte prove a supporto, l'emodialisi potrebbe essere efficace per gestire i casi di intossicazione da TTX nei soggetti con insufficienza renale, i quali hanno una ridotta o nulla capacità di eliminare la tossina attraverso la minzione, dal momento che spesso la loro funzione renale residua è praticamente assente (Lago et al., 2015).

Descrizione di intossicazioni da TTX e relativo approccio terapeutico

A questo proposito si riporta uno dei pochi casi documentati, come indicato nel 1999 da Lan e dai suoi collaboratori del "Department of Neurology, Kaohsiung Medical College,

Kaohsiung City, Taiwan” e Deng-Fwu Hwang del “Department of Food Science, National Taiwan Ocean University, Keelung City, Taiwan” .

Origine del caso: la paziente era una donna di 52 anni con uremia ad eziologia sconosciuta, che da 3 anni stava ricevendo regolarmente un trattamento di emodialisi. Un giorno, 4 ore dopo aver consumato un pasto a base di una zuppa di pesce con il marito, un uomo di 55 anni in salute, aveva iniziato a manifestare sintomi quali mal di testa, sensazione di formicolio circumorale e linguale con conseguente difficoltà nella deglutizione e intorpidimento nelle parti distali di tutti e quattro gli arti. Mostrava anche evidente stordimento e instabilità motoria, associata ad una grave debolezza. A seguito di un progressivo peggioramento era stata condotta al pronto soccorso locale e trattata con ventilazione meccanica per la gestione della cianosi e del distress respiratorio che si era sviluppato.

Le condizioni della paziente avevano continuato a peggiorare fino al raggiungimento di uno stato semicomatoso privo di qualsiasi movimento volontario o riflesso degli occhi e degli arti sviluppatosi entro 30 minuti dall'intubazione.

Le analisi: dopo aver analizzato i resti del pasto incriminato, la presenza di TTX era stata dimostrata tramite esame cromatografico ed elettroforesi su cellulosa acetato. La tossicità rilevata nel muscolo del pesce era di 25 MU (mouse unit)/g (1MU = 0,2 µg TTX/g)

L'esame neurologico, non aveva evidenziato riflesso pupillare alla luce diretta e la manovra oculocefalica non aveva suscitato alcun movimento oculare. Tutti e quattro gli arti erano areflessivi e i segnali di Babinski erano assenti (se fossero stati presenti avrebbero indicato un danno a livello cortico-spinale). La tomografia assiale computerizzata cerebrale e le analisi di laboratorio sull'emogasanalisi arteriosa (sotto ventilazione assistita), il dosaggio gli elettroliti, la funzionalità epatica, la glicemia e l'analisi del liquido cerebrospinale non avevano mostrato alcuna anomalia.

L'esame della funzionalità renale aveva indicato un'insufficienza renale cronica con lieve azotemia (urea 70 mg/dl, creatinina 9,1 mg/dl).

Dopo 18 ore dalla comparsa dei primi sintomi era stato eseguito un elettroencefalogramma senza che vi fossero stati cambiamenti nella condizione neurologica. L'EEG aveva messo in evidenza un pattern con dominanti onde alfa posteriori e onde theta diffuse (condizione tipica della veglia ad occhi chiusi): a seguito dell'applicazione di stimoli dolorifici allo sterno, tali onde erano state temporaneamente sostituite con onde beta (tipiche di uno stato di veglia attiva). Questo suggeriva che la problematica neurologica dovesse avere un'origine periferica.

L'esecuzione dell'emodialisi: dopo 21 ore dall'insorgenza dei segni clinici la paziente era stata sottoposta ad emodialisi secondo il programma stabilito dall'uremia in corso. Con grande stupore, le condizioni della donna avevano mostrato un'evoluzione inaspettata in senso positivo, verificatasi entro 1 ora dall'esecuzione del trattamento.

La donna aveva iniziato ad aprire gli occhi ed era stata in grado di rispondere, tramite movimento delle palpebre, alle domande che le venivano rivolte. Il riflesso pupillare era presente e i movimenti oculari volontari erano ridotti solo in corso di sguardo laterale estremo. Il riflesso tendineo era rimasto assente, ma la potenza muscolare era di grado 3 e 4, rispettivamente nella parte prossimale e distale dei quattro arti.

Il giorno successivo all'emodialisi era stata tolta la ventilazione meccanica e le condizioni cliniche della paziente erano migliorate progressivamente a seguito di ciascun ciclo di emodialisi (Fig. 23). La forza muscolare era stata completamente recuperata dopo 16 giorni dalla dimissione.

Sapendo che la TTX agisce bloccando in modo reversibile i canali del Na⁺ a voltaggio dipendenti, diminuendo la corrente ionica del Na⁺ verso l'interno della membrana ed impedendo così la depolarizzazione della stessa, è facile comprendere come una preesistente condizione di uremia, in cui la conduttanza ionica attraverso i canali del Na⁺ è altrettanto compromessa, possa peggiorare sensibilmente le condizioni cliniche in un soggetto che si sia intossicato. In corso di neuropatia uremica sperimentale la permeabilità al sodio attraverso le membrane eccitatorie viene ridotta, in quanto si nota una bassa corrente di sodio entrante e ridotte ampiezze del potenziale d'azione. Rispetto al meccanismo d'azione della TTX, l'uremia cambia le proprietà di base del canale del sodio mediante una maggiore inattivazione e un meccanismo di attivazione compromesso.

L'eccitabilità dei nervi periferici viene pertanto ulteriormente depressa quando queste due condizioni si combinano, come nella paziente del caso descritto.

In questo caso la sinergia tra le due condizioni era risultata evidente, dal momento che il marito, pur avendo assunto all'incirca la stessa quantità di TTX, era rimasto asintomatico. La quantità ingerita è stata stimata di circa 200 µg (dato calcolato tramite punteggio di tossicità moltiplicato per il peso del pesce ingerito), ossia circa il 10% della dose letale per l'uomo, che è pari a 2000 µg/60 kg peso corporeo (il peso corporeo della paziente e del marito era rispettivamente di 54,5 e 62 kg).

Conclusioni:

Nonostante la quantità di tossina ingerita non fosse particolarmente elevata, tanto da non indurre sintomi nel soggetto sano, solo dopo l'esecuzione dell'emodialisi le condizioni

cliniche della donna erano migliorate rapidamente. Tutto ciò aveva fatto supporre che proprio questo trattamento avesse aiutato la paziente a superare l'intossicazione, grazie ad una più rapida eliminazione della tossina. Non si è infatti pensato ad un recupero spontaneo. Il sistema nervoso centrale è stato relativamente risparmiato, poiché l'EEG aveva mostrato una dominanza posteriore, ritmo alfa prontamente reattivo, e la paziente aveva mantenuto lo stato di coscienza anche quando i sintomi erano nello stato più critico. Le caratteristiche chimico-fisiche della TTX stessa sono a supporto di tale ipotesi dal momento che, avendo un basso peso molecolare, non tende a legarsi prontamente a proteine di trasporto ed è idrosolubile.

Nonostante la metodica tradizionale di gestione delle intossicazioni da TTX preveda induzione dell'emesi, lavanda gastrica e ventilazione assistita, l'esame di questo caso clinico vuole dimostrare le grandi potenzialità dell'emodialisi nei soggetti con alterata funzionalità renale (Lan et al., 1999).

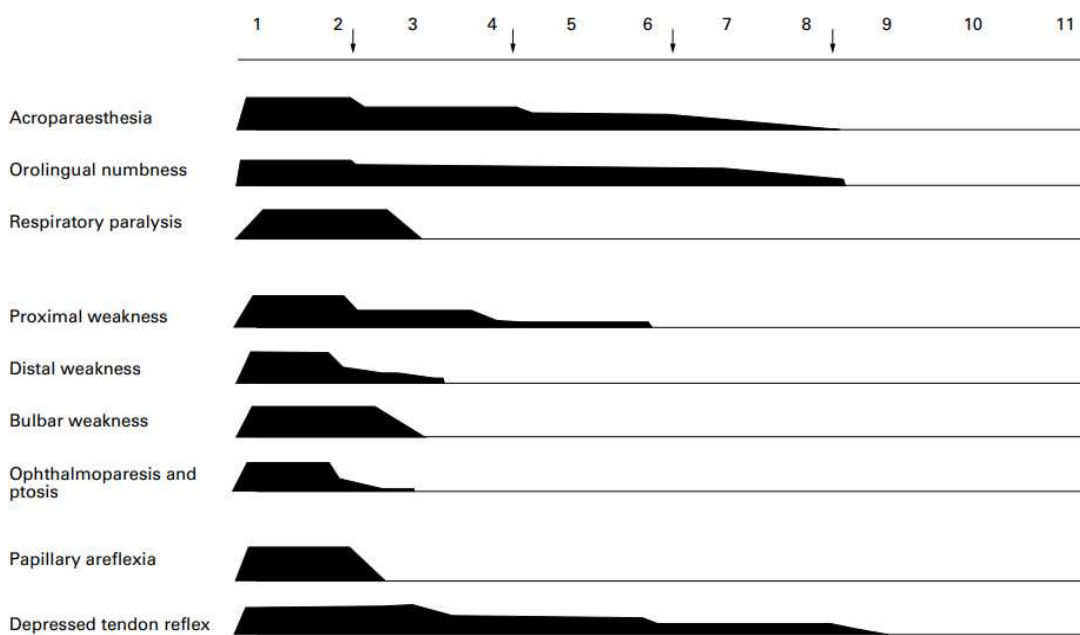


Fig. 23) Nel grafico si può osservare come si sono modificati i sintomi da avvelenamento da TTX della paziente ad ogni ciclo di emodialisi. L'asse verticale indica la severità del sintomo; i numeri sono i giorni trascorsi dopo la manifestazione dei sintomi; le frecce indicano il momento in cui è stata eseguita l'emodialisi. Si può notare come il trend di gravità della sintomatologia sia chiaramente decrescente con il passare del tempo e con il numero di emodialisi effettuate (Lan et al., 1999).

Altri due casi segnalati ad Oman, avevano previsto una gestione dei pazienti tramite emodialisi, applicata dopo 12 ore dall'intossicazione con successivo miglioramento delle condizioni dei pazienti. Nel medesimo report era stato però indicato che per dimostrarne davvero l'efficacia, era necessario calcolare il quantitativo di tossina contenuto nell'ultrafiltrato rimosso.

Tuttavia altri studi non hanno confermato l'efficacia dell'emodialisi, per cui la sua effettiva applicazione è ancora oggetto di discussione (Al-Sulaimani et al., 2022)

- Oltre a quanto detto finora, è molto importante giungere rapidamente ad una diagnosi differenziale, dato che altre tossine marine determinano sintomi simili a quelli indotti dalla TTX, come le PSTs (Paralytic Shellfish Toxins). Raccogliere un'accurata anamnesi sull'esposizione alla tossina e poter disporre di campioni dell'alimento a rischio sono fondamentali per una diagnosi di sospetto. Si ricorda anche che, il più delle volte, varie tossine si possono accumulare in specie animali differenti, per cui risulta essenziale conoscere la natura dell'alimento consumato.
- L'esame fisico, così come l'esame neurologico ed elettrocardiografico, dovrebbe essere sempre eseguito in corso di sospetto di intossicazione da TTX, mentre l'esame elettrolitico di routine pare non sia di aiuto al fine di giungere ad una diagnosi di certezza.
- Ovviamente implementare ogni prassi precauzionale per evitare che un individuo possa ingerire accidentalmente la TTX rappresenta la migliore strategia di prevenzione dei casi di intossicazione (Katikou et al., 2022).
- Nel corso degli anni diversi gruppi di ricerca hanno condotto studi per trovare un antidoto efficace che potesse contrastare gli effetti della TTX in corso di intossicazioni umane. Tra questi, nel 1995, si è voluto verificare l'efficacia di un nuovo anticorpo monoclonale (T20G10).

La procedura aveva previsto dapprima l'immunizzazione di topi da laboratorio. La TTX era stata coniugata in un caso con emocianina prelevata dalla patella *Diodora aspera*, nell'altro con albumina sierica bovina (KLH-TTXF e BSA-TTXF).

Gruppi di femmine di topi di ceppo albino (BALB/c) erano stati immunizzati tramite somministrazione sottocutanea (s.c.) in più siti di inoculo di coniugato KLH-TTXF ricevendo così una dose priming tra 20-50 µg in adiuvante completo di Freund.

Una settimana dopo la prima dose, era stato fatto un richiamo s.c. con dosi tra 20-50 µg di TTX coniugato con adiuvante incompleto di Freund.

Successivamente, gli animali avevano ricevuto diversi booster intra peritoneale (i.p.) a cadenza settimanale con dosi tra 10-25µg di TTX coniugato con fosfato di sodio 0,05M, pH 7.0, contenente NaCl (PBS "tampone fosfato alcalino") 0,15 M.

Le risposte anticorpali sieriche contro la TTX erano state monitorate mediante test ELISA. Gli animali selezionati come donatori di milza allo scopo di produrre ibridomi (cellule ingegnerizzate per la produzione massiva di anticorpi monoclonali) avevano ricevuto per 4

giorni, a cadenza giornaliera, dei booster con somministrazione endovenosa (e.v.) variabile tra 10-25 µg di TTX coniugato in PBS.

Gli ibridomi erano stati ottenuti secondo le procedure standard e monitorati tramite ELISA indiretta per individuare gli anticorpi anti-TTX ottenuti. Gli anticorpi reattivi contro BSA-TTXF erano stati testati per verificare la loro efficacia di inibizione tramite test ELISA con 200 ng/ml non coniugati di TTX.

Solo gli ibridomi che avevano mostrato una significativa inibizione specifica per la TTX vennero poi clonati. Inoltre, sottocloni stabili che producevano anticorpi contro TTX, vennero moltiplicati e crioconservati in azoto liquido.

Quantità dell'ordine di grandezza di milligrammi di anticorpi monoclonali (mAb) vennero prodotte nel liquido ascitico di topi pretrattati con 0,5 ml di adiuvante incompleto di Freund e inoculati 24 ore dopo con 5×10^6 cellule di ibridoma T20G10 clonate. Gli mAb vennero poi purificati dal liquido ascitico prima che potessero essere utilizzati.

Lo studio ha permesso di giungere ad alcune valutazioni, di seguito descritte.

1) Capacità di competizione di mAb T20G10 legato con TTX per il sito recettoriale nel poro dei canali voltaggio dipendenti del Na⁺:

In questo esperimento era stata utilizzata contestualmente alla TTX anche la Saxitossina radiomarcata ([³H]STX), una tossina dinoflagellata che si lega allo stesso sito recettoriale della TTX. Essa era stata miscelata con la TTX ed incubata in una preparazione costituita da membrana cerebrale di ratto. Si era osservato come, in assenza di mAb T20G10, TTX esercitava un'inibizione competitiva nei confronti [³H]STX impedendone dunque un legame significativo ai canali del Na⁺ nelle membrane. Tuttavia, all'aumentare delle concentrazioni di mAb T20G10, esso era in grado di legarsi in modo efficace con la TTX, riducendone così la concentrazione in forma libera e ripristinando il legame specifico di [³H]STX al recettore. Questa efficacia *in vitro* era da considerarsi predittiva di una possibile neutralizzazione della TTX *in vivo*.

2) Neutralizzazione *in vivo* di TTX dopo somministrazione i.p. della stessa:

In via preliminare era stato condotto un esperimento sui topi per verificare la dose letale della TTX entro 24 ore mediante somministrazione i.p di 200 µl di soluzione salina isotonica sterile, contenete dosi comprese tra 0 e 25 µg/kg TTX.

Si era osservato che, in queste condizioni, una dose di 10 µg/kg si era mostrata uniformemente letale.

Per valutare l'effetto protettivo di mAb T20G10 si era somministrato mAb T20G10 in PBS sterile mediante iniezione nella vena caudale dei soggetti presi in esame, 30 minuti prima dell'iniezione i.p. della tossina.

3) Neutralizzazione *in vivo* di TTX dopo somministrazione orale della stessa:

In questa prova i topi erano stati tenuti a digiuno per una notte con libero accesso solo all'acqua. La TTX era stata diluita in una sospensione di 0,5 g di Carnation not fat dairy milk/10 ml PBS e 200µl di tale soluzione a diverse concentrazioni di TTX erano state somministrate ai topi mediante sonda gastrica. La dose di 35µg/topo era risultata letale per tutti gli animali entro 30-75 minuti dalla somministrazione.

Per comprendere quanto fosse efficace la capacità protettiva di mAb T20G10, erano stati poi somministrati per via e.v. (vena caudale) 500 µg mAb T20G10 in 200µl di PBS sterile 30 minuti prima della TTX.

4) Trattamento mediante l'uso di mAb a seguito di intossicazione orale da TTX:

Poiché la maggior parte dei casi di esposizione umana alla TTX avviene attraverso il consumo di alimenti contenenti la tossina (ad esempio pesce palla), è stata testata la capacità di mAb T20G10 di proteggere dalla TTX somministrata per via orale

Anche in questo caso ai topi era stata somministrata una dose letale di TTX diluita in 200 µl Carnation not fat dairy milk tramite sonda gastrica. Da 10 a 15 minuti dopo la somministrazione orale, i topi avevano ricevuto varie dosi di mAb T20G10 in 200µl PBS sterile, attraverso la vena caudale.

Risultati ottenuti:

- 1) mAb T20G10 aveva dimostrato di avere alta affinità con la TTX, come confermato dal calcolo della costante di dissociazione (K_d), ossia la concentrazione della molecola presa in esame che serve a saturare il 50% dei legami presenti. Essa aveva dato come risultato $K_d = \sim 10^{-9}$ M.
- 2) La reattività crociata tra mAb anti TTX e l'anidrotetrodotossina era stata di circa il 2%, mentre completamente trascurabile era stato il legame con l'acido tetrodonico. Ciò confermava l'alta selettività di mAb anti TTX.
- 3) La capacità di mAb T20G10 di neutralizzare la TTX *in vivo* era stata esaminata in topi cui era stata fatta un'iniezione i.p. con la dose letale in 24 ore di TTX (10µg/kg). In questo caso mAb anti TTX era stato inoculato prima della tossina. Infatti quantità crescenti di mAb T20G10 erano state somministrate e.v. 30 minuti prima della valutazione dell'effetto della TTX. A seguito della sperimentazione era stato

evidenziato come già 50 µg di mAb T20G10 aveva avuto un effetto protettivo nel 50% dei casi (3/6 topi non erano andati incontro a morte). L'efficacia nel 100% dei casi si raggiungeva invece con una dose di 100µg mAb T20G10. Questo risultato aveva indicato che mAb T20G10 poteva legare TTX in circolo con affinità sufficiente per ridurre la TTX libera a livelli non letali.

La capacità di mAb T20G10 di neutralizzare la TTX *in vivo*, ma con l'assunzione della tossina per via orale aveva mostrato come il 100% dei topi (4/4) trattati i.v. con 500 µg mAb T20G10 30 minuti prima dell'esposizione a TTX era sopravvissuta ad una dose orale di 35µg di TTX; al contrario, in assenza di pretrattamento con mAb T20G10, la mortalità era del 100% (4/4) ed avveniva entro 30-75 minuti.

Dal momento che, in genere, negli esseri umani intossicati per via orale i segni neurologici si mostrano entro 2-3 ore dall'esposizione, con esito potenzialmente letale entro 7-8 ore, si è giunti alla conclusione che questo arco temporale fosse sufficiente per la somministrazione di una terapia passiva con mAb T20G10. A sostegno di questa ipotesi i ricercatori Fukiya e Matsumura (1992) riportarono il "salvataggio" di topi cui avevano somministrato una dose letale di TTX utilizzando anticorpi policlonali anti-TTX di coniglio.

- 4) Per testare l'efficacia dell'intervento terapeutico con mAb T20G10, era stata prima somministrata una dose letale di TTX mediante sonda gastrica ai topi sottoposti a sperimentazione, seguita 10-15 minuti dopo con varie dosi (0-500µg) di mAb T20G10 nella vena caudale. Ciascuno dei topi del gruppo di controllo era morto entro 25-35 minuti, mentre i topi trattati con 500µg di mAb T20G10 erano sopravvissuti oltre le 24 ore senza segni evidenti di intossicazione.

Dosi più basse di anticorpi avevano invece garantito una protezione meno efficace e solo il 33% dei soggetti trattati con 250 µg di mAb T20G10 erano sopravvissuti oltre le 24 ore.

Dosi inferiori di anticorpi compresi tra 30-125µg, non proteggevano invece dalla morte, ma prolungavano significativamente l'arco temporale che la precedeva (Rivera et al., 1995).

- Le ultime ricerche hanno portato alla realizzazione di un vaccino sperimentale contro la TTX che dovrebbe proteggere gli animali dall'inoculazione intraperitoneale di TTX, stimolando l'immunità umorale.

Tuttavia, sebbene questi prodotti abbiano certamente una potenziale efficacia nel trattamento delle intossicazioni da TTX, saranno necessarie ulteriori indagini al fine di fornire prove sufficienti in medicina umana (Lago et al., 2015).

2.1.13 Applicazioni mediche della TTX

Ormai si è compreso che il meccanismo d'azione della TTX si basa sul blocco dei canali del Na⁺ a voltaggio dipendenti (Nav) e con essi della trasmissione neuronale. Dato che nel sistema nervoso e nel tessuto muscolare scheletrico e cardiaco vi sono diverse isoforme di Nav importanti per lo svolgimento di molte funzioni fisiologiche di base, la TTX si comporta come una potente tossina ma potenzialmente anche come un principio farmacologico sfruttabile per il trattamento di patologie correlate alle medesime proteine canale. Partendo da queste considerazioni sono state prese in esame la TTX e altre tossine marine.

La TTX è risultata in grado di bloccare efficacemente 6 dei 9 sottotipi di Nav identificati nei tessuti dei mammiferi. Tra questi i sottotipi neurali TTX-sensibili (TTX-S), Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.6 e Nav1.7, sono ben distribuiti nel sistema nervoso centrale e periferico e sono associati alla generazione o alla propagazione del dolore (Katikou et al., 2022).

È importante sottolineare come, a dosi terapeutiche, la TTX non abbia affinità per Nav1.5, il canale del Na⁺ primariamente espresso nelle cellule del muscolo cardiaco: questo rappresenta un grande vantaggio rispetto ad altri principi farmacologici.

Il legame tra il Nav e la TTX è di natura elettrostatica. Gli amminoacidi carichi negativamente, collocati nel vestibolo esterno del poro del canale del Na⁺, attraggono il gruppo guanidinico, carico positivamente, della molecola della TTX. Essa quindi si lega agli amminoacidi negli anelli extracellulari che fiancheggiano il poro ("anse dei pori"), bloccando il flusso di Na⁺ e di conseguenza la propagazione dei potenziali d'azione e della conduzione degli impulsi nervosi.

La risposta variabile che si è osservata da parte degli organi e dei tessuti alla TTX, è proprio in relazione alle diverse isoforme di Nav presenti nelle membrane delle loro cellule (Fig. 24).

Le 9 isoforme di tali proteine canale variano infatti per cinetica e sensibilità alla TTX.

La sensibilità dei canali del Na⁺ a voltaggio dipendenti presenti nel tessuto muscolare cardiaco è inoltre diversa tra i vertebrati, risultando minore nei mammiferi e nei rettili piuttosto che nei pesci teleostei, negli anfibi e negli uccelli.

Come ricordato le proteine canale del Na⁺ a voltaggio dipendenti sono strettamente collegate alla nocicezione e disfunzioni a loro carico comportano innaturali stati algici. Proprio per questo l'uso di farmaci con principi attivi che abbiano la capacità di bloccare selettivamente tali proteine garantirebbe un beneficio, oltre a ridurre gli effetti avversi legati all'uso di molecole antagoniste non selettive quanto TTX per tali canali.

La TTX ha comunque dei limiti, in particolare per quanto riguarda il trattamento del dolore acuto. D'altro canto, si sono avuti risultati incoraggianti circa l'uso della TTX per il trattamento del dolore cronico e neuropatico secondario ad uno stato infiammatorio protratto. Proprio quest'ultima condizione è stata ampiamente studiata attraverso l'uso di modelli animali, prevalentemente roditori, ma anche conigli, cani e gatti. La valutazione della sensazione dolorifica nei diversi modelli, tramite test della formalina (usato nella valutazione dell'effetto di farmaci per il trattamento del dolore persistente causato da un danno a livello tissutale) e Writhing test (metodica che sfrutta l'iniezione di principi chimici irritanti, come acido acetico o fenilchilone con lo scopo di indurre dolore a livello periferico), ha preso in considerazione diversi tipi di dolore, tra cui allodinia da freddo e da caldo, pressione meccanica, dolore infiammatorio, dolore viscerale, dolore indotto come effetto avverso all'uso di medicinali.

TTX-S Na _v Subtype	Location(s) in Body	Associated Pathologies
Na _v 1.1	CNS Microglia PNS ¹	Chronic pain Chronic visceral hypersensitivity Colorectal cancer
	Ventricular cardiomyocytes	Ovarian cancer
Na _v 1.2	CNS PNS (low expression) SC (lamina I/II)	Ovarian cancer
	Ventricular cardiomyocytes	
Na _v 1.3	DRG (low expression) Embryonic sodium channel SC (lamina I/II—adults)	Chronic pain Inflammatory pain Ovarian cancer
	Ventricular cardiomyocytes	
Na _v 1.4	Skeletal muscle Ventricular cardiomyocytes	Ovarian cancer
Na _v 1.6	Epidermal free nerve terminals Keratinocytes Microglia Nodes of Ranvier SC, PNS ¹	Cervical cancer Colorectal cancer
	Ventricular cardiomyocytes	
Na _v 1.7	PNS (all types of DRG neurons) SC ¹	Chronic pain Inflammatory pain Interstitial cystitis, bladder pain syndrome Intraperitoneal cyclophosphamide-induced cystitis
	Epidermal free nerve terminals	Mechanical hyperalgesia Non-small cell lung carcinoma Ovarian cancer Prostate cancer

Fig. 24) La tabella mostra i principali sottotipi di Na_v TTX-S, la loro localizzazione corporea e le patologie associate. (Katikou et al., 2022)

Tramite queste ricerche effettuate *in vivo* è stato possibile dimostrare la capacità analgesica della TTX e proporre anche un suo possibile uso in ambito umano, essendo priva di genotossicità.

Tuttavia non si può dimenticare la principale controindicazione che frena una possibile applicazione sistematica della TTX in ambito medico, ossia il suo basso Indice Terapeutico “IT” , che è compreso tra 3-5 per iniezione endovenosa (e.v.) o intramuscolare (i.m.).

L’IT di un farmaco è l’intervallo tra la dose necessaria per avere un effetto farmacologico e la dose che provoca un effetto tossico. Si ottiene facendo il rapporto tra la dose letale 50 (DL₅₀) e la dose efficace 50 (DE₅₀). Quanto più alto è l’IT di un farmaco (lontano dall’unità), tanto più sicuro è il suo uso. Sebbene l’IT della TTX sia basso per via e.v. o i.m., diversi studi hanno dimostrato che la co-somministrazione di vasocostrittori, anestetici locali o lo sfruttamento di diverse posologie come la via per os tramite pellet ne aumenta significativamente l’IT, senza comprometterne l’efficacia complessiva.

Bisogna ricordare che i benefici della TTX come analgesico non rappresentano una scoperta recente, dato che fin dai tempi antichi era stata sfruttata secondo i precetti della medicina tradizionale giapponese per alleviare la neuralgia causata dalla lebbra. Successivamente all’isolamento della TTX da parte del Dr. Tahara (1894) è stata utilizzata anche per ridurre gli spasmi tetanici o in pazienti affetti da artrite reumatoide (Katikou et al., 2022; Lago et al., 2015).

Di seguito vengono indicati i trattamenti a base di TTX nell’uomo.

- Trattamento del dolore neuropatico: Gli stimoli nocicettivi sono essenziali per avvisare il nostro corpo di eventuali pericoli, ma talvolta essi si modificano in dolore neuropatico. In questo caso la causa è dunque un disturbo o un danno al sistema somatosensoriale che ne provoca un funzionamento anomalo, piuttosto che l’effettiva stimolazione dei nocicettori. Una caratteristica tipica del dolore neuropatico è una sensazione dolorifica spontanea causata da potenziali d’azione ectopici nelle vie nocicettive. È importante sottolineare che il danno ai nervi è tipicamente seguito dalla sovraregolazione dell’espressione e delle correnti di Nav sensibili alla TTX (TTX-S), nonché dalla sottoregolazione dell’espressione e delle correnti di Nav resistenti alla TTX (TTX-R). Pare che questo possa contribuire allo sviluppo e al mantenimento del dolore neuropatico. Sulla base di questi dati, la capacità della TTX di trattare il dolore neuropatico è stata ampiamente studiata e si è dimostrata efficace in diversi studi su modelli di roditori. La TTX è di particolare interesse per il trattamento del dolore neuropatico poiché, come anche osservato durante gli studi effettuati *in vivo*, non causa nessuno degli effetti collaterali deleteri legati all’uso di oppioidi, come dipendenza, infiammazione, sedazione, incoordinazione motoria e depressione respiratoria.

Sebbene quanto ottenuto finora dia speranza di un possibile utilizzo della TTX a questi fini, sarà necessario studiarne l'applicazione anche sull'uomo, oltre che su modelli animali per valutare correttamente l'efficacia della TTX nel trattamento del dolore neuropatico.

- Trattamento del dolore infiammatorio: il dolore infiammatorio rappresenta un dolore spontaneo, con ipersensibilità a stimoli che normalmente non darebbero alcun tipo di effetto dannoso, ma che invece vengono percepiti come dolorosi. Il dolore infiammatorio e il dolore neuropatico hanno caratteristiche somiglianti, dato che entrambi possono causare sensazioni dolorifiche come allodinia e iperalgesia.

Questa plasticità del sistema somatosensoriale in origine aveva un significato adattativo sviluppatosi nel corso dell'evoluzione. L'induzione di sensazioni algiche in prossimità di un sito di infiammazione ne promuove una più rapida guarigione, sia disincentivandone il contatto da parte del soggetto, sia focalizzando l'attenzione sull'area in modo che possa essere trattata. Tuttavia, il prolungamento eccessivo di una sensazione di dolore è certamente fastidiosa per chi la percepisce: allo scopo si stanno cercando da tempo trattamenti efficaci per la sua gestione, incluso un trattamento a base di TTX, la quale sembra promettente grazie alla sua dimostrata capacità di attenuare il dolore indotto da agenti infiammatori, aumentando la soglia nocicettiva nelle cellule colpite.

La presenza di Nav TTX-S nelle vie del dolore infiammatorio è da considerarsi una scoperta importante che apre la strada all'uso della TTX come analgesico antinfiammatorio. I gangli delle radici dorsali (DGR) svolgono un ruolo determinante nella genesi e nella progressione del dolore infiammatorio, sia a livello periferico che ai loro terminali nel midollo spinale. I neuroni nocicettivi all'interno delle DRG esprimono diversi tipi di Nav TTX-S e TTX-R. Uno studio ha dimostrato che l'iniezione dell'agente infiammatorio carragenina ha comportato una maggiore espressione nello specifico di due canali TTX-S (Nav1.3 e Nav1.7) e un conseguente aumento delle correnti ioniche TTX-S (Black et al., 2004).

Uno studio separato ha evidenziato il ruolo di Nav1.7 nel dolore infiammatorio, osservando che una mutazione nel gene umano SCN9A, che codifica appunto per Nav1.7, porta a infiammazione cronica caratterizzata da vari sintomi, tra cui edema, eritemalgia, arrossamento e dolore bilaterale. Da questo si è capito che in corso di dolore infiammatorio sono soprattutto i canali TTX-S, e non solo i canali TTX-R, a svolgere un ruolo nel suo mantenimento, e forse anche nella sua generazione. Da queste considerazioni ne deriva che la TTX potrebbe essere utilizzata nel suo trattamento (Nassar et al., 2004).

Tramite una sperimentazione *in vivo*, mediante l'uso un modello murino trattato con carragenina, è stato valutato l'effetto antinocicettivo della TTX, tramite iniezione

sottocutanea. I ratti erano stati pretrattati con TTX (2,5 µg/kg) un'ora prima dell'iniezione dell'agente irritante nella zampa posteriore destra. Tre ore dopo l'iniezione, erano stati misurati gli effetti della TTX tramite il test di "reazione di ritiro delle zampe posteriori", tramite il quale si è valutata la sensibilità e l'iperalgia infiammatoria. Sebbene gli effetti osservati a seguito della somministrazione di TTX siano stati modesti, la tossina aveva comunque ridotto in parte l'iperalgia nella zampa colpita. L'efficacia blanda del trattamento, basato su una singola iniezione sottocutanea di TTX ha suggerito che potrebbe essere utile in condizioni di dolore infiammatorio lieve o cronico, più che in corso di dolore infiammatorio grave (Alguacil et al., 2008)

Ulteriori ricerche eseguite nel 2015 da Alvarez e Levine successivamente per implementare i dati fino a quel momento ottenuti avevano testato l'efficacia della TTX nel trattamento del dolore muscolare infiammatorio causato sempre dall'inoculazione di carragenina. I risultati ottenuti mostravano che dosi tra 0,03–1,0 µg/20 µL di TTX inibivano l'iperalgia meccanica nel muscolo interessato.

Nello specifico, la TTX era stata iniettata, dopo il trattamento con carragenina, in dosi crescenti ogni 45 minuti, cosa che aveva comportato ad un aumento statisticamente significativo, dose-dipendente, della soglia nocicettiva meccanica. Inoltre, gli effetti ottenuti al dosaggio di 1,0 µg di TTX erano ancora presenti 24 ore dopo l'iniezione.

È stata testata anche la sua associazione con l'anestetico locale bupivacaina e con l'epinefrina, un vasocostrittore, con conseguente blocco prolungato della trasmissione degli impulsi dolorifici periferici con un margine di sicurezza maggiore rispetto a quanto alla sola somministrazione di bupivacaina. L'iperalgia delle zampe posteriori indotta dalla carragenina e dell'edema infiammatorio associato aveva mostrato un'evidente diminuzione. L'effetto anestetico della TTX a dosi non tossiche aveva mostrato grande efficacia e soprattutto aveva comportato solo trascurabili effetti avversi locali (Beloil et al., 2006) (Bucciarelli et al., 2021).

Ulteriori indagini avevano individuato come iniezioni topiche di TTX al dosaggio di 11,5 µM, associate ad epinefrina, avevano portato ad un prolungato effetto anestetico locale del nervo sciatico nei topi inducendo un blocco reversibile dei canali del Na⁺ per più di 13 ore (Kohane et al., 1998).

Sono stati testati anche dispositivi a rilascio controllato di bupivacaina, desametasone e TTX (75mg, 0,05%), generando blocchi nervosi periferici locali efficaci e di lunga durata nei ratti (Kohane et al., 2003).

In modo simile polimeri TTX coniugati (1,00-80,00 µg) avevano garantito anestesia locale nei ratti che si era prolungata da alcune ore, fino a 3 giorni dopo la somministrazione, senza indurre effetti avversi, sistemici o locali, degni di nota (Zhao et al., 2019).

Rispetto ad altri analgesici usualmente utilizzati a tale scopo, la TTX non induceva depressione del miocardio e la sua capacità di attraversare la barriera ematoencefalica era trascurabile, con conseguente riduzione del rischio di comportare depressione del sistema nervoso centrale (Berde et al., 2011; Katikou et al., 2022).

La TTX è stata valutata come potenziale alternativa agli attuali farmaci antinfiammatori, compresi oppioidi come la morfina. Per confrontare l'efficacia, dei due composti di attenuare il dolore infiammatorio si è eseguito sia il test di contrazione dell'acido acetico che il test della formalina. Nel primo test, 30 minuti dopo la sua somministrazione, la morfina aveva ridotto maggiormente il numero di contrazioni muscolari indotte dall'acido acetico, rispetto a tutti i dosaggi di TTX testati. Nel test della formalina, TTX non aveva influenzato la fase acuta iniziale del dolore, ma ad un dosaggio elevato (6,0 µg/kg) l'effetto analgesico si era mostrato evidente soprattutto nella seconda fase infiammatoria del dolore.

Al termine della sperimentazione si era concluso che, nel complesso, la TTX era stata meno efficace della morfina, ma a suo favore non si erano osservati gli effetti collaterali di quest'ultima (sedazione) (Marcil et al., 2006).

- Trattamento del dolore legato a stati oncologici: il dolore che si manifesta in condizioni oncologiche ha la tendenza ad aumentare via via di intensità con l'avanzare dello stadio di gravità e ne rende la sopportazione, già difficile da un punto di vista fisico-psicologica per il paziente, ancora più ardua.

Secondo una statistica, più di un terzo dei pazienti affetti da cancro soffre di un dolore oncologico da moderato a grave, dovuto, oltre al danno causato dal cancro stesso, dai trattamenti terapeutici chemioterapici o dalle comorbidità più o meno correlate allo stato canceroso, come costipazione (dovuta ad un possibile ingombro dovuto a masse sempre di maggior volume) o immobilità e tromboflebiti.

Vista la diffusione di tale problematica, questo forse è uno dei campi più promettenti in cui usare la TTX a scopo terapeutico.

A questo proposito, uno studio del 2015 effettuato su ratti, precedentemente trattati con l'agente chemioterapico oxaliplatino, aveva mostrato che un'iniezione locale di TTX garantiva una leggera, ma significativa, riduzione del dolore neuropatico indotto. La TTX era stata iniettata in dosi crescenti (da 0,03–1,0 µg/20 µL) ogni 45 minuti, a distanza di 4 e 15 giorni dopo l'iniezione dell'oxaliplatino. Nella prima fase di sperimentazione (4 giorni

post-iniezione), i ratti che avevano ricevuto una dose pari o superiore a 0,1 µg di TTX avevano mostrato un aumento significativo della soglia meccanica nocicettiva. Il massimo risultato lo si era ottenuto al dosaggio più elevato (1,0 µg). Al secondo controllo (15 giorni), la dose maggiore (1,0 µg) continuava a garantire un aumento statisticamente significativo della soglia meccanica nocicettiva, proseguendo così il suo effetto analgesico nei confronti del dolore neuropatico indotto dal contestuale trattamento (Alvarez e Levine, 2015).

L'azione inibitoria della TTX riferita al dolore neuropatico indotto da trattamenti chemioterapici è stata valutata anche nei confronti di un altro agente, il paclitaxel. La TTX alle dosi di 1,0, 3,0 e 6,0 µg/kg era risultata efficace senza inoltre indurre segni di tossicità o altri effetti collaterali avversi (Nieto et al., 2008).

Superati i test su modelli animali, a partire dal 2007 i ricercatori hanno cominciato ad esaminare gli effetti analgesici della TTX per il trattamento del dolore oncologico anche su pazienti umani (Bucciarelli et al., 2021).

In Canada si è valutato l'effetto della TTX a scopo analgesico nei confronti di dolore indotto da condizioni oncologiche gravi all'ultimo stadio, la via di somministrazione prescelta per la TTX era stata la via sottocutanea.

La prima risposta al trattamento fu rilevata al 4°-5° giorno successivo, con il raggiungimento del picco di efficacia al 10° giorno. L'effetto benefico era poi andato via via diminuendo, scomparendo definitivamente 2 settimane dopo l'iniezione.

I parametri presi in considerazione nei pazienti erano: valutazione fisica, segni vitali, saturazione dell'ossigeno, parametri elettrocardiografici (nello specifico l'intervallo QT corretto QTc), esame neurologico, biochimico ed ematologico. Essi erano sembrati non risentire dell'azione della TTX, sebbene tre pazienti manifestarono effetti avversi come atassia, compressione epidurale maligna e moderata e transitoria disfagia che comportò il loro ritiro dallo studio.

Successivamente si volle osservare l'efficacia e la sicurezza della TTX nel lungo periodo. In questo caso, su 165 pazienti, si era rilevato che le iniezioni sottocutanee di 30 µg di TTX due volte al giorno per quattro giorni avevano prodotto una risposta analgesica media di 56,7 giorni, significativamente superiore rispetto al placebo (9,9 giorni). Lo studio era stato eseguito in doppio cieco, metodologia in cui né il paziente né gli sperimentatori sanno quale tipo di trattamento verrà somministrato al paziente stesso. Durante il processo uno dei partecipanti si dovette ritirare a causa degli effetti avversi, mentre nei restanti, la tossicità si era mostrata bassa o moderata, senza effetto tossico cumulativo o sviluppo di tolleranza a seguito di una somministrazione protratta (Lago et al., 2015).

Se presenti, gli effetti avversi più comuni furono nausea, formicolio ed intorpidimento periorale ed orale.

In conclusione, la TTX poteva fornire un'analgesia clinicamente significativa in pazienti con dolore oncologico moderato o grave, a confronto di altri analgesici meno efficaci o che avevano comportato effetti collaterali più gravi, come la dipendenza.

Tuttavia solo il 50% dei pazienti aveva risposto alla TTX, senza che ci fosse una spiegazione al riguardo (Hagen et al., 2017; Bucciarelli et al., 2021).

A seguito dei risultati positivi ottenuti, WEX Pharmaceuticals ha sviluppato il farmaco Halneuron® o Tectin® con una concentrazione di 15 µg/mL di TTX per il trattamento del dolore oncologico da moderato a grave e come alternativa sicura, di lunga durata, non inducente dipendenza, rispetto ai classici trattamenti con oppioidi per il dolore da cancro. Nel 2022 il farmaco, con posologia sottocutanea, si trovava in Fase III di sperimentazione clinica per il suo utilizzo nel controllo del dolore relativo alle condizioni oncologiche e in Fase II per la gestione del dolore neuropatico risultante dai trattamenti chemioterapici (Katikou et al., 2022)

Il potenziale futuro uso a scopo terapeutico della TTX non si è comunque limitato al trattamento di stati dolorifici, ma anche gestione della schizofrenia, fotofobia e stati di dipendenza da droghe.

- Trattamento dei sintomi da astinenza da droghe: La sindrome da astinenza da droghe come l'eroina e la conseguente possibile ricaduta rappresentano un problema importante. Infatti anche dopo lunghi periodi in cui si è seguito uno stoico processo di disintossicazione, lo stress o i segnali ambientali associati alla droga possono causare ricadute nei tossicodipendenti in via di recupero.

Finora gli oppiacei da prescrizione hanno rappresentato i farmaci più utilizzati per trattare i sintomi di astinenza in modo controllato, tuttavia la dipendenza ad essi associata, non li rende un'opzione sfruttabile nel lungo periodo (Bucciarelli et al., 2021).

In uno studio in doppio cieco del 2009, controllato con placebo, furono coinvolti 45 individui in cura per ridurre la dipendenza da eroina. Fu somministrata una singola iniezione da 10 µg di TTX intramuscolare. L'effetto ottenuto fu positivo, con riduzione dell'ansia e del bisogno di eroina, senza che vi fosse alcun effetto collaterale significativo sulla pressione sanguigna o sulla frequenza cardiaca (Shi et al., 2009).

In uno studio separato, eseguito sempre in doppio cieco controllato con placebo, furono coinvolti 216 pazienti. Ad essi fu fatta un'iniezione intramuscolare di 5 o 10 µg di TTX 3

volte al giorno. I sintomi da astinenza diminuirono significativamente già entro il terzo giorno, senza effetti avversi sulla respirazione o sulla pressione sanguigna (Song et al., 2011).

La TTX può dunque fornire un'alternativa interessante ai classici trattamenti con oppioidi avendo il grande vantaggio di non indurre un'ulteriore dipendenza e, a dosi terapeutiche, di non indurre effetti cardiovascolari o neuronali.

Tuttavia, il meccanismo per cui la TTX allevia i sintomi di astinenza è ancora sconosciuto. Inoltre, parametri come la saturazione di ossigeno nel sangue, la frequenza respiratoria o la temperatura corporea non sono stati presi in considerazione nei due studi citati e quindi non si è a conoscenza degli effetti che la TTX possa avere.

È stato ipotizzato che il meccanismo attraverso il quale la TTX allevi i sintomi di astinenza da eroina possa essere simile al percorso con cui essa sopprime il comportamento di ricerca di cocaina in ratti, resi sperimentalmente dipendenti.

Basandosi sul concetto di come l'amigdala basolaterale e il nucleo accumbens siano coinvolti nei comportamenti di ricerca di droga in diverse specie, compreso l'uomo, fu eseguito uno studio *in vivo*. Il modello animale prescelto fu quello di ratti Sprague-Dawley, nei quali una microiniezione di TTX aveva inattivato temporaneamente rispettivamente l'amigdala basolaterale oppure il nucleo accumbens.

Quando ad essere inattivata era l'amigdala basolaterale, i ratti non mostrarono il comportamento secondario di ricerca della ricompensa (indotto solo da stimoli luminosi ed uditivi), mentre rimase inalterato quello primario (indotto dalla presenza di cocaina).

L'effetto opposto fu invece osservato quando ad essere inibito era il nucleo accumbens (Grimm, 2000).

In uno studio separato, l'inattivazione dell'amigdala basolaterale, della corteccia cingolata anteriore, della corteccia prelimbica o della corteccia infralimbica tramite iniezioni bilaterali di TTX, aveva ridotto il comportamento di desiderio di cocaina in ratti, senza però avere alcun effetto di riduzione della loro attività locomotoria (McLaughlin e See, 2002).

Questi risultati supportavano l'ipotesi che l'amigdala basolaterale e la corteccia prefrontale dorsomediale fossero più coinvolte nell'induzione del comportamento di ricerca di droga (Bucciarelli et al., 2021).

- Trattamento di sensazioni algiche oculari: tramite l'applicazione topica a livello oculare di TTX in modelli animali, si è voluto studiare il suo effetto anestetico locale. La TTX ha prodotto in questo modo un effetto anestetico locale di lunga durata che è stato sfruttato per il controllo del dolore post-chirurgico nei conigli (Schwartz et al., 1998).

Inoltre la somministrazione a livello corneale di TTX (1 mM, 10 μ L) diluita in soluzione fisiologica ha alleviato la sensazione di fotofobia in ratti con lesioni corneali (Green et al., 2015).

- Trattamento di patologie neurologiche causate da ipereccitabilità neuronale: La TTX si è dimostrata efficace nella prevenzione di crisi epilettiche post traumatiche (Graber e Prince, 1999; Katikou et al., 2022).
- Recentemente è stato scoperto che gli inibitori dei canali del sodio, tra cui appunto la TTX, riducono o annullano la secrezione di glucagone nelle cellule alfa del pancreas (Belardinelli e Dhalla, 2012; Lago et al., 2015).
- Trattamento di stati oncologici: La TTX pare avere non solo azione sul dolore associato a condizioni oncologiche, ma anche dei veri e propri effetti antitumorali. Su modelli oncologici animali e *in vitro* su diverse linee cellulari tumorali umane.

Si è compreso come i Nav TTX-S controllino più passaggi all'interno della cascata metastatica e probabilmente svolgono anche un ruolo nel mantenimento e nella moltiplicazione delle cellule metastatiche.

Ad esempio, la sovraespressione di Nav1.7 è associata ad un forte potenziale metastatico nel tumore prostatico come evidenziato sia *in vitro* che *in vivo* (Disse et al., 2005).

Nel cancro del colon-retto, è invece la sovraespressione di Nav1.1 e Nav1.6 ad essere associata allo sviluppo di metastasi nei linfonodi correlati (Lin et al., 2019; Bucciarelli et al., 2021).

Data la specificità della TTX e il fatto che il suo uso potrebbe evitare gli effetti collaterali che si manifestano a seguito dell'uso dei più comuni farmaci antitumorali, il suo impiego potrebbe consentire sviluppi interessanti in ambito oncologico.

In corso di sperimentazioni *in vivo*, TTX ottenuta dalla pelle di pesci palla "mascherati" (*Arothron diadematus*) era stata somministrata a due gruppi separati di topi albini svizzeri, con carcinoma dell'ascite di Ehrlich (EAC) (Katikou et al., 2022). Negli animali a cui era stata somministrata 1/10 di DL₅₀ di TTX i giorni di sopravvivenza erano aumentati maggiormente (46,6 giorni \pm 4,2%), rispetto a quelli a cui era stata somministrata 1/20 di DL₅₀ (26,7 giorni \pm 2,6%) rispetto ai controlli.

In entrambi i trattamenti si era osservata una riduzione della produzione di cellule tumorali del 40-60%, per un effetto citotossico sulle stesse (apoptosi) e una diminuzione del volume del liquido ascitico peritoneale (Fouda, 2005).

In uno studio separato, topi femmine a cui erano state iniettate cellule tumorali EAC, furono divise in due gruppi. Uno era stato trattato con TTX, l'altro con doxorubicina, un agente

chemioterapico frequentemente utilizzato, ma che determina gravi effetti collaterali avversi, tra cui cardiomiopatia degenerativa irreversibile e insufficienza cardiaca congestizia. I risultati ottenuti furono sorprendenti, dato che la TTX aveva ridotto maggiormente il peso del tumore e aveva aumentato maggiormente il tempo di sopravvivenza (giorni), inoltre aveva dato meno effetti collaterali (El-Dayem et al., 2013; Bucciarelli et al., 2021).

L'effetto inibitorio della TTX è stato dimostrato *in vitro* anche nei confronti di tumori prostatici, usando linee cellulari di glioma umano (Fraser et al., 2003).

Per quanto riguarda gli stati leucemici, a ratti con leucemia è stato inoculato a livello intraperitoneale un estratto di 3 diversi ceppi di batteri produttori di TTX (*Bacillus spp.*, *Kytococcus sedentarius* e *Cellulomonas fimi*) isolati dal pesce palla *Arothron hispidus* e si era evidenziata una riduzione nella crescita delle linee cellulari leucemiche (Bragadeeswaran et al., 2010).

Allo stesso modo l'attività antitumorale di altre 3 specie batteriche produttrici di TTX (*Vibrio alginolyticus*, *Microbacterium arabinogalactabolyticum* e *Serratia marcescens*) era stata investigata *in vitro* usando due linee cellulari di tumore del colon-retto (SW480 e SW620). Su entrambe le linee si era evidenziato un notevole rallentamento di crescita cellulare tumorale (Xiao e Bian, 2014).

Con tali evidenze, si ritiene di poter gestire diversi tumori con l'ausilio della TTX, o con le specie batteriche suddette, certamente dopo aver valutato l'eventuale comparsa di effetti avversi derivanti da un uso a lungo termine della TTX o da trattamenti ripetuti (Katikou et al., 2022).

Tuttavia, l'osservata sovraespressione di Nav TTX-S in diversi tipi di tumore fornisce una prospettiva incoraggiante (Bucciarelli et al., 2021).

- Trattamento di patologie virali: la più recente applicazione della TTX in ambito terapeutico riguarda il suo effetto antivirale. Ciò ha reso recentemente la TTX oggetto di grande interesse nel trattamento nei confronti di SARS-CoV-2. Il suo effetto è stato valutato tramite un "approccio ligando-basato" tramite l'uso del "Ligandscout software 4,3" e di un generatore di modelli farmacoforici ligando-basati.

A questo primo approccio dovranno necessariamente seguire altri test sia *in vitro* che *in vivo* (Katikou et al., 2022).

CAPITOLO III

3.1. UNA PROBLEMATICA ATTUALE: LA DIFFUSIONE DEI TETRAODONTIDI NEL MAR MEDITERRANEO

3.1.1 Introduzione generale

Fino agli inizi del 1900 i pesci palla accumulatori della TTX abitavano prevalentemente le acque della fascia tropicale e subtropicale dell'Oceano Indo-Pacifico, l'Oceano Atlantico e il golfo del Messico. Tuttavia, a partire dal 2003, il pesce palla *Lagocephalus sceleratus* ed altri suoi simili hanno preso parte a quella che è stata definita Migrazione Lessepsiana tramite il Canale di Suez (realizzato dall'ingegnere Ferdinand de Lesseps, da cui il nome dato al fenomeno) iniziando a colonizzare contestualmente le acque temperate del Mediterraneo a partire da Israele, Libano, Turchia, Cipro, Grecia, poi successivamente Italia, Croazia, Malta, Libia, Algeria, Tunisia ed infine Spagna (Guardone et al., 2018)

L'iniziale limitazione di tale processo a quella che è la zona orientale del Mediterraneo era garantita dalla presenza dello stretto di Sicilia che fungeva da barriera. Tuttavia l'ampliamento e l'approfondimento del Canale di Suez, la perdita di barriere fisiche preesistenti (come una riduzione del grado di salinità delle acque), un decremento della fauna autoctona a causa di un'eccessiva attività di pesca ne hanno garantito una più veloce progressione. Tale migrazione, oltre alle alterazioni antropogeniche, è stata oltretutto favorita dal graduale, ma costante, recente cambiamento climatico che ha determinato un incremento della temperatura delle acque non solo nel Mediterraneo, ma anche in tutti i mari del mondo. Questo evento di tropicalizzazione ha reso ecosistemi un tempo non adatti, ora adeguati alla vita e alla crescita di queste specie alloctone e, insieme ad esse, è avvenuta l'introduzione di nuovi patogeni o tossine (Carbonara et al., 2017).

Ovviamente non solo i Tetraodontidi sono stati oggetto di questa migrazione, ma tenendo conto della rapida e preoccupante diffusione di queste specie ittiche nelle acque nazionali, oltre che della loro effettiva pericolosità, l'ISPRA (Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale), un ente pubblico di ricerca italiano, ha promosso una campagna di informazione in collaborazione con la Direzione Generale della Pesca Marittima e dell'Acquacoltura, il Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali (MIPAAF) e il Reparto Pesca Marittima del Corpo delle Capitanerie di Porto, in modo da mantenere alta l'attenzione dei pescatori, degli operatori di tutta la filiera ittica e dei consumatori sulla pericolosità di queste specie, il cui consumo potrebbe facilmente avere esiti letali.

Il Ministero della Salute, già dal 1992, ne aveva vietato la commercializzazione a scopo alimentare. All'inizio degli anni 2000 il divieto è stato esteso anche a livello europeo con il Regolamento (CE)

854/2004 (oggi abrogato dal Regolamento (UE) 2017/625) recante “Norme specifiche per l’organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano” che, all’Allegato III, Capo II impone agli Stati membri il divieto di immettere sul mercato pesci appartenenti alla Famiglia Tetraodontidae in quanto pericolosi per la salute e minanti la sicurezza pubblica.

Secondo quanto stabilito invece dal Regolamento (CE) 853/2004, Capitolo V, recante “Norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale (*omissis*)... Tossine nocive per la salute umana” e il Regolamento (UE) 627/2019, Allegato VI, Capitolo I stabilisce “Modalità pratiche uniformi per l’esecuzione dei controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano (*omissis*)... Prodotti della pesca velenosi”, gli operatori del settore alimentare (OSA) e le autorità competenti (AC) hanno l’obbligo di garantire il rispetto dei requisiti di sicurezza per i prodotti della pesca immessi in commercio e di non introdurre sul mercato specie ittiche appartenenti alle Famiglie dei Tetraodontidae, Molidae, Diodontidae e Canthigasteridae in quanto contenenti tossine nocive per la salute umana (Guardone et al., 2018).

Gli OSA sono responsabili della sicurezza alimentare dei prodotti in tutte le fasi della filiera di produzione, trasformazione e distribuzione. L’osservanza da parte degli operatori della normativa viene monitorata costantemente dai servizi veterinari delle ASL mediante la vigilanza sanitaria presso i mercati ittici, le pescherie e le attività di distribuzione dislocate sul territorio nazionale (Ministero della Salute della Repubblica italiana, 2013).

A questo proposito è stato anche emanato a livello europeo il Regolamento (UE) N° 1143/2014 sulla “Prevenzione, controllo di introduzione e di diffusione di specie invasive nel Mediterraneo” per salvaguardare la biodiversità e la sicurezza alimentare.

I dati ottenuti durante le ricerche effettuate in questi anni, hanno dimostrato che almeno 11 specie appartenenti alla Famiglia dei Tetraodontidae sono state individuate all’interno del bacino Mediterraneo: *Lagocephalus guentheri*, *Lagocephalus. spadiceus*, *Lagocephalus lagocephalus*, *Lagocephalus suzensis*, *Lagocephalus sceleratus*, *Torquigener flavimaculosus*, *Tylerius spinosissimus*, *Sphoeroides spengleri*, *Sphoeroides pachygaster*, *Sphoeroides marmoratus* e *Ephippion guttiferum*. Quelle che sono state individuate dalle AC nelle coste italiane sono state tre: *L. sceleratus* (pesce palla argenteo), *Lagocephalus lagocephalus* (pesce palla oceanico) e *Sphoeroides pachygaster* (pesce palla dalla testa smussata). Diversi studi sono stati condotti al fine di cercare di comprendere come si sia modificata negli ultimi anni la fauna marina all’interno del Mar Mediterraneo a causa delle modifiche geofisiche, per cause naturali o per intervento umano, oltre che fare previsioni sulla situazione futura (Guardone et al., 2018).

Diversi sono i paesi che si affacciano sul Mediterraneo ad aver portato avanti questi studi.

La presenza di specie di pesce palla a livello della costa mediterranea orientale egiziana è stata presa in considerazione dalla Facoltà di Scienze dell'Università di Al-Azhar, dal College of Fisheries, Technology and Aquaculture dell'Accademia araba per la scienza, la tecnologia e il trasporto marino di Alessandria d'Egitto e dall'Istituto Nazionale di Oceanografia e Pesca di Alessandria d'Egitto.

Le analisi sono state condotte dal 2012 al 2015 su campioni ottenuti da processi di pesca commerciale. In questo periodo sono state identificate 6 diverse specie di pesce palla: *Lagocephalus sceleratus*, *Lagocephalus suezensis*, *Lagocephalus guartheri*, *Lagocephalus lagocephalus*, *Torquigener flavimaculosus* e *Sphoeroides pachygaster* (Fig. 26).

Dimostrazione dell'espansione del fenomeno di migrazione lessepsiana, soprattutto da parte di *L. sceleratus*, il più diffuso nell'area considerata (da El-Arish a El-Sallum) (Fig. 26).

Nonostante le specie ittiche alloctone rilevate nel Mediterraneo siano, ad oggi, più di 900, i pesci palla ne rappresentano una porzione consistente, tale da renderli tra i colonizzatori di maggior successo. La costa mediterranea egiziana comprende il Canale di Suez e nonostante questo non sia stato l'unica via d'ingresso per giungere nel Mediterraneo da parte delle specie tropicali (non va dimenticato lo stretto di Gibilterra e le varie attività di trasporto marino), esso rappresenta forse il passaggio principale per molte specie esotiche provenienti dal Mar Rosso e dalla regione dell'Indo-Pacifico.

I pesci palla considerati nello studio condotto in Egitto sono stati catturati a diverse profondità (tra 5 e 150m) e in diversi tipi di fondali (sabbioso, roccioso e fangoso).

Delle 6 specie di pesce palla non autoctone rilevate, 4 sono state dichiarate specie migratorie lessepsiane (*L. sceleratus*, *L. suezensis*, *L. guentheri* e *T. flavimaculosus*), mentre le restanti (*S. pachygaster* e *L. lagocephalus*) si è ritenuto abbiano agito come colonizzatori atlantici giunti attraversando lo stretto di Gibilterra (Mahmoud et al., 2016).

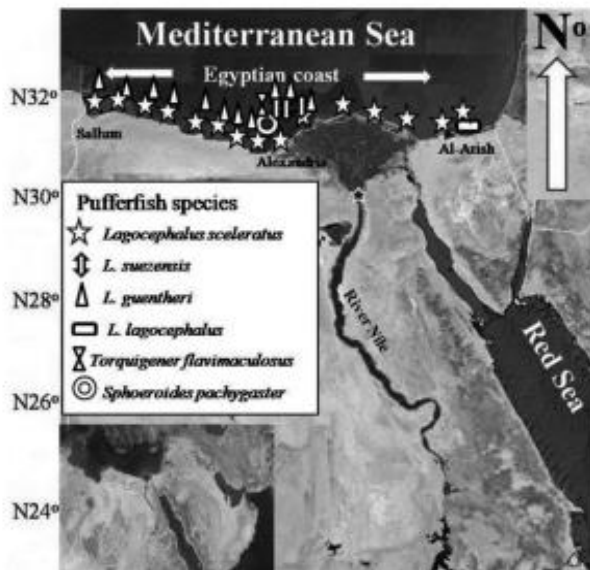


Fig. 26) Mappa dei luoghi di cattura delle specie di pesce palla (*L. sceleratus*, *L. suezensis*, *L. guentheri*, *L. lagocephalus*, *T. flavimaculosus* e *S. pachygaster*) da parte di imprese di pesca commerciali e la loro distribuzione lungo la costa mediterranea. (Mahmoud et al., 2016)

Facendo riferimento ad un altro studio sperimentale, condotto da Guardone et al. (2018), sono stati confermati più di 111.079 ritrovamenti di 3 specie di Tetraodontidi all'interno del Mar Mediterraneo: 110.237 esemplari di *L. sceleratus* (dal 2003), 126 di *L. lagocephalus* (dal 1878) e 716 di *Sphoeroides pachygaster* (dal 1979). In valori percentuali di frequenza di rilevamento: *L. sceleratus* (99.2%), *L. lagocephalus* (0.1%) e *S. pachygaster* (0.1%), confermando *L. sceleratus* come la specie più invasiva tra quelle considerate, presumibilmente grazie alla sua spiccata capacità di adattamento e tolleranza ad habitat eterogenei.

Tali valori sono però piuttosto differenti da quelli che si otterrebbero se si considerassero esclusivamente i ritrovamenti a livello delle coste italiane. In quest'area più limitata sono stati individuati 687 esemplari, di cui 92 (13,4%) *L. sceleratus*, 30 (4,4%) *L. lagocephalus* e 565 (82,2%) *S. pachygaster* (Fig. 27).

Da questo si può capire come sia *S. pachygaster* ad avere il primato nei mari italiani e non *L. sceleratus*.

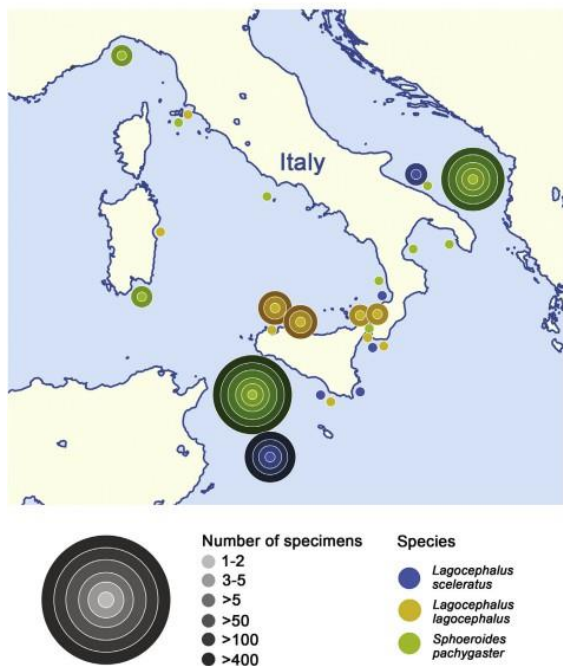


Fig. 27) Distribuzione geografica dei rilevamenti italiani di *L. scleratus* (bersaglio blu), *L. lagocephalus* (bersaglio giallo) e *Sphaeroides pachygaster* (bersaglio verde). Il diametro è riferito al numero di esemplari pescati (Mahmoud et al., 2016)

Lagocephalus scleratus

Secondo Guardone et al. (2018) il primo rilevamento confermato presso le coste italiane è avvenuto a Lampedusa nel 2013. Successivamente ne sono avvenuti altri in diverse zone: nelle coste pugliesi presso Bari (2013), in Sicilia e vicino a Trani (Puglia) (2014), in Calabria (2016), ed uno a Molfetta (Puglia) (2017).

È stato osservato un andamento stagionale di ritrovamenti, con maggior frequenza in autunno e in inverno. Probabilmente per il comportamento che questa specie ittica ha durante la vita adulta. Sembra che in autunno e inverno essa prediliga vivere in prossimità delle coste, favorendone così la cattura da parte di pescherecci, mentre sia pelagica nel resto dell'anno.

Lagocephalus lagocephalus

Per Guardone et al. (2018) vi sono stati 30 ritrovamenti riguardanti l'Italia: 23 sono avvenuti in Sicilia tra il 1999 e il 2004, 5 ritrovamenti sono avvenuti in Calabria tra il 2007 e il 2012, 1 nel 2014 nei pressi dell'Isola d'Elba ed 1 è avvenuto nel 2015 nel Golfo di Orosei (Sardegna).

I ritrovamenti italiani di *L. lagocephalus* rappresentano il 24% del totale rilevato nel Mediterraneo e si concentrano tra Sicilia, Calabria, Toscana e Sardegna.

Come per *L. scleratus*, anche in *L. lagocephalus* si è riscontrata una certa stagionalità, con prevalenza in autunno e inverno.

Sphoeroides pachygaster

Per quanto riguarda questa specie, Guardone et al. (2018) affermano che l'Italia rappresenta la zona in cui è più diffusa, con un totale di 565 segnalazioni (78,9% del totale del Mediterraneo). Essa è stata riscontrata in Liguria, nel sud della Sardegna, in Sicilia, nel mar Ionio, nei pressi dell'Isola d'Elba ed Anzio (Lazio) tra il 1990 e il 2008.

Più recentemente ci sono stati ritrovamenti avvenuti nello Stretto di Messina e a Falconara Albanese (Calabria).

Le regioni coinvolte comprendono dunque: Sicilia, Sardegna, Liguria, Toscana, Lazio, Puglia e Calabria.

Per *S. pachygaster* nessuna evidenza ha potuto indicare un andamento stagionale nel suo rilevamento.

Nonostante *S. pachygaster* sia anche proveniente dall'Atlantico, è probabile che esso sia giunto tramite processi migratori precedenti alla migrazione lessepsiana tramite lo stretto di Sicilia e quindi antecedentemente al primo ritrovamento registrato nel Mediterraneo. Tale area sarebbe stata poi il centro da cui sarebbe iniziata una sua più larga diffusione.

A partire dal 2003, le segnalazioni della specie sono tuttavia in diminuzione, forse per la particolare "cattura" di *S. pachygaster* collaterale ed accessoria ad altre specie ittiche. Successivamente alla pesca, infatti, *S. pachygaster* viene comunemente rigettato in mare, anche se lo stress e l'eccessivo rigonfiamento corporeo successivo alla cattura comporterebbe la mortalità del 100% degli esemplari (Guardone et al., 2018).

Collected data	<i>Lagocephalus scleratus</i>	<i>Lagocephalus lagocephalus</i>	<i>Sphoeroides pachygaster</i>
First report in the Mediterranean sea	2003	1878	1979
Number of individuals recorded since the first report	110237	126	716
Number of individuals recorded since 2003	110237	110	104
- % of the number of records since 2003 over the total number of records since the first Mediterranean report	100.0%	87.3%	14.5%
Number of individuals reported from Italian waters	92	30	565
- % of the Italian records over the total number of records for each species	0.08%	23.8%	78.9%
Number of references:			
- n total	72	31	52
- n scientific articles	51	13	42
- n from databases	19	16	9
- n from others sources	2	2	1
Type of record			
- n caught (%)	109595 (99.4%)	115 (94.3%)	694 (99.7%)
- n observed (%)	620 (0.6%)	0 (0%)	1 (0.1%)
- n stranded (%)	0 (0%)	7 (5.7%)	1 (0.1%)
- n total	110215	122	696
Fishing method			
Commercial fishing gears ³	99.6%	86.1%	100%
recreational fishing gears	0.4%	13.9%	0%
n	1261	78	617
Total length range	50-830 mm (n = 55043)	50-765 mm (n = 97)	85-540 mm (n = 497)
Average total length	445.0 mm (SD 154.8 mm) (n = 71)	536.5 mm (SD 83.0) (n = 77)	284.1 mm (SD 125.1 mm) (n = 80)
Weight range	5-5600 g (n = 51964)	100.5-3783 g (n = 72)	41.9-2640 g (n = 58)
Average weight	1823.9 g (SD 1270.3 g)(n = 60)	1618.2 g (SD 687.9 g) (n = 72)	1075.3 g (SD 720 g) (n = 41)
Depth range	2-400 m (n = 64904)	1-200 m (n = 17)	22-400 m (n = 625)
Average depth of capture or observation	24.1 m (SD 18.5 m)(n = 60)	25.1 m (SD 33.5 m)(n = 8)	149.3 m (SD 91.3 M)(n = 44)
Type of seabed			
- sandy n (%)	21207 (34.3%)	2	3 (14.3%)
- seagrass n (%)	14999 (24.2%)		
- rocky n (%)	13914 (22.5%)		
- muddy n (%)	11754 (19.0%)		6 (28.6%)
- muddy/sandy n (%)			7 (33.3%)
- seagrass/stones n (%)			4 (19.0%)
- mud/stones n (%)			1 (4.8%)
- n	61874	2	21

Fig. 28) Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti per le tre specie di pesce palla prese in esame (Guardone et al., 2018).

Allo scopo di centralizzare tutte le informazioni relative alla migrazione di specie invasive e creare un database che potesse essere disponibile a tutta la comunità scientifica, è stato creato l'European Alien Species Information Network (EASIN-lit geodatabase) da parte della Comunità europea. Tuttavia, i dati riguardanti le specie marine invasive del Mar Mediterraneo, giunti tramite lo stretto di Gibilterra, sono ancora molto scarsi o incompleti (Trombetti et al., 2013).

Non è chiaro come si evolverà questo processo in futuro, che dovrebbe richiedere un continuo monitoraggio. La principale problematica è legata al fatto che le migrazioni di specie non autoctone possono causare cambiamenti profondi nelle comunità marine indigene, in termini di diffusione di popolazione, oltre che comportare possibili processi di ibridazione.

L'insediamento di così tante specie non indigene tropicali nel Mediterraneo suggerisce che le condizioni ambientali siano diventate più adatte alla loro crescita, riproduzione e sopravvivenza rispetto a quelle autoctone, avendo offerto agli alieni vari vantaggi per competere con quest'ultime in modo molto efficace.

Oltre a minare la biodiversità, i Tetraodontidi sono accumulatori di una delle più letali tossine marine, la TTX, con rischi sulla salute e l'economia delle popolazioni che si affacciano sulle coste del Mediterraneo (Mahmoud et al., 2016).

Il principale rischio coinvolge coloro che lavorano nella filiera ittica, i quali, nonostante le campagne di informazione, potrebbero non essere adeguatamente a conoscenza della presenza nelle aree di pesca di esemplari di Tetraodontidi, oppure non essere in grado di riconoscere le caratteristiche morfologiche di tali pesci e dunque evitarli (Al-Sulaimani et al., 2022). Se i pesci palla catturati non venissero immediatamente identificati al momento della pesca, ma mescolati insieme agli altri esemplari potrebbero essere messi in commercio e sfuggire anche alle attività di ispezione veterinaria, comportando un grave rischio sanitario. Inoltre i processi di lavorazione previsti dalla filiera ittica (decapitazione, depinnazione, asportazione della pelle, ecc.), oltre a rendere il pesce palla ancor più difficilmente riconoscibile, potrebbero causare contaminazioni collaterali di altri prodotti lavorati nei medesimi stabilimenti (Guardone et al., 2018).

Oltre a questi eventi involontari, non si può certo non considerare la vendita illecita di pesci palla, come accade talvolta in paesi particolarmente indigenti, dove la popolazione non potrebbe permettersi di non utilizzare parte del pescato.

In altri casi c'è la volontà da parte del commerciante di commettere una frode alimentare, spacciando tranci di pesci palla più economici per "Coda di rospo", il pregiato taglio di pesce ottenuto dalla Rana pescatrice (*Lophius piscatorius* e *Lophius budegassa*) senza essere cosciente del pericolo che potrebbero comportare le sue azioni (Bonardi, 2019).

3.1.2 La frode di sostituzione del pesce palla

La definizione di "frode alimentare" comprende la produzione, detenzione, commercializzazione, vendita o somministrazione di prodotti alimentari non conformi a quanto previsto dalla legge vigente. Essa poi può essere suddivisa in due categorie:

1. Frode commerciale: comprende tutte le azioni fraudolente sugli alimenti o sulle loro confezioni che, pur non determinando un effettivo o immediato nocumento per la salute pubblica, favorisce profitti illeciti a danno del consumatore.
2. Frode sanitaria: azione fraudolenta più grave per il fatto che essa comporta un'alta probabilità o la vera e propria certezza di procurare un danno alla salute dei cittadini. In questa categoria ricade proprio la vendita o la somministrazione di specie velenose spacciate per altre normalmente commercializzabili. Tale tipo di frode alimentare costituisce un reato, che viene giudicato e sanzionato secondo quanto previsto dal Codice penale della Repubblica Italiana Libro II, Titolo VI, art. 444 "*Chiunque detiene per il commercio, pone in commercio, ovvero distribuisce per il consumo sostanze destinate all'alimentazione, non contraffatte né adulterate, ma pericolose alla salute pubblica, è punito con la reclusione da sei mesi a tre anni e con la multa non inferiore a euro 51. La pena è diminuita se la qualità*

nociva delle sostanze è nota alla persona che le acquista o le riceve” (La Castellana, 2014; Codice penale della Repubblica Italiana, 2024).

Questi episodi sono essenzialmente da ricondursi al fatto che quando il pesce palla viene decapitato, eviscerato e spellato è molto difficile da distinguere dall’analoga preparazione di rana pescatrice, con la quale può facilmente essere scambiato.

In Italia nell’estate del 1977 furono registrati 10 casi di intossicazione (sette a Iesolo e tre a Roma) di cui tre mortali. Venne scoperto che tutti gli episodi erano da collegarsi al consumo di alcuni tranci di pesce palla dorato (*Lagocephalus inermis*) presenti all’interno di una partita di code di rospo o rana pescatrice (*Lophiumus setigerus*) congelate provenienti da Taiwan (Mengoli, 2016).

Un episodio simile che coinvolse 3 persone, si verificò l’anno successivo in provincia di Pavia (Mengoli, 2016).

Il Ministero della Sanità il 13/05/1983 emanò la Circolare n. 48. In essa si prevedeva il divieto di importazione di “code di rospo” provenienti dalla Cina e si ridefiniva la disciplina dell’importazione dagli altri Paesi. Inoltre, venne resa disponibile una tabella di comparazione dei caratteri anatomici dei Tetraodontidi e della rana pescatrice al fine di poterli distinguere più facilmente qualora anche fossero privati della testa.

È opportuno ricordare che l’identificazione potrebbe essere più semplice qualora le rane pescatrici venissero lavorate effettuando il taglio della coda davanti ai 3 raggi dorsali liberi, invece che effettuarlo, come avviene solitamente, dietro ad essi.



Rana Pescatrice (Mengoli, 2016).



Pesce palla (Mengoli, 2016).

Rana pescatrice (<i>Lophius piscatorius</i>)	Pesce palla (Fam. Tetraodontidae)
Tre raggi spinosi filiformi liberi, uniti solo alla base da una breve membrana e situati davanti alla pinna dorsale principale.	Assenza raggi spinosi davanti alla pinna dorsale.
Frangie di appendici carnose lungo la linea laterale, al confine tra la zona dorsale scura e la zona ventrale chiara del corpo.	Assenza di appendici carnose (linea laterale indistinta).
Pelle del corpo completamente liscia (senza scaglie).	Pelle con un numero variabile di corte spine nella zona antero-dorsale del corpo.
8 raggi nella pinna caudale.	11 raggi nella pinna caudale.
La metà distale dei raggi mediani della pinna caudale è divisa in 2-4 ramificazioni.	I raggi mediani della pinna caudale, divisi fin dalla base, danno luogo gradualmente a 8 o più ramificazioni.
L'esame radiografico evidenzia un'immagine a "x" nella struttura interna dei corpi vertebrali di forma quadrangolare (Fig. 29a).	L'esame radiografico evidenzia un'immagine ad archi contrapposti nella struttura interna dei corpi vertebrali di forma rettangolare (Fig. 29a).

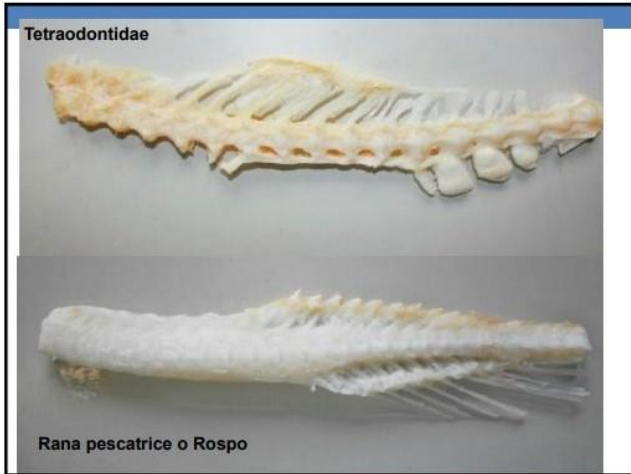


Fig. 28) Struttura ossea vertebrale dei Tetraodontidi (in alto) e della rana pescatrice (in basso) (Bonardi, 2019).



Fig. 29a) Immagine radiografica delle vertebre di una rana pescatrice (in alto) e di un Tetraodontide (in basso) (Bonardi, 2019).

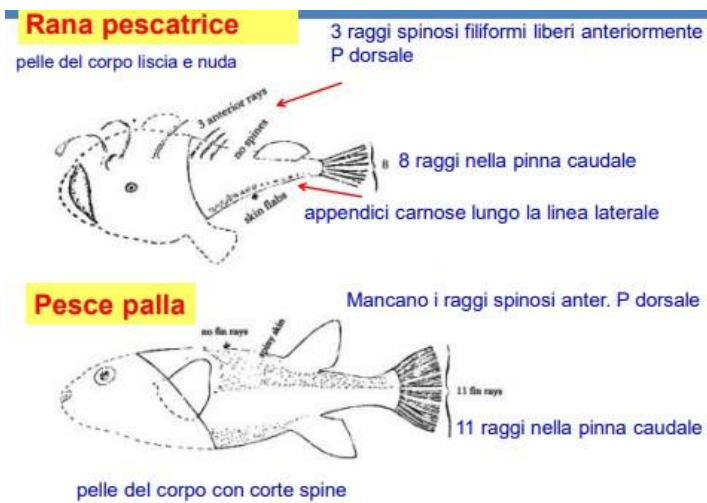


Fig. 29b) principali differenze morfostrutturali tra la rana pescatrice e i Tetraodontidi (Bonardi, 2019).

Una metodica pratica ed efficace per distinguere una coda di rospo da un trancio di pesce palla, è quella di verificare la presenza di appendici carnose sulla pelle lungo la linea laterale, tra la zona dorsale più scura e la zona ventrale più chiara, presenti nella rana pescatrice, ma assenti nei pesci palla (Fig. 30). Questo però prevede che il pesce non sia stato precedentemente spellato o almeno presenti ancora una parte della pelle nella zona craniale della pinna caudale (Fazio, 2022).



Fig. 30) Appendici carnose cutanee lungo la linea laterale, al confine tra la zona dorsale scura e la zona ventrale chiara del corpo della rana pescatrice (Spelta, 2024)

Il tasso di mortalità in corso di intossicazioni da TTX è del 5,7%, perciò molto più elevato rispetto alla maggior parte delle intossicazioni alimentari (Katikou, 2019).

La European Food Safety Authority (EFSA) ha recentemente stabilito il livello di sicurezza per la TTX nella carne di pesce palla, tale da non essere tossico per la salute umana. Tale valore deve essere inferiore a $0,044\mu\text{g/g}$ di prodotto ittico (Al-Sulaimani et al., 2022).

In ogni caso è proibita dalla legislazione europea e nazionale italiana la vendita, in qualsiasi ambito, di pesci velenosi appartenenti alle Famiglie dei Tetraodontidae, Molidae, Diodontidae e Canthigasteridae. Tuttavia questo divieto non ha eliminato completamente i casi di intossicazione dovuti al consumo accidentale di pesci palla.

CAPITOLO IV

4.1 IL GIAPPONE E LA CULTURA DEL FUGU

4.1.1 Introduzione generale

Oggi il consumo dei pesci appartenenti alla Famiglia Tetraodontidae è vietato per legge in molti paesi a causa della sua nota pericolosità. In Italia il divieto era in vigore dal 1992, poi ribadito anche a livello europeo come previsto dal Regolamento (CE) N° 854/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano, cit. *“Capo II: Controlli ufficiali sui prodotti della pesca (omissis)...g.) prodotti della pesca velenosi - i controlli sono tesi a verificare che i seguenti prodotti della pesca non siano immessi sul mercato:*

- 1. non sono immessi sul mercato i pesci velenosi delle seguenti famiglie: Tetradontidae, Molidae, Diodontidae e Canthigasteridae;*
- 2. i prodotti della pesca contenenti biotossine, quali ciguatera o altre tossine pericolose per la salute umana etc.”*

Allo stesso modo negli Stati Uniti d'America la commercializzazione e il consumo di tale pesce è stato vietato senza che venisse accettata la richiesta di licenza di vendita da parte del Giappone. Il Giappone è infatti proprio uno di quei paesi, oltre a Cina e Taiwan, in cui il pesce palla viene apprezzato come prelibatezza di cui poter godere in diversi locali specializzati (Katikou et al., 2022).

In Giappone il pesce palla è chiamato generalmente “Fugu”, sebbene vi siano numerose altre denominazioni in base alla località in cui ci si trova:

- Nella città di Shimonoseki e nella zona del Kita-kyushu è usualmente nominato “Fuku”, per un motivo esclusivamente fonetico dal momento che la parola *fugu* potrebbe ricordarne una omofona che ha il significato di “storpio” o “sfortuna”; al contrario *fuku* è di più buon auspicio avendo il significato di “buona sorte” (Ueno e Sakamoto, 2004).
- Ad Osaka , si chiama "teppou", essenzialmente si tratta di un gioco di parole avendo tale termine anche il significato di "colpito da un proiettile" o "muori se colpito" (Japan fish study group, 2002) .

4.1.2 Il pesce palla nella storia del Giappone

Il legame dal punto di vista gastronomico e culinario tra il Giappone e i pesci palla, nonostante il ben noto pericolo che ciò può comportare, ha radici lontane. Sono stati ritrovati resti di pesce palla nel sito archeologico “Satohama shell midden”, essenzialmente costituito da cumuli di conchiglie e

altri prodotti alimentari risalenti ad un insediamento umano del periodo Jomon (dal 10.000 a.C. al 300 a.C).

Sempre datate nello stesso periodo, presso Ubayama sono state trovate le spoglie di cinque persone, residenti nella medesima abitazione, morti contemporaneamente probabilmente per un avvelenamento da TTX, essendo state ritrovate anche lische di pesce palla nella loro abitazione (Cultural Heritage online, 2016).

Durante il periodo Azuchi-Momoyama (1573-1603), al tempo dell'amministrazione del comandante militare e signore feudale Toyotomi Hideyoshi (1537-1598), i soldati inviati in Corea spesso morivano per avvelenamento da pesce palla e proprio per questo Hideyoshi ne vietò prontamente il consumo.

Anche successivamente al cambio di governo in favore del clan Tokugawa (1603-1868), ai membri delle famiglie di samurai era fatto divieto di mangiare pietanze a base di pesce palla. Qualora il capofamiglia fosse morto per aver trasgredito a tale prescrizione, sarebbe stato oscurato il nome della sua famiglia ed egli sarebbe stato considerato come "una persona che aveva sacrificato inutilmente la sua vita che invece avrebbe dovuto dedicare completamente a quella del suo signore". Tuttavia questa sanzione veniva imposta solo alle famiglie di samurai e la gente comune continuava a farne frequente consumo.

Il divieto venne esteso per un breve lasso di tempo anche nella zona di Edo (l'antica denominazione dell'odierna Tokyo) durante il medesimo periodo e venne proibito anche durante il "Periodo illuminato" Meiji (1867-1912) secondo una legge promulgata nel 1882. Chi avesse contravvenuto ad essa sarebbe stato imprigionato e multato (Fisheries industry fugu, 2014).

In seguito, e in modo progressivo ne venne poi nuovamente permesso il commercio e consumo nelle diverse prefetture giapponesi.

Le prime norme specificatamente riferite al consumo e alla preparazione del pesce palla furono emanate dalla Prefettura di Osaka nel 1948 (Showa 23) nell' "Ordinanza sul controllo delle vendite del pesce palla" (Ordinanza della Prefettura di Osaka n. 55 del 1948).

In Giappone il fugu è proprio una specialità della città di Osaka, dove viene consumato circa il 60% del pescato nazionale di pesce palla e dove gli è stato dedicato addirittura un piccolo museo. Altrettanto nota come area di accumulo e produzione di fugu in Giappone è anche la città di Shimonoseki nella prefettura di Yamaguchi. Il pesce palla viene catturato nelle acque circostanti la costa su cui si affaccia questa città portuale, che è considerata sia la patria del pesce palla, sia il primo luogo in cui il divieto di mangiare pesce palla fu revocato durante il periodo Meiji (il primo ristorante di pesce palla autorizzato fu un locale di nome "Shunpanro"). Da allora, molti ristoranti di

pesce palla hanno aperto in questa zona, e molti degli attuali piatti a base di pesce palla sono stati creati proprio lì.

Vi sono diverse specie commestibili che vivono nelle acque intorno al Giappone, per cui il Ministero della Salute, del Lavoro e delle Politiche sociali giapponese ha dichiarato che 21 “non sono a rischio di nuocere alla salute umana attraverso la lavorazione ecc...” (Fisheries industry fugu, 2014). La specie più apprezzata è il pesce palla tigre (*Takifugu rubripes*) e, vista l’alta richiesta di mercato, viene usualmente allevato, risultando distinguibile dal suo corrispondente selvatico per la presenza di pinne caudali più corte e di un colore più giallastro.

Di seguito, una descrizione delle caratteristiche principali del Pesce palla tigre (*Takifugu rubripes*) (Fig. 31) e distinzione tra le sue parti anatomiche giudicate commestibili (O) o tossiche (—), secondo quanto previsto dal Ministero della Salute, del Lavoro e del Benessere del Giappone (2005).



Fig. 31) Pesce palla tigre (*Takifugu rubripes*) (Ministero della Salute, del Lavoro e del Benessere del Giappone, 2005)

Nome comune	Pesce palla tigre
Nome scientifico	<i>Takifugu rubripes</i>
Lunghezza corporea	Raggiunge oltre 80cm
Caratteristiche fisiche principali	La parte dorsale del corpo è bruno-nerastra con macchie nere sovrapposte. Dietro le pinne pettorali è presente una grande macchia nera bordata di bianco. La pinna anale è bianca. Sono presenti piccole spine sul dorso e sull’addome.
Localizzazione geografica	Mar del Giappone, Mar Giallo e Mare Cinese Orientale

Parte anatomica	Fegato	Ovaia	Testicolo	Pelle	Muscolo	Intestino
	—	—	O	O	O	—

La produzione di pesce palla tramite acquacoltura è aumentata rapidamente dopo il 1991, quando l'allora "Fisheries Agency" ha adottato una politica indirizzata a promuoverne l'allevamento e i governi locali hanno creato aree dedicate, come avvenuto nella Prefettura di Kumamoto.

In Giappone il pesce palla è anche di importazione e nel 2002 la quantità importata dall'estero ha superato per la prima volta la produzione nazionale. Di questo il 99% proveniva dalla Cina, mentre il restante 1% dalla Corea del Sud (Divisione investigativa e statistica della dogana di Moji, 2003). La spiegazione è legata all'implementazione delle tecniche di allevamento dei pesci palla anche in questi paesi e al basso costo di vendita. Essendosi però verificati problemi di sicurezza alimentare quali contaminazione di filetti di rana pescatrice cinese con TTX di pesce palla, l'importazione è stata in parte abbandonata.

È sicuramente curioso come un alimento tossico come il pesce palla sia però tanto ricercato e apprezzato, al punto da rischiare la vita pur di assaggiarlo.

In Giappone, paradossalmente, il fugu può essere gustato da tutti i suoi cittadini, eccezion fatta per l'Imperatore, al fine di non metterne a rischio l'incolumità.

Oggi grazie ad una specifica legislazione e ad accortezze applicate in modo sistematico durante la sua preparazione si è osservata una considerevole riduzione dei casi di intossicazione e ancor di più dei decessi, sebbene possano ancora accadere. Generalmente questi ultimi sono legati a cucina amatoriale da parte di persone non in grado di distinguere il pesce palla da altre specie non tossiche o per inesperienza nella lavorazione delle sue carni, processo che è previsto segua una metodica codificata. Infatti, dato che le parti commestibili variano a seconda della specie, il giudizio amatoriale, la manipolazione e la cottura del pesce palla da personale non esperto sono rischiosi (Fazio, 2022).

Se all'inizio del 1900 i decessi da TTX erano nell'ordine del centinaio all'anno, una recente stima ha dichiarato che tra il 1995 e il 2010 i casi di intossicazione da fugu in Giappone siano scesi notevolmente, oscillando tra i 20 e i 44 casi all'anno, con un tasso di mortalità tra lo 0% e 13,6% (Al- Sulaimani et al., 2022).

4.1.3 Pesce palla pescati in Giappone e riconosciuti come privi di rischio per la salute umana

La tabella sottostante è stata realizzata in base ai risultati di uno studio condotto dal Toxic and Shellfish Review Committee nel 2005, per cui le specie mancanti potrebbero essere state aggiunte successivamente.

Queste prescrizioni sono applicabili esclusivamente alle specie di pesce palla catturate nel Mar del Giappone, nel Mar di Bohai, nel Mar Giallo e nel Mare Cinese Orientale.

Le parti indicate con il simbolo “O” sono commestibili, quelle indicate con “—” sono tossiche.

Qualora il pesce palla catturato sia ermafrodita, le gonadi devono essere considerate come tossiche.

La parte anatomica indicata come “muscolo” comprende anche la struttura scheletrica; quella indicata come “cute” comprende anche le pinne.

Specie	Parte anatomica	Parte anatomica	Parte anatomica
	Muscolo	Cute	Gonadi
Kusafugu (<i>Takifugu niphobles</i>)	O	—	—
Pesce palla comune (<i>Takifugu poecilonotus</i>)	O	—	—
Pesce palla Higan (<i>Takifugu pardalis</i>)	O	—	—
Shosaifugu (<i>Takifugu snyderi</i>)	O	—	O
Pesce palla viola (<i>Takifugu porphyreus</i>)	O	—	O
Mefugu (<i>Takifugu obscurus</i>)	O	—	O
Pesce palla rosso (<i>Takifugu chrysops</i>)	O	—	O
Pesce palla tigre (<i>Takifugu rubripes</i>)	O	O	O
Pesce palla corvo (<i>Takifugu chinensis</i>)	O	O	O
Pesce palla striato (<i>Takifugu xanthopterus</i>)	O	O	O
Pesce palla al sesamo (<i>Takifugu stictonotus</i>)	O	—	O
Kanafugu (<i>Lagocephalus inermis</i>)	O	O	O
Pesce palla sgombro bianco (<i>Lagocephalus wheeleri</i>)	O	O	O
Pesce palla sgombro nero (<i>Lagocephalus guantieri</i>)	O	O	O
Yoritofugu (<i>Sphoeroides pachygaster</i>)	O	O	O
Sansaifugu (<i>Takifugu flavidus</i>)	O	—	—

4.1.4 Prescrizioni legislative giapponesi relative al pesce palla

In Giappone è stato stabilito già molto prima che in Europa. Il limite di sicurezza per quanto riguarda la concentrazione della TTX.

Le metodiche di analisi e la quantificazione delle tossine del pesce palla sono fornite nelle “Linee guida per l'ispezione sanitaria degli alimenti”, edizione di fisica e chimica (Japan Food Sanitation Association, 2005).

In Giappone per definire tale limite era prevista la somministrazione per via intraperitoneale in topi da laboratorio di una soluzione di prova, riscaldata ed estratta con acido acetico da un campione di tessuto di pesce palla. La dose tossica era stata misurata convertendola in una singola MU (mouse unit) in base al periodo di tempo precedente la morte del topo. Per quanto riguarda il veleno del pesce palla ci si era basati sul metodo ufficiale (metodo di riferimento), che definiva come 1 MU la quantità di veleno che avrebbe ucciso un topo del peso di 20 g in 30 minuti.

Il limite fissato era quindi di 10 MU (mouse unit)/g, equivalenti a 2000µg TTX/kg di tessuto di pesce palla (1MU = 0,2 µg TTX/g) ed ogni prodotto che lo superava era considerato non idoneo al consumo.

I metodi di rilevamento della fluorescenza HPLC (High Performance Liquid Chromatography), LC-MS (Liquid Chromatography- Mass Spectrometry) o LC-MS/MS (Liquid Chromatography- tandem Mass Spectrometry) erano e sono invece comunemente usati per analizzare i componenti tossici (Japan Food Sanitation Association, 2005).

Secondo la legge giapponese sull'Igiene alimentare “Food sanitation law” (legge N° 233 del 1945), all'Articolo 6, Comma 2, viene fatto divieto di vendita di pesce palla non trasformato a consumatori generici.

4.1.5 Fugu chorishi menkyo

Ciò che però ha realmente ridotto i casi di intossicazione è il fatto che gli chef che aspirano a poter preparare e servire nel proprio locale il fugu sono divenuti professionisti altamente specializzati. Le qualifiche per la gestione del pesce palla non sono standardizzate a livello nazionale, ma sono stabilite da ciascuna prefettura con differenze nei nomi e nei metodi di acquisizione delle stesse.

La Prefettura di Tokyo è nota per la sua severità in tal senso.

Una delle condizioni imprescindibili per poter sostenere l'esame è avere una licenza generale di chef. Prima di poter sostenere la verifica i candidati devono aver seguito un corso di praticantato della durata di 3 anni, al termine del quale ottenere una specifica licenza rilasciata dal Ministero competente, la “Fugu chorishi menkyo”. Già di per sé l'acquisizione della raffinata arte della preparazione del sashimi o del sushi, pietanze giapponesi a base di pesce crudo, si raggiunge dopo

molti anni di pratica e, a maggior ragione, l'abilità di preparare e rendere la carne del fugu innocua e adatta al consumo senza che si corrano rischi di intossicazione. La Fugu chorishi menkyo viene concessa solo dopo il superamento di un lungo e difficile esame comprendente diverse prove, sia scritte che pratiche, durante le quali il candidato dovrà, tra le altre cose, riconoscere oltre 30 specie della Famiglia cui il pesce appartiene. L'esame finale prevede che lo chef mangi il pesce da lui stesso preparato per assicurarsi che sia commestibile.

Questo potrebbe sembrare eccessivo, ma dice molto di quanto possa essere ligia e meticolosa la cultura giapponese in ogni suo ambito.

Sono anche previste punizioni severe sia per lo chef, sia per il locale in cui lavora, qualora le interiora del fugu non vengano rimosse in modo corretto. In questa eventualità il ristorante sarebbe interdetto al pubblico per 1 mese. Se invece per inadempienza il consumo di pesce palla comportasse l'intossicazione e il successivo decesso di una persona, il locale verrebbe chiuso in modo permanente (Fazio, 2022).

4.1.6 Lavorazione del fugu in Giappone in ambito di ristorazione

Un tempo questo pesce veniva servito nei locali solo in inverno durante la sua stagione di pesca, tuttavia col diffondersi degli stabilimenti di acquacoltura, oggi è divenuto reperibile tutto l'anno a prescindere dalla stagionalità.

Il primo e più importante passo della lavorazione del fugu (Fig. 34) prevede che lo chef, adeguatamente qualificato, separi ed elimini le parti tossiche del pesce, in cui la concentrazione di TTX è maggiore, senza causare cross-contaminare di ciò che verrà servito al consumatore. L'ambiente lavorativo deve essere poi adeguatamente sanificato.

Le parti tossiche (Fig. 33) devono essere collocate in appositi contenitori in acciaio, chiusi e sigillati ermeticamente prima che possano essere definitivamente eliminati tra i rifiuti, questo per evitare che animali o persone in cerca di cibo possano pasteggiare con esse. Nella prefettura di Tokyo lo smaltimento prevede che i resti di pesce palla vengano inceneriti nello stabilimento di smaltimento associato al mercato del pesce di Tsukiji e successivamente neutralizzati con soda caustica (Fazio, 2022).

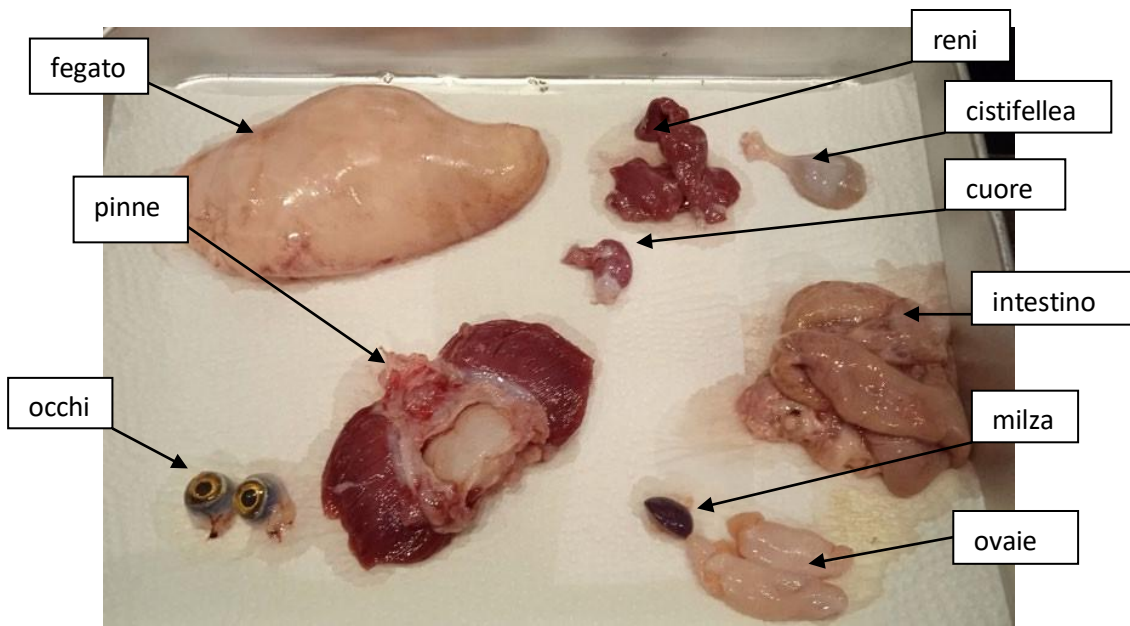


Fig. 33) Parti tossiche di pesce palla (Giannetti, 2023)



Fig. 34) Pasce palla *Takifugu rubripes* (Giannetti, 2023)

4.1.7 Le pietanze a base di pesce palla

- Il sashimi di Fugu “*fugu sashi*” o “*saba*”, è certamente il piatto più popolare in Giappone. La procedura di sfilettatura del pesce o “*sabaku*”, viene eseguita usando un particolare tipo di coltello, detto “*Fugu hiki*”. Le delicate e sottili fettine di pesce vengono solitamente servite in modo coreografico disponendole a raggiera in piatti da portata a formare un disegno che ricorda un crisantemo.



Fig. 35) Saba o sashimi di fugu (Mancuso, 2019).

- Il “*fugu kara-age*” non è altro che fugu marinato, intinto in una densa pastella e fritto.



Fig. 36) Fugu kara-age o frittura di fugu (Giannetti, 2023).

- Lo “*Hire-zake*” invece è un piatto a base di pinne di pesce palla fritte e immerse nel sakè caldo.



Fig. 37) “*Hire-zake*” o fugu e sakè. (Saketalk.it, 2020)

- Nel “*Te-chiri*” il fugu viene bollito insieme a vari ortaggi di stagione (Fazio, 2022).



Fig. 38) “*Te-chiri*” o Stufato di fugu (Giannetti, 2023).

- Esistono anche particolari pietanze a base di pesce palla per le quali, utilizzando specifici metodi di lavorazione (Fig. 39), si è riusciti a raggiungere un livello di disintossicazione tale da renderle edibili. Tra queste abbiamo le ovaie di fugu giapponese marinate nella crusca di riso o fecce di sakè, rispettivamente “*Nukazuke*” e “*Kasuzuke*” (tecniche di fermentazione giapponesi per la produzione di diversi tipi di sott’aceto). Tuttavia, il motivo per cui il veleno contenuto in esse si riduca, non è legato ad una effettiva inattivazione della tossina quanto ad una diffusione della stessa dalle ovaie fin nella vasca di raccolta durante la marinatura con sale e crusca di riso. A tal proposito è stato condotto nel 2013 uno studio da alcuni ricercatori giapponesi, con a capo il Dr. Anraku presso l’Università di Scienze della Salute di Kumamoto e il Kumamoto Kinoh hospital. Essi hanno confrontato dapprima la concentrazione di TTX contenuta nelle ovaie prelevate da esemplari femmine di *Takifugu stictonotus* prima e dopo la procedura di marinatura e poi la concentrazione della tossina contenuta nelle ovaie marinate e nel muscolo fresco di *Takifugu rubripes* (Fig. 40). Non solo il livello di TTX nelle ovaie era sceso da 1/50 ad 1/90 rispetto a quello iniziale, ma la sua concentrazione era molto vicina a quella del muscolo fresco di *T. rubripes* (notoriamente commestibile). Tutto ciò a dimostrazione dell’efficacia della procedura di lavorazione per rendere edibili parti del pesce palla, che sarebbero in altro caso molto tossiche (Anraku et al., 2013).

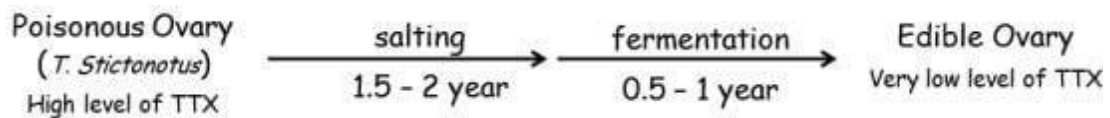


Fig. 39) Fasi del processo di marinatura delle ovaie di pesce palla per renderle adatte al consumo umano (Anraku et al., 2013)

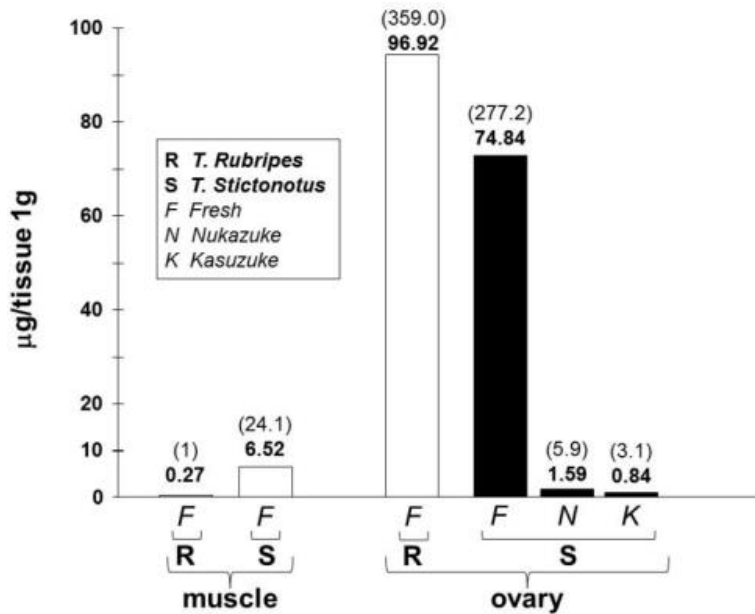


Fig. 40) Quantità di estratti di TTX ($\mu\text{g/g}$) prelevati dal muscolo fresco, dalle ovaie fresche, dalle ovaie “Nukazuke” e “Kusuzuke” marinate di *T. stictonotus* e *T. rubripes*. Il valore tra parentesi indica il rapporto tra la quantità di tossina nei vari campioni considerati e il muscolo fresco di *T. rubripes* (Anraku et al., 2013).

- Il fugu è usato anche per aromatizzare molti cibi popolari in Giappone, oppure il prodotto venduto ne ricorda semplicemente il simpatico aspetto.



Fig. 41) A sinistra è illustrato un biscotto Sablé a forma di fugu, a destra fugu essiccato gustato come snack o per insaporire la famosa zuppa di miso (Giannetti, 2023).

- Si ricorda che il fegato di pesce palla non tossico (poiché allevato secondo specifiche tecniche di acquacoltura) può essere consumato solo nella prefettura di Oita e, se venisse consumato in altre aree, costituirebbe una violazione della legge sull'Igiene alimentare (Food sanitation Law, 1945). Ciò è dovuto al fatto che, se il suo consumo si diffondesse,

dilagherebbe contestualmente anche l'errata percezione che il normale fegato di pesce palla non costituisca un pericolo, portando ad un sicuro aumento del numero di casi di intossicazione (Michinaka.it, 2020).

4.1.8 Celebrità giapponesi decedute per avvelenamento da TTX conseguente al consumo di piatti a base di fugu

Nel corso del tempo diversi noti personaggi giapponesi sono andati incontro ad un avvelenamento letale da TTX dovuto al consumo di pesce palla. Tra questi ricordiamo:

- Isaburo Fukuyagi (11 febbraio 1926), famoso lottatore di sumo che, nella città di Tobata (prefettura di Fukuoka) mangiò un pesce palla preparatogli da un conoscente. Dopo alcune ore dal pasto entrò in coma e morì poco dopo.
- Bando Mitsugoro VIII (16 gennaio 1974), attore kabuki e celebrità nazionale giapponese. Durante un tour a Kyoto mangiò 4 porzioni di fegato di pesce palla morendo avvelenato poco dopo.

La vicenda fece molto discutere anche per il fatto che fu l'attore a richiedere ai cuochi, riluttanti nell'accontentarlo, un quantitativo così alto di tale cibo pur conoscendone i rischi. Si scatenò infatti una controversia mai vista prima di allora di ambito alimentare. Il capo chef venne infine incolpato di negligenza poiché l'esito nefasto della vicenda era prevedibile e dichiarato colpevole in un processo penale (cosa alquanto rara) (Capel, 2022).

4.1.9 Il fugu e l'arte giapponese

In Giappone i richiami al fugu sono presenti anche in ambito letterario e artistico. Il poeta giapponese Yosa Buson (1716 - 1783) raccontò in un poema dell'impossibilità di incontrare la sua amata e di come volesse trovare la morte ingerendo tale pietanza.

Il pesce palla fu reso soggetto principale anche di molte Ukiyo-e, genere di stampa artistica giapponese impressa su carta con matrici di legno, nata e sviluppatasi durante il periodo Edo, tra l'inizio del XVII e la fine del XIX secolo. Tra queste ricordiamo la serie dedicata a tutte le varietà di pesci "Uozukushi" dell'artista giapponese Utagawa Hiroshige (1797-1858).

Il pesce palla viene usato anche in artigianato per via delle caratteristiche di elasticità e spessore della sua pelle. Essa è ottima per realizzare fischietti e lanterne (Fisheries industry fugu, 2014).



Fig. 42) Fugu e la Ricciola giapponese. Utagawa Hiroshige, (1832).

4.1.10 Dati e andamento produttivo annuo di pesce palla *Takifugu rubripes* in Giappone

A scopo di una valutazione statistica è previsto che i dati relativi all'andamento produttivo del pesce palla vengano registrati annualmente.

Fino al 2007, l'andamento di pesca è rimasto pressoché stabile superando le 300 tonnellate annue totali. Successivamente la tendenza ha mostrato segni di diminuzione costante fino al raggiungimento del minimo storico di 158 tonnellate durante la stagione di pesca del 2020 (complice anche la diffusione pandemica del Covid-19). Nel 2021 il quantitativo pescato è stato in leggero aumento, raggiungendo un valore di 190 tonnellate e si suppone che questo andamento possa continuare in futuro. Ad oggi la quantità massima registrata è stata rilevata durante la stagione di pesca del 2002, per un totale di 364 tonnellate.

La prefettura di Fukuoka e la prefettura di Yamaguchi sono quelle con i maggiori valori percentuali medi di cattura di *T. rubripes* (Tabella 5).

Prefettura	Triennio 2013- 2015	Triennio 2014- 2016	Triennio 2015- 2017	Triennio 2016- 2018	Triennio 2017- 2019	Quinquennio 2013-2017	Quinquennio 2014-2018	Quinquennio 2015-2019
Yamaguchi	23,1%	23,0%	26,5%	28,4%	28,2%	24,5%	25,9%	27,1%
Kagawa	4,3%	3,9%	3,4%	2,5%	2,1%	3,8%	3,2%	2,8%
Ehime	6,3%	6,5%	6,2%	6,7%	6,2%	6,3%	6,6%	6,6%
Fukuoka	31,7%	32,7%	30,2%	27,6%	27,7%	30,8%	30,4%	28,7%
Nagasaki	7,6%	7,4%	8,2%	8,8%	7,7%	8,1%	8,0%	7,8%
Kumamoto	3,%	3,4%	3,7%	3,8%	4,2%	3,4%	3,6%	4,0%5,7%
Oita	5,7%	5,9%	5,2%	5,2%	5,5%	5,7%	5,4%	5,4%

Tabella 5) Dati percentuali medi di cattura di pesce palla *T. rubripes* nelle prefetture del Giappone (Ministero dell'Agricoltura, delle Foreste e della Pesca del Giappone, 2021)

Come osservabile dalla Fig. 42b la linea rossa indica l'area giapponese principale di cattura del pesce palla alimentare: Mar del Giappone, Mare interno di Seto, Mare Cinese orientale e Mar Giallo. Con i cerchi in giallo sono evidenziate le aree di deposizione delle uova di *T. rubripes*.

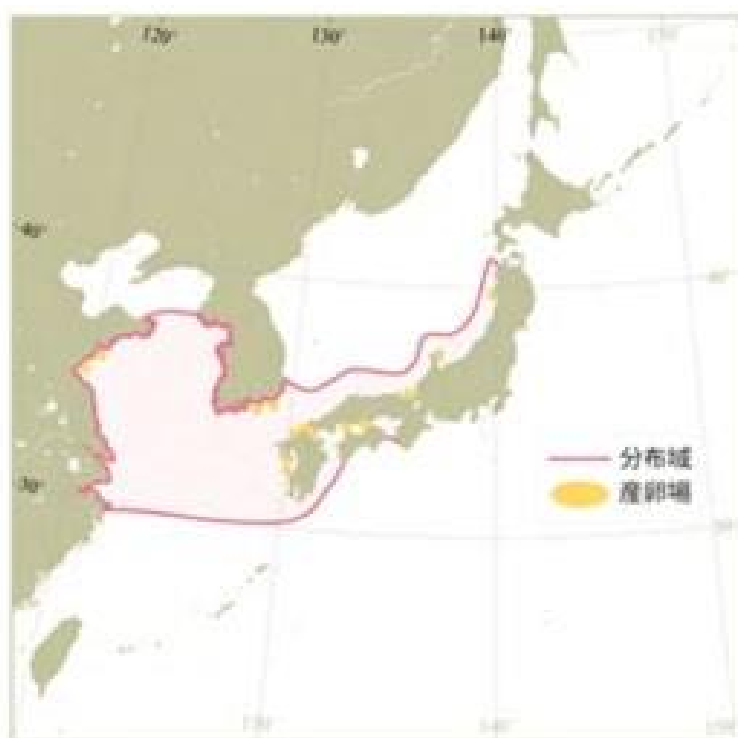


Fig 42b) Area di cattura di *T. rubripes* in Giappone (Ministero dell'Agricoltura, delle Foreste e della Pesca e del Giappone, 2021).

4.1.11 Andamento di mercato del pesce palla tigre *Takifugu rubripes*

In base ai dati raccolti dalla Camera del Commercio della Prefettura di Niigata nel 2016, l'andamento di mercato del pesce palla tigre *T. rubripes* risulta in crisi in molte Prefetture del Giappone, comprese quelle che, da sempre, ne sono state stabili produttrici e consumatrici.

La causa è da addurre a 3 principali motivi:

1. Si sta verificando uno spopolamento di tale specie ittica in molte zone marittime a causa della troppo intensa pressione di pesca esercitata negli ultimi anni.

Per cercare di gestire questa preoccupante situazione e per garantire uno sfruttamento consapevole delle risorse il Ministero dell'Agricoltura, delle Foreste e della Pesca" giapponese sta creando delle campagne di ripopolamento delle coste e allo stesso tempo si intende limitare la pesca del pesce palla tigre, soprattutto da parte di privati. Allo stesso modo si sta cercando di indirizzare la richiesta di mercato anche verso altre specie di pesce palla commestibili come il mafugu (*Takifugu porphyreus*), le quali non riescono ancora a trovare un significativo spazio di vendita, se non limitatamente al periodo invernale. A questo scopo, per stimolare la domanda si stanno iniziando a produrre nella prefettura di Fukuoka prodotti conservati a base di pesce palla come il "mafugu sott'olio. Un altro motivo che spinge a produrre prodotti come semi-conserve è quello di ridurre la deperibilità del prodotto pescato in estate, quando la domanda è molto bassa. In questo modo i lavoratori che rientrano sotto la giurisdizione del "Ministero dell'Agricoltura, delle Foreste e della Pesca" hanno ottenuto un incremento delle vendite per un totale di 7 milioni di yen in 5 anni, un aumento delle catture pari a 20 tonnellate di pesce palla mafugu ed è stata garantita l'occupazione dei lavoratori per tutto l'anno. Le piccole e medie imprese hanno aumentato le vendite con profitto di 85 milioni di yen in 5 anni, mantenimento dell'occupazione durante l'estate e miglioramento della redditività grazie alla produzione esercitata tutto l'anno (Camera del Commercio della Prefettura di Niigata, 2016).

2. Secondo un gruppo di esperti istituito dall'Agenzia per la pesca del Giappone, la temperatura delle acque costiere nipponiche è aumentata di 1,24°C nell'arco di 100 anni fino al dato registrato nel 2022 rappresentando un valore superiore rispetto alla media globale di 0,60°C. Questo ha avuto un impatto non indifferente sui pesci termofili che vivono in queste zone, tra cui i Tetraodontidi. L'aumento generale della temperatura delle acque li sta inducendo a migrare verso zone più a nord, come nella Prefettura dell'Hokkaido (Yomiuri shinbun, 2023).

Proprio questa ha infatti mostrato un andamento completamente opposto rispetto a quello delle altre per quanto riguarda il totale annuale di pescato di *T. rubripes*. Nel 2010 era di sole 84 tonnellate, ma nel 2020 ha raggiunto le 927 tonnellate, con un aumento di quasi 11 volte in 10 anni.

Nel 2010 la prefettura di Hokkaido era al 19° posto in termini di quantità di *T. rubripes* pescata, nel 2020 ha raggiunto il 1° posto.

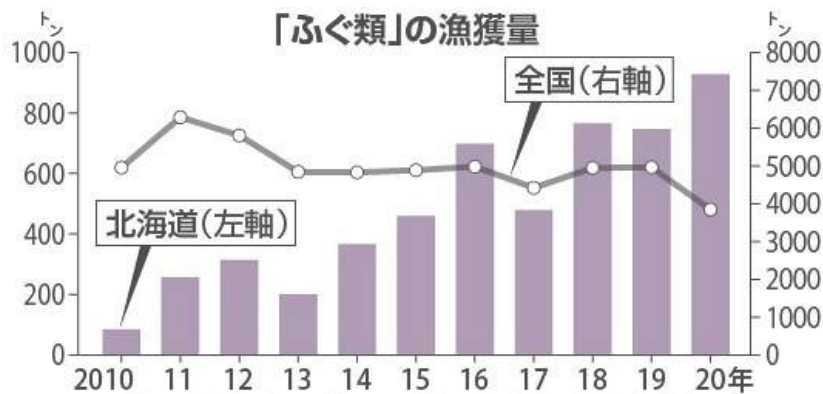


Fig. 46) Nel grafico a barre si osserva l'andamento di pesca (tonnellate/anno) di *T. rubripes* in Hokkaido, con un trend positivo. Nel grafico lineare si osserva invece la media nazionale, che presenta un trend negativo (Giornale regionale della Prefettura dell'Hokkaido, 2022).

3. Il prezzo di vendita del pesce palla tigre di produzione nazionale è molto alto se comparato a quello ben più economico proveniente dalla Cina (Camera del Commercio della Prefettura di Niigata, 2016).

4.1.12 Il pesce palla e la quotidianità del Giappone.

Con queste due foto vorrei dimostrare come il pesce palla sia talmente apprezzato in Giappone, da essere spesso rappresentato in oggetti di uso comune.



Fig. 47) Chiusino ritraente l'immagine di un pesce palla (fugu), città di Shimonoseki (Giannetti, 2024).



Fig. 48) "poggia bacchette" realizzato a forma di pesce palla (Giannetti, 2024).

CONCLUSIONI

Nel presente elaborato sono stati presi in considerazione più aspetti collegati al recente fenomeno di diffusione dei Tetraodontidi, o pesci palla, nel Mediterraneo. I recenti e sempre più evidenti cambiamenti climatico-ambientali avvenuti in tutto il mondo, oltre alle modifiche geofisiche, alla perdita di barriere naturali e alla creazione di nuove vie di ingresso per il mar Mediterraneo ha permesso l'avvio di un processo migratorio da parte di diverse specie ittiche chiamato migrazione lessepsiana. Il fatto che sia ancora oggi tutt'altro che conclusa, sta creando non poca preoccupazione in ambito scientifico-socio-sanitario per tutte le ripercussioni che ne conseguono in termini di danno ambientale, economico e di salute pubblica. Grazie alle spiccate capacità adattative dei Tetraodontidi, si sta osservando una progressiva sostituzione delle specie marine autoctone. Ciò sta minando in modo serio la biodiversità di cui il bacino Mediterraneo è sempre stato importante baluardo. Proprio perché tale fenomeno mostra un andamento progressivo sarebbe opportuno che si mettessero in atto delle più efficaci procedure di monitoraggio da tutti i paesi che si affacciano sul mar Mediterraneo con la creazione anche di un database in cui condividere i dati ottenuti al fine di avere una visione più a lungo raggio dei pesci palla.

L'arrivo dei pesci palla ha contestualmente introdotto nelle nostre aree una nuova e letale tossina, la tetrodotossina o TTX di cui essi ed altre specie animali sono accumulatori.

In questo elaborato è stata fatta una descrizione il più possibile completa delle caratteristiche peculiari dei Tetraodontidi e nello specifico delle specie che più frequentemente sono state rilevate in prossimità delle coste italiane. Tuttavia la conoscenza di queste specie tropicali è ancora lacunosa le metodiche di riconoscimento non sono diffuse, non solo tra i comuni cittadini, ma anche tra il personale addetto alla pesca commerciale, con la conseguente possibilità di comportare una loro accidentale distribuzione anche presso gli esercizi di vendita e mettere a rischio i consumatori.

Nella presente tesi di laurea è stata fatta un'analisi approfondita della tetrodotossina, delle sue caratteristiche chimico fisiche e degli aspetti più importanti che la riguardano in termini di meccanismo d'azione. La tossina è stata ufficialmente riconosciuta in ambito scientifico agli inizi del secolo scorso, solo dopo il suo isolamento effettuato dal Dr. Tahara. È stato messo comunque in chiaro che i suoi effetti erano noti ben prima di questo avvenimento, sebbene non si fosse ancora in grado di associarli ad una particolare molecola, legata ai pesci palla.

La TTX è divenuta recentemente di grande interesse in ambito di ricerca per l'ormai urgente necessità di cercare di sviluppare un antidoto che possa contrastarne efficacemente gli effetti tossici, ma proprio grazie all'approfondimento di questi studi, si è iniziato a sviscerarne le peculiarità e si è cominciato a vedere in essa, grazie al suo meccanismo d'azione, anche una potenzialità terapeutica

per il trattamento di patologie finora trattate con medicinali non sempre efficaci o con gravi effetti collaterali. Quest'ultimo ambito di ricerca è ancora agli albori e non si può dire se e quando effettivamente la TTX verrà mai utilizzata come farmaco ma gli studi ad oggi condotti, sia *in vitro* che *in vivo*, sembrano dare risultati promettenti.

Nella tesi è stata riservata anche una parte a ciò che la mia permanenza di sei mesi in Giappone mi ha permesso di conoscere riguardo al pesce palla o come viene chiamato localmente "fugu". In questo periodo ho osservato in prima persona anche il punto di vista in paesi extra europei. È certamente molto affascinante ed interessante osservare quanto l'approccio sia differente rispetto a quanto fino ad ora condotto in Europa o negli Stati Uniti. Il fatto che i pesci palla contengano il letale principio tossico non ha certo dissuaso il Giappone dal non considerarli un prodotto alimentare molto apprezzato di cui è noto il consumo fin da tempi molto antichi. Potrebbe venire spontaneo chiedersi cosa abbia spinto i giapponesi ed altri come loro a mettere a rischio la vita consumandoli come alimento. Non dobbiamo però dimenticare che proprio questo loro interesse e l'importanza economica che risiede tutt'oggi nel commercio dei fugu ha fatto sì che in Giappone si procedesse con la maggior parte delle ricerche nei riguardi della TTX, del suo meccanismo d'azione, di accumulo nei tessuti dei pesci palla e nella possibilità di ottenere, tramite innovative tecniche di acquacoltura, esemplari privi del principio tossico. Nonostante questo, in Europa e negli Stati Uniti l'importazione e la commercializzazione del pesce palla è ancora vietata e probabilmente lo rimarrà per ancora molto tempo, ma avere una più ampia visione dobbiamo ricordare che se un giorno potremo avvantaggiarci in ambito clinico ospedaliero di un prodotto farmacologico a base di TTX, lo dovremo certamente anche a questo.

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

1. “Enciclopedia degli intenditori di pesce”, casa editrice Kodansha Plus Alpha Bunko, p 173, 2002.
2. “Perché il fegato pesce palla d’allevamento non è consentito”, Michinaka blog, (Ultima modifica 12 febbraio 2020). <https://michinaka.jp/blog/1223>
3. Alguacil, L.F.; Pérez-García, C.; Salas, E.; González-Martín, C.; Castillo, C.; Polanco, M.J.; Herradón, G.; Morales, L. Subcutaneous Tetrodotoxin and Inflammatory Pain. *Br. J. Anaesth.* 2008, 100, 729–730.
4. Al-Sulaimani S, Titelbaum NV, Ward RE, Zahran TE, Chalhoub S, Kazzi Z. “Case Report of Tetrodotoxin Poisoning from *Lagocephalus sceleratus* in Lebanon”. *Int J Environ Res Public Health.* 2022 Nov 8;19(22):14648. doi: 10.3390/ijerph192214648. PMID: 36429360; PMCID: PMC9690907.
5. Alvarez, P.; Levine, J.D. Antihyperalgesic Effect of Tetrodotoxin in Rat Models of Persistent Muscle Pain. *Neuroscience* 2015, 311, 499–507.
6. Animaliwiki (Ultima modifica 5 agosto 2018). <https://animali.wiki/animales-acuaticos/pez-globo/>
7. Anraku K, Nonaka K, Yamaga T, Yamamoto T, Shin MC, Wakita M, Hamamoto A, Akaike N. Removal of toxin (tetrodotoxin) from puffer ovary by traditional fermentation. *Toxins (Basel).* 2013 Jan 18;5(1):193-202. doi: 10.3390/toxins5010193. PMID: 23334671; PMCID: PMC3564078.
8. Associazione giapponese per la conservazione delle risorse della pesca, Fisheries industry fugu, “Fugu” (2014). <https://www.fish-jfrca.jp/02/pdf/pamphlet/074.pdf>
9. Barry Berkovitz, Peter Shellis, Chapter 4 - Bony fishes, Editor(s): Barry Berkovitz, Peter Shellis, “The Teeth of Non-Mammalian Vertebrates”, Academic Press, 2017, Pages 43-111, ISBN 780128028506, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802850-6.00004-7>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128028506000047>)
10. Belardinelli, L.; Dhalla, A. Sodium Channel Blockers Reduce Glucagon Secretion. U.S. Patent US 20140221286 A1, 20 September 2012.
11. Beloeil, H.; Ababneh, Z.; Chung, R.; Zurakowski, D.; Mulkern, R.V.; Berde, C.B. Effects of Bupivacaine and Tetrodotoxin on Carrageenan-Induced Hind Paw Inflammation in Rats (Part 1). *Anesthesiology* 2006, 105, 128–138.

12. Berde, C.B.; Athiraman, U.; Yahalom, B.; Zurakowski, D.; Corfas, G.; Bogner, C. Tetrodotoxin-bupivacaine-epinephrine combinations for prolonged local anesthesia. *Mar. Drugs* 2011, 9, 2717–2728.
13. Black, J.A.; Liu, S.; Tanaka, M.; Cummins, T.R.; Waxman, S.G. Changes in the Expression of Tetrodotoxin-Sensitive Sodium Channels within Dorsal Root Ganglia Neurons in Inflammatory Pain. *Pain* 2004, 108, 237–247.
14. Bonardi Silvia, “Corso di ispezione degli alimenti di origine animale. I pesci velenosi”, Università degli studi di Parma, 2019/2020.
15. Borgacci Riccardo, “il pesce palla”, My personal trainer (Ultima modifica 17 marzo 2020). [https://www.my-personaltrainer.it/alimentazione/pesce-palla.html#:~:text=Il%20pesce%20palla%20non%20ha,anticipato\)%20di%20un%20veleno%20mortale](https://www.my-personaltrainer.it/alimentazione/pesce-palla.html#:~:text=Il%20pesce%20palla%20non%20ha,anticipato)%20di%20un%20veleno%20mortale)
16. Bottasini Veronica, “Questo pesce è mortale e sta invadendo il Mediterraneo”, *Il Giornale della Vela*, (Ultima modifica 15 dicembre 2019). <https://www.giornaledellavela.com/2019/12/15/pesce-mortale-lagocephalus/>
17. Bragadeeswaran, S.; Therasa, D.; Prabhu, K.; Kathiresan, K. Biomedical and pharmacological potential of tetrodotoxin-producing bacteria isolated from marine pufferfish *arothron hispidus* (Muller, 1841). *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 2010, 16, 421–431.
18. Bucciarelli GM, Lechner M, Fontes A, Kats LB, Eisthen HL, Shaffer HB. “From Poison to Promise: The Evolution of Tetrodotoxin and Its Potential as a Therapeutic. *Toxins (Basel)*”. 2021 Jul 24;13(8):517. doi: 10.3390/toxins13080517. PMID: 34437388; PMCID: PMC8402337.
19. Camera del Commercio della Prefettura di Niigata, “Pesca e mercato della pesca del Fugu in Giappone”, (Ultima modifica dicembre 2016). <http://www.shiunsyo.com/pdf2016/fugu.pdf>.
20. Cappelli Marco, Edizioni Pubblicità Italia Italia Srl, Eurocarni (marzo 2007). <https://www.pubblicitaitalia.com/eurocarni/2007/3/7261.html>
21. Carbonara Pierluigi, Kolarari Jerina, Djurovic Mirko, Gaudio Palma, Ikica Zdravko, Kroqi Gulielm, Milone Nicoletta, Spedicato Maria Teresa. (2017). “The presence of Tetraodontidae species in the Central Mediterranean: an update from the southern Adriatic Sea”. *Acta Adriatica*. 58. 325 - 338. DOI:10.32582/aa.58.2.11.
22. Chen J, Katada Y, Okimura K, Yamaguchi T, Guh YJ, Nakayama T, Maruyama M, Furukawa Y, Nakane Y, Yamamoto N, Sato Y, Ando H, Sugimura A, Tabata K, Sato A, Yoshimura T. Prostaglandin E₂ synchronizes lunar-regulated beach spawning in grass

- puffers. *Curr Biol.* 2022 Nov 21;32(22):4881-4889.e5. doi: 10.1016/j.cub.2022.09.062. Epub 2022 Oct 27. PMID: 36306789.
23. Chu Elaine, Institute for the Oceans and Fisheries - Sea Around Us, Canada. 2021
 24. Codice penale della Repubblica Italiana, Libro II, Titolo VI, art. 444 “Commercio di sostanze alimentari nocive” (aggiornato da D.L. 2 marzo 2024, N° 19).
 25. Cultural Heritage online, “Satohama shell midden”, Agency for Cultural Affairs. (ultima modifica 25 dicembre 2016). <https://bunka.nii.ac.jp/heritages/detail/209550>.
 26. David Capel, Japanjournal.jp, (Ultima modifica 21 gennaio 2022). <https://www.japanjournal.jp/society/traditions/pt202201212169.html>
 27. Diss, J.K.J.; Stewart, D.; Pani, F.; Foster, C.S.; Walker, M.M.; Patel, A.; Djamgoz, M.B.A. A Potential Novel Marker for Human Prostate Cancer: Voltage-Gated Sodium Channel Expression in Vivo. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2005, 8, 266–273.
 28. Divisione investigativa e statistica della dogana di Moji, “Il pesce palla importato ha superato per la prima volta la produzione nazionale, secondo la Moji customs”, Asahi.com (marzo 2003). <https://www.asahi.com/03-04/news/OSK200312110042.html>
 29. Doherty MJ. Captain Cook on poison fish. *Neurology.* 2005 Dec 13;65(11):1788-91. doi: 10.1212/01.wnl.0000187128.80551.1b. PMID: 16344524.
 30. El-Dayem, S.M.A.; Fouda, F.M.; Ali, E.H.A.; Motelp, B.A.A.E. The Antitumor Effects of Tetrodotoxin and/or Doxorubicin on Ehrlich Ascites Carcinoma-Bearing Female Mice. *Toxicol. Ind. Health* 2013, 29, 404–417.
 31. Esf/Yoji Okata-www.esf.edu/top10/2015/10.htm
 32. FAO - Electronic Publishing Policy and Support Branch, Communication Division, 2001
 33. Fazio Gualtiero, “consumare il pesce in modo sicuro: i pesci velenosi” 2022. <https://www.fondazionedietamediterranea.it/consumare-il-pesce-in-modo-sicuro-i-pesci-velenosi/>
 34. Fishbase, aggiornamento febbraio 2024. <https://www.fishbase.se/search.php>
 35. Fisheries industry fugu, Associazione giapponese per la conservazione delle risorse della pesca, 2014. <https://www.fish-jfrca.jp/02/pdf/pamphlet/074.pdf>
 36. Fistola Alessia, Tuttogreen, (Ultima modifica 7 maggio 2018). <https://www.tuttogreen.it/pesce-palla/#Riproduzione>.
 37. Fouda, F.M. Anti-Tumor Activity of Tetrodotoxin Extracted from the Masked Puffer Fish *Arothron Diadematus*. *Egypt. J. Biol.* 2005, 7, 1–13.
 38. Fraser, S.P.; Salvador, V.; Manning, E.A.; Mizal, J.; Altun, S.; Raza, M.; Berridge, R.J.; Djamgoz, M.B.A. Contribution of functional voltage-gated Na⁺ channel expression to cell

- behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: I. Lateral motility. *J. Cell. Physiol.* 2003, 195, 479–487.
39. Furusato Sanchokumura, “Interessante conoscere l’ecologia e le caratteristiche del pesce chiamato Fugu”, (Ultima modifica 9 ottobre 2018). <https://tuuhan.co.jp/%E3%81%B5%E3%81%90%E9%80%9A%E8%B2%A9/%E3%81%B5%E3%81%90/>
 40. Giornale regionale della Prefettura dell’Hokkaido (Ultima modifica 14 novembre 2022). <https://www.hokkaido-np.co.jp/article/759224/>.
 41. Graber, K.D.; Prince, D.A. Tetrodotoxin prevents posttraumatic epileptogenesis in rats. *Ann. Neurol.* 1999, 46, 234–242.
 42. Green, P.G.; Alvarez, P.; Levine, J.D. Topical Tetrodotoxin Attenuates Photophobia Induced by Corneal Injury in the Rat. *J. Pain* 2015, 16, 881–886.
 43. Grimm, J. Dissociation of Primary and Secondary Reward-Relevant Limbic Nuclei in an Animal Model of Relapse. *Neuropsychopharmacology* 2000, 22, 473–479.
 44. Guardone Lisa, Gasperetti Laura, Maneschi Andrea, Ricci Enrica, Susini Francesca, Guidi Alessandra, Armani Andrea, “Toxic invasive pufferfish (Tetraodontidae family) along Italian coasts: Assessment of an emerging public health risk, *Food Control*”. Volume 91, 2018, Pages 330-338, ISSN 0956-7135, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.005>.
 45. Hagen, N.A.; Cantin, L.; Constant, J.; Haller, T.; Blaise, G.; Ong-Lam, M.; du Souich, P.; Korz, W.; Lapointe, B. Tetrodotoxin for Moderate to Severe Cancer-Related Pain: A Multicentre, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Parallel-Design Trial. *Pain Res. Manag.* 2017, 2017, 1–7.
 46. Honda, S.; Arakawa, O.; Takatani, T.; Tachibana, K.; Yagi, M.; Tanigawa, A.; Noguchi, T. Toxicification of cultured puffer fish *Takifugu rubripes* by feeding on tetrodotoxin-containing diet. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2005, 71, 815–820. <https://www.keywestaquarium.com/puffer-fish>
 47. Islam QT, Razzak MA, Islam MA, Bari MI, Basher A, Chowdhury FR, Sayeduzzaman AB, Ahasan HA, Faiz MA, Arakawa O, Yotsu-Yamashita M, Kuch U, Mebs D. “Puffer fish poisoning in Bangladesh: clinical and toxicological results from large outbreaks in 2008”. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011 Feb;105(2):74-80. doi: 10.1016/j.trstmh.2010.10.002. Epub 2010 Dec 3. PMID: 21129761.
 48. Itoi S, Yoshikawa S, Asahina K, Suzuki M, Ishizuka K, Takimoto N, Mitsuoka R, Yokoyama N, Detake A, Takayanagi C, Eguchi M, Tatsuno R, Kawane M, Kokubo S, Takanashi S, Miura A, Suitoh K, Takatani T, Arakawa O, Sakakura Y, Sugita H. “Larval

- pufferfish protected by maternal tetrodotoxin". *Toxicon*. 2014 Feb;78:35-40. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.11.003. Epub 2013 Nov 23. PMID: 24279996.
49. Japan fish Trivia Study Group "Enciclopedia delle curiosità sui pesci che ti renderanno più intelligente" p.56 Gentosha Bunko 2002
 50. Katikou P, Gokbulut C, Kosker AR, Campàs M, Ozogul F. "An Updated Review of Tetrodotoxin and Its Peculiarities". *Mar Drugs*. 2022 Jan 3;20(1):47. doi: 10.3390/md20010047. PMID: 35049902; PMCID: PMC8780202.
 51. Katikou P. "Public Health Risks Associated with Tetrodotoxin and Its Analogues in European Waters: Recent Advances after The EFSA Scientific Opinion". *Toxins (Basel)*. 2019 Apr 26;11(5):240. doi: 10.3390/toxins11050240. PMID: 31035492; PMCID: PMC6562576.
 52. Kawase Hiroshi, Okata Yoji e Ito Kimiaki, "Role of Huge Geometric Circular Structures in the Reproduction of a Marine Pufferfish, in *Scientific Reports*", vol. 3, n. 1, 1° luglio 2013, DOI:10.1038/srep02106.
 53. Kawatsu K, Hamano Y, Yoda T, Terano Y, Shibata T. Rapid and highly sensitive enzyme immunoassay for quantitative determination of tetrodotoxin. *Jpn J Med Sci Biol* 1997;50:133–50.
 54. Keywestaquarium.com, Florida (Stati Uniti), "Big poison, little fish".
 55. Kitahama Kiichi, "Storia naturale del Fugu", casa editrice Tokyo Shobosha, p. 29, 1975
 56. Kohane, D.S.; Smith, S.E.; Louis, D.N.; Colombo, G.; Ghoroghchian, P.; Hunfeld, N.G.M.; Berde, C.B.; Langer, R. Prolonged duration local anesthesia from tetrodotoxin-enhanced local anesthetic microspheres. *Pain* 2003, 104, 415–421.
 57. Kohane, D.S.; Yieh, J.; Lu, N.T.; Langer, R.; Strichartz, G.R.; Berde, C.B. A re-examination of tetrodotoxin for prolonged duration local anesthesia. *Anesthesiology* 1998, 89, 119–131.
 58. La Castellana Riccardo, tesi di laurea "DNA barcoding per il rilevamento di frodi in prodotti ittici commercializzati nelle comunità etniche", Dipartimento di Scienze Veterinarie Corso di Laurea Specialistica in Medicina Veterinaria, A.A 2014/2015, relatore Andrea Armani.
 59. Lago J, Rodríguez LP, Blanco L, Vieites JM, Cabado AG. "Tetrodotoxin, an Extremely Potent Marine Neurotoxin: Distribution, Toxicity, Origin and Therapeutical Uses". *Mar Drugs*. 2015 Oct 19;13(10):6384-406. doi: 10.3390/md13106384. PMID: 26492253; PMCID: PMC4626696.
 60. Lan MY, Lai SL, Chen SS, Hwang DF. Tetrodotoxin intoxication in a uraemic patient. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1999 Jul;67(1):127-8. doi: 10.1136/jnnp.67.1.127. PMID: 10454878; PMCID: PMC1736425.

61. Lane Jodie, Canadian Museum of Nature, Canada, 2001
62. Lin, S.; Lv, Y.; Xu, J.; Mao, X.; Chen, Z.; Lu, W. Over-Expression of Nav1.6 Channels Is Associated with Lymph Node Metastases in Colorectal Cancer. *World J. Surg. Onc.* 2019, 17, 175.
63. Lindsey C.C., 1 – “Form, Function, and Locomotory Habits in Fish”, Editor(s): W.S. Hoar, D.J. Randall, *Fish Physiology*, Academic Press, Volume 7, 1978, Pages 1-100, ISSN 1546-5098, ISBN 9780123504074, [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60163-6](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60163-6). (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1546509808601636>)Madejska A,
64. Madejska A, Michalski M, Osek J. “Marine Tetrodotoxin as a Risk for Human Health”. *J Vet Res.* 2019 Oct 8;63(4):579-586. doi: 10.2478/jvetres-2019-0060. PMID: 31934670; PMCID: PMC6950440.
65. Magarlamov, T.Y.; Melnikova, D.I.; Chernyshev, A.V. “Tetrodotoxin-producing bacteria: Detection, distribution and migration of the toxin in aquatic systems”. *Toxins* 2017, 9, 166.
66. Mahmoud M.S. Farrag, Alaa A.K. El -Haweet, El-Sayed kh A. Akel and Mohsen A. Moustafa, “Occurrence of puffer fishes (Tetraodontidae) in the eastern Mediterranean, Egyptian coast - filling in the gap”, *BioInvasions Records* (2016) Volume 5, Issue 1: 47–54 DOI: <http://dx.doi.org/10.3391/bir.2016.5.1.09>. © 2016 The Author(s). Journal compilation © 2016 REABIC
67. Mainichi Shinbun (edizione mattutina), “Attenzione! Gli avvelenamenti tra gli ibridi sono in aumento. La localizzazione del veleno è sconosciuta e sono difficili da distinguere” (26 maggio 2017). <https://mainichi.jp/articles/20170526/k00/00e/040/239000c>
68. Mancuso Irene, 2019 [Sushisenpai.it](https://sushisenpai.it). <https://sushisenpai.it/guide/piatti/fugu/>
69. Marcil, J.; Walczak, J.-S.; Guindon, J.; Ngoc, A.H.; Lu, S.; Beaulieu, P. Antinociceptive Effects of Tetrodotoxin (TTX) in Rodents. *Br. J. Anaesth.* 2006, 96, 761–768.
70. Masafumi Amano, Noriko Amiya, Minami Takaoka, Haruka Sato, Tomohiro Takatani, Osamu Arakawa, Yoshitaka Sakakura, “Tetrodotoxin functions as a stress relieving substance in juvenile tiger puffer *Takifugu rubripes*”, *Toxicon*, Volume 171, 2019, Pages 54-61, ISSN 0041-0101, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.09.024>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004101011930474X>)
71. Matsumura, K. Tetrodotoxin as a Pheromone. *Nature* 1995, 378, 563–564.
72. Matsura Keiichi, A new pufferfish of the genus *Torquigener* that builds “mystery circles” on sandy bottoms in the Ryukyu Islands, Japan (Actinopterygii: Tetraodontiformes: Tetraodontidae), in *Ichthyological Research*, vol. 62, n. 2, 1° gennaio 2015, pp. 207–212, DOI:10.1007/s10228-014-0428-5.

73. McLaughlin, J.; See, R.E. Selective Inactivation of the Dorsomedial Prefrontal Cortex and the Basolateral Amygdala Attenuates Conditioned-Cued Reinstatement of Extinguished Cocaine-Seeking Behavior in Rats. *Psychopharmacology* 2003, 168, 57–65.
74. Mengoli Alfredo, “Tropicalizzazione e frodi sanitarie”. ASL Bologna, 2016. <https://www.ausl.bologna.it/eventi/archivio/auslevent.2016-02-25.8361160013/files/Mengoli-DSP-AUSL-di-Bologna.pdf>.
75. Ministero dell’Agricoltura, delle Foreste e della Pesca del Giappone, “Base della gestione delle risorse relativo agli stock di pesce palla tigre nel Mar del Giappone, nel Mar Cinese Orientale e nel Mare Interno di Seto” (2021). <https://www.jfa.maff.go.jp/j/council/seisaku/kanri/syuhou/attach/pdf/230721-16.pdf>
76. Ministero della Salute della Repubblica italiana, (Ultima modifica 19 novembre 2013). https://www.salute.gov.it/portale/news/p3_2_1_1_1.jsp?id=1352&lingua=italiano&menu=notizie&p=dalministero
77. Ministero della Salute, del Lavoro e del Benessere del Giappone, “Profilo di rischio delle tossine naturali: Pesce: veleno del pesce palla” (2005). https://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/poison/animal_det_01.html
78. Ministero della Salute, del Lavoro e del Benessere: Linee guida per l'ispezione dell'igiene alimentare, edizione fisica e chimica, Japan Food Sanitation Association (2005). https://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/poison/animal_01.html#yorito
79. Narahashi T, Moore JM, Scott WR. “Tetrodotoxin blockage of Sodium conductance increase in lobate giant axons”. *J Gen Physiol.* 1964 May;47(5):965-74. doi: 10.1085/jgp.47.5.965. PMID: 14155438; PMCID: PMC2195365.
80. Narahashi T. “Tetrodotoxin: a brief history”. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2008;84(5):147-54. doi: 10.2183/pjab.84.147. PMID: 18941294; PMCID: PMC2858367.
81. Nassar, M.A.; Stirling, L.C.; Forlani, G.; Baker, M.D.; Matthews, E.A.; Dickenson, A.H.; Wood, J.N. Nociceptor-Specific Gene Deletion Reveals a Major Role for Nav1.7 (PN1) in Acute and Inflammatory Pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, 101, 12706–12711.
82. New pufferfish species named *Torquigener albomaculosus*, 9 December 2014 su bbc.com
83. Ngy L, Tada K, Yu C-F, Takatani T, Arakawa O. Occurrence of paralytic shellfish toxins in Cambodian Mekong pufferfish *Tetraodon turgidus*: selective toxin accumulation in the skin. *Toxicon* 2008;51:280–8.
84. Nieto, F.R.; Entrena, J.M.; Cendán, C.M.; Del Pozo, E.; Vela, J.M.; Baeyens, J.M. Tetrodotoxin Inhibits the Development and Expression of Neuropathic Pain Induced by Paclitaxel in Mice. *Pain* 2008, 137, 520–531.

85. Noguchi T, Arakawa O. “Tetrodotoxin--distribution and accumulation in aquatic organisms, and cases of human intoxication”. *Mar Drugs*. 2008 May 28;6(2):220-42. doi: 10.3390/md20080011. PMID: 18728726; PMCID: PMC2525488.
86. Pires O.R., Sebben A., Schwartz E.F., Bloch C., Morales R.A.V., Schwartz C.A.: The occurrence of 11-oxotetrodotoxin, a rare tetrodotoxin analogue, in the brachycephalidae frog *Brachycephalus ephippium*. *Toxicon* 2003, 42, 563–566.
87. Rapinese Biagio Daniele, “I pesci palla sono più romantici di noi: si riproducono al chiaro di Luna”, (Ultima modifica 27/10/2022, Ore 22:20), <https://tech.everyeye.it/notizie/pesci-palla-romantici-noi-riproducono-chiaro-luna-616097.html>
88. Rivamar Srl, “Pesce palla”. <https://www.rivamar.it/non-categorizzato/pesce-palla/> (2024)
89. Rivera VR, Poli MA, Bignami GS. “Prophylaxis and treatment with a monoclonal antibody of tetrodotoxin poisoning in mice”. *Toxicon*. 1995 Sep;33(9):1231-7. doi: 10.1016/0041-0101(95)00060-y. PMID: 8585093.
90. Saketalk.it, (Ultima modifica 13 novembre 2020). <https://www.sake-talk.com/drink-hirezake>
91. Schwartz, D.M.; Fields, H.L.; Duncan, K.G.; Duncan, J.L.; Jones, M.R. Experimental study of tetrodotoxin, a long-acting topical anesthetic. *Am. J. Ophthalmol.* 1998, 125, 481–487.
92. Shen, H.; Zhang, S.; Fu, Q.; Xiao, W.; Wang, S.; Yu, S.; Xiao, M.; Bian, H.; Tang, Y. A membrane-based fluorescence-quenching immunochromatographic sensor for the rapid detection of tetrodotoxin. *Food Control* 2017, 81, 101–106.
93. Shi, J.; Liu, T.-T.; Wang, X.; Epstein, D.H.; Zhao, L.-Y.; Zhang, X.-L.; Lu, L. Tetrodotoxin Reduces Cue-Induced Drug Craving and Anxiety in Abstinent Heroin Addicts. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2009, 92, 603–607.
94. Shipp, R. L. 2003. Tetraodontidae. In: *FAO species Identification sheets for fishery purposes, Western Central Atlantic. Vol. 3: 1988-2006.* FAO of the United Nations, Rome, Italy. <https://www.fao.org/3/y4162e/y4162e70.pdf>
95. Song, H.; Li, J.; Lu, C.-L.; Kang, L.; Xie, L.; Zhang, Y.-Y.; Zhou, X.-B.; Zhong, S. Tetrodotoxin Alleviates Acute Heroin Withdrawal Syndrome: A Multicentre, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study: Tetrodotoxin Alleviates Acute Heroin Syndrome. *Clin. Exp. Pharmacol.* 2011, 38, 510–514.
96. Spelta Federica, *Alimentipedia.it*. <https://www.alimentipedia.it/rana-pescatrice-coda-di-rospo.html> (2024)
97. Trombetti Marco, Stelios Katsanevakis, Ivan Deriu and Ana Cristina Cardoso. *EASIN-Lit: a geo-database of published alien species records.* 2013
98. Ueno Teruya e Sakamoto Kazuo, “pesce giapponese” *Chuko Shinsho* p. 199, 2004

99. Unisalento, Seminari, “Introduzione alla fisiologia”, 2018, <https://www.unisalento.it/documents/20152/189553/POTENZIALE+D%27AZIONE.pdf/defd3a83-7680-b116-48de-c8239a10182c?version=1.0>
100. Venkatesh B, Lu SQ, Dandona N, See SL, Brenner S, Soong TW. “Genetic basis of tetrodotoxin resistance in pufferfishes”. *Curr Biol.* 2005 Nov 22;15(22):2069-72. doi: 10.1016/j.cub.2005.10.068. PMID: 16303569.
101. Wilson J.M., L.F.C. Castro, in *Fish Physiology*, 2010
102. Xiao, Z.; Bian, Z. *Biosynthetic Studies of Tetrodotoxin and Its Anticancer Activities Assessment In Vitro*. Master’s Thesis, Hong Kong Baptist University, Hong Kong, China, 2014.
103. Yasuo Suehiro, “I pesci del Giappone”, Casa editrice Yokusha, 1960, p. 60.
104. Yomiuri Shinbun (Giornale), (Ultima modifica 19 giugno 2023). <https://www.yomiuri.co.jp/economy/20230619-OYT1T50100/>
105. Yotsu-Yamashita M., Sugimoto A., Takai A., Yasumoto T.: Effects of specific modifications of several hydroxyls of tetrodotoxin on its affinity to rat brain membrane. *J Pharmacol Exp Ther* 1999, 289, 1688–1696.
106. Zhang X, Zong J, Chen S, Li M, Lu Y, Wang R, Xu H. “Accumulation and Elimination of Tetrodotoxin in the Pufferfish *Takifugu obscurus* by Dietary Administration of the Wild Toxic Gastropod *Nassarius semiplicata*”. *Toxins (Basel)*. 2020 Apr 25;12(5):278. doi: 10.3390/toxins12050278. PMID: 32344936; PMCID: PMC7290894.
107. Zhao, C.; Liu, A.; Santamaria, C.M.; Shomorony, A.; Ji, T.; Wei, T.; Gordon, A.; Elofsson, H.; Mehta, M.; Yang, R.; et al. Polymertetrodotoxin conjugates to induce prolonged duration local anesthesia with minimal toxicity. *Nat. Commun.* 2019, 10, 2566.
108. Zooplus magazine, Zooplus SE 2024, Monaco di Baviera, Germania. <https://www.zooplus.it/magazine/acquaristica/specie-di-pesci>