

F. GALLI¹, L. IULIANO²

La supplementazione umana con vitamina E

PROGRESS IN NUTRITION
VOL. 12, N. 3, 219-234, 2010

TITLE

Vitamin E supplementation

KEY WORDS

Vitamin E, tocopherol, antioxidant supplements, cardiovascular disease, clinical trials, metanalysis, supplementation, nutrition

PAROLE CHIAVE

Vitamina E, tocoferolo, antiossidanti, danno cardiovascolare, trial clinici, metanalisi, supplementazione umana, nutrizione

¹Dipartimento di Medicina Interna, Sezione di Biochimica Applicata e Scienze della Nutrizione, Università degli Studi di Perugia
Laboratorio di Biochimica clinica e nutrizionale, Perugia

²Dipartimento di Medicina Sperimentale, Unità di Medicina Vascolare, Laboratorio di biologia vascolare e spettrometria di massa
Università di Roma "La Sapienza"

Indirizzo per la corrispondenza:
Dr. Francesco Galli

Dipartimento di Medicina Interna, Sezione di Biochimica Applicata e Scienze della Nutrizione, Università degli Studi di Perugia
Laboratorio di Biochimica Clinica e Nutrizionale
Via del Giochetto, 06126 Perugia
E-mail: fgalli@unipg.it

Summary

After near to one century of research and speculations on beneficial properties, vitamin E has recently become to the scientific reconsideration due to possible adverse effects. Metanalysis studies have in fact suggested that supplementation at doses higher than 400 UI/die (i.e. 400 mg of synthetic α -tocopherol or approximately 180 mg of its natural form) would increase the risk of mortality in cardiovascular risk patients. Toxicology data provide solid evidence on the fact that vitamin E is well tolerated in humans. Toxicity effects are difficult to be demonstrated even at dosages of several grams per day maintained for years. The levels defined as potentially harmful in these metanalysis studies do not exceed the tolerable upper intake level (UL) nor the acceptable daily intake (ADI) that have been established by the most authoritative food safety and nutrition boards and institutions worldwide. For european countries these levels correspond to 300 mg/die and 0.15-2 mg/kg of body weight/die of natural α -tocopherol, respectively. These aspects and the debate on scientific value and implications for human health of the information rising from vitamin E metanalysis studies has lead to the conclusion that these do not provide a sufficient level of evidence for such a risk. On the other hand, these metanalysis studies have provided an occasion for further evaluating safety and need of dietary supplements that have been proposed for the primary and secondary prevention of chronic-degenerative diseases such as CVD, cancer and neurodegenerative diseases. Actually, largest clinical trials on vitamin E supplementation and assessed in these metanalysis studies did not provide solid evidence for any prevention effects. Therefore, massive and indiscriminate supplementation protocols should be avoided and the general population should be advised against this. A sceptic attitude has to be adopted against the use of high doses vitamin E as a therapeutic measure for the clinical end-points so far taken into consideration. Instead of this, it has to be recommended to reach the optimal intake of this vitamin (in Europe the RDA is 10 mg) by means of a balanced consumption of natural sources of this vitamin (main food sources of vitamin E are wheat germ, nuts and seeds, and plant oils in general), and this type of recommendation can guaranty to have all the possible beneficial effects of this vitamin as well as of other micronutrients, without any potential risk.

Riassunto

Dopo quasi un secolo di studi sulle possibili e numerose proprietà benefiche della vitamina E, negli ultimi anni questa vitamina è salita alla ribalta della cronaca scientifica a seguito della sua possibile tossicità per l'uomo. Questa notizia è stata fornita da alcuni studi di metanalisi che hanno rilevato un aumento della mortalità in soggetti a rischio cardiovascolare supplementari con più di 400 UI/die di questa vitamina (ovvero 400 mg di α -tocoferolo nella forma sintetica o circa 180 mg dell'analogo naturale). Di fatto l'assunzione di vitamina E nell'uomo si dimostra molto ben tollerabile ed effetti di tossicità non sono stati osservati anche a dosi di diversi grammi al giorno somministrate per anni. Si deve altresì considerare che i livelli descritti come potenzialmente pericolosi negli studi di metanalisi sopra citati, non superano la soglia massima di assunzione tollerabile (UL) di questa vitamina né quella della assunzione giornaliera accettabile (ADI) che sono state stabilite per questa vitamina dai massimi organismi internazionali di vigilanza su alimenti ed agenti naturali. Per i paesi europei queste soglie corrispondono rispettivamente a 300 mg/die ed a 0,15-2 mg/kg peso/die di α -tocoferolo naturale. Questi aspetti e l'ampio dibattito incentrato negli ultimi anni sul valore degli studi di metanalisi sulla vitamina E ha chiaramente stabilito che, di fatto, essi non forniscono nessuna evidenza concreta di rischio. D'altro canto, questi studi hanno avuto il merito di fornire lo spunto per una riflessione sulla sicurezza ed anche sulla reale necessità di assumere supplementi di questa vitamina per azioni di prevenzione primaria o secondaria in ambito cardiovascolare, tumorale e di alcuni tra i maggiori disordini neurodegenerativi. I trial più ampi condotti sulla supplementazione di questa vitamina ed esaminati in questi studi di metanalisi di fatto non hanno prodotto nessuna evidenza di effetto e quindi una supplementazione indiscriminata ed a dosi massicce va chiaramente sconsigliata sino a che non saranno prodotte ulteriori e concrete evidenze che la supportino. Quindi, l'impiego come agente terapeutico ed a dosi elevate di vitamina E deve essere considerato con cautela od addirittura inappropriato agli scopi clinici sino ad ora proposti. Ciò che deve essere raccomandato invece è il raggiungimento dei livelli di assunzione ottimale (in Europa il valore di RDA è pari a 10 mg) e che questo si basi sull'introduzione della forma naturale della vitamina E con gli alimenti (le fonti maggiori e più bilanciate sono il germe di grano, la frutta da guscio ed i semi, e gli oli vegetali in genere). Questo tipo di raccomandazioni sono quelle che garantiscono con certezza la possibilità di sfruttare le funzioni benefiche di questa vitamina scongiurandone eventuali effetti avversi.

Cenni storici e caratteristiche generali della vitamina E

La storia scientifica della vitamina E copre ormai un secolo (Fig. 1). Questa vitamina è definita tale in base all'evidenza che nell'uomo esiste una forma di atassia da deficienza di vitamina E (AVED) dovuta ad un difetto genetico della proteina epatica α -Tocopherol

Transfer Protein (α -TTP) (1, 2) la quale lega selettivamente l' α -tocoferolo (Fig. 2), ovvero la forma principale di vitamina E che troviamo nell'organismo umano. L'AVED è una forma neurodegenerativa progressiva che si manifesta in genere come una neuropatia periferica che porta alla perdita retrograda di neuroni sensitivi e che può risultare fatale nell'uomo se

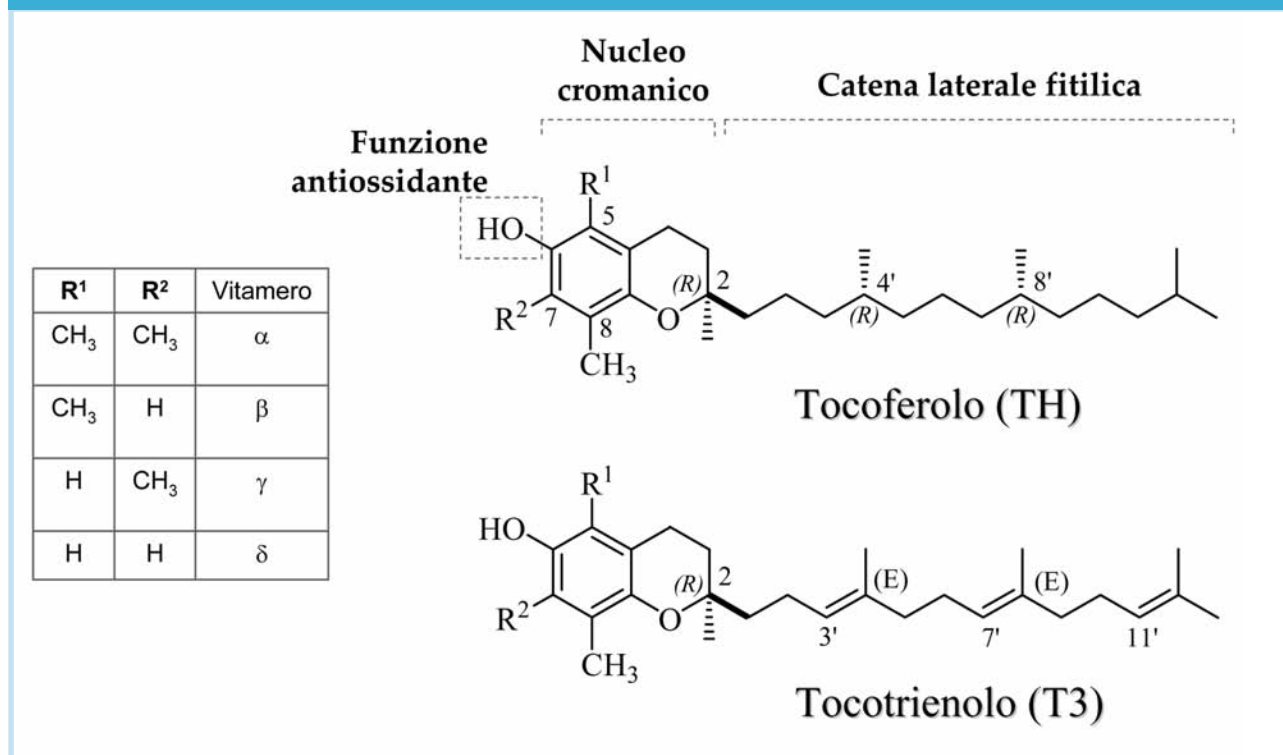
non trattata con supplementazione massiva di vitamina E.

Dal 1922, anno in cui Evans e Bishop scoprirono un fattore di origine vegetale essenziale per la fertilità della femmina del ratto (3), e solo in seguito identificato come α -tocoferolo e definito col nome di vitamina E, un numero impressionante di studi *in vitro* ed *in vivo* hanno suggerito e/o caval-

Figura 1 - Le tappe salienti nella storia della vitamina E

- 1922** La vitamin E fu scoperta nel 1922 quando Evans HM et al. (*Science* 1922, 56, 650) descrissero per la prima volta una "substance X" presente nei vegetali ed essenziale a mantenere la fertilità nella femmina del ratto.
- 1936** L' α -tocoferolo venne isolato in forma pura dall'olio di germe di grano nel 1936 (Evans HM et al., *J Biol Chem* 1936, 113, 319), e la sua struttura corretta fu fornita nel 1938 (Fernholz E, *J Am Chem Soc* 1938, 60, 700); la prima sintesi chimica (forma all-rac) fu realizzata nello stesso anno (Karrer P et al., *Helv Chim Acta* 1938, 21, 820).
- 1938** tra gli anni 50 e 60 diversi report scientifici descrissero la funzione chimica di antiossidante di questa vitamina e la formazione dei suoi prodotti di ossidazione principali, il tocoferil-radical e il conseguente chinone; la formazione *in vivo* di metaboliti derivanti dall'ossidazione (i cosiddetti "metaboliti di Simon") fu descritta negli anni 50 (Eisengart et al., 1956; Gross et al., 1956).
- 1950** I tocotrienoli vennero preparati per la prima volta nel 1963 (Schudel P et al., *Helv Chim Acta* 1963, 46, 2517) and synthesized in 1976 (Scott JW et al., *Helv Chim Acta* 1976, 59, 290).
- 1960** Solo alla fine degli anni 70 venne proposto un ruolo antiossidante di rilevanza biologica (Burton, G.W., Joyce, A., Ingold, K.U., 1982. First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chainbreaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet* 2, 327.)
- 1970** Una proteina epatica di legame dell' α -tocoferolo venne identificata negli anni 70 (Catignani GL. An alpha-tocopherol binding protein in rat liver cytoplasm. *Biochem Biophys Acta* 1975; 497:349-357.) ma fu caratterizzata in dettaglio solo negli anni 90 (Sato Y, Hagiwara K, Arai H, Inoue K. Purification and characterization of the α -tocopherol transfer protein from rat liver. *FEBS Lett* 1991; 288:41-45.)
- 1980** I metaboliti CEHC (non-Simon o epatici) vennero descritti per la prima volta nel 1984 (Chiku, S.; Hamamura, K.; Nakamura, T. Novel urinary metabolite of d-tocopherol in rats. *J Lipid Res.* 25:40-48; 1984.)
- 1990** Gli studi di carattere cellulare e molecolare sulla vitamina E sono stati effettuati negli ultimi 20 anni. La prima evidenza di un ruolo della vitamina E come molecola in grado di influenzare il signaling cellulare è stata ottenuta nel 1992 dal gruppo di Angelo Azzi (riportato nella rassegna 2). Da allora sono stati evidenziati numerosi altri effetti molecolari di questa vitamina e sono stati riportati sistematicamente una serie di geni che sono sotto la sua influenza in vari organi e tessuti. A seguito di queste evidenze, è stato possibile definire con maggiore precisione il ruolo di regolazione dei processi infiammatori e di proliferazione cellulare della vitamina E.
- 2000** A cavallo tra gli anni 80 ed i primi anni 2000 si sono svolti i più rilevanti tra i trial clinici essenzialmente mirati alla prevenzione primaria e secondaria di malattie cardiovascolari e cancro. Una ulteriore serie di trial clinici di dimensioni anche molto ampie si sono conclusi negli ultimi due anni. Nella quasi totalità dei casi non sono stati raggiunti risultati utili a confermare l'effetto atteso.
- 2005** In particolare nell'ultimo decennio sono stati prodotti e studiati una serie di analoghi di sintesi della vitamina E con possibili applicazioni in campo farmacologico nella cura del cancro, delle infezioni e dei processi infiammatori.
- 2005** Nel 2005 Miller et al. pubblicarono uno studio di metanalisi dei più rilevanti trial clinici svolti sino ad allora sulla supplementazione di vitamina E, identificando un aumento di circa il 4% del rischio di mortalità per tutte le cause in pazienti cardiovascolari supplementari con dosi > 300 mg/die.
- oggi** Vengono identificati nuovi metaboliti a catena lunga ed una via di fosforilazione che partecipano all'attività biologica della vitamina E.
- Solo negli ultimi anni è stato delineato il ruolo chiave che i polimorfismi genici giocano nel dettare la soggettività delle risposte biologiche alla vitamina E e quindi anche del suo eventuale effetto sulla salute (Zingg J, Azzi A, Meydani M. Genetic polymorphisms as determinants for disease-preventive effects of vitamin E. *Nutr Rev*, 2008). Da questo momento il ruolo fisiologico ed eventualmente terapeutico della vitamina E viene discusso nei moderni termini della nutrigenomica.

Figura 2 - Formule di struttura e sistematica della vitamina E



cato l'idea che questa vitamina potesse esercitare proprietà benefiche di vario genere suggerendone un utilizzo come fattore anti-invecchiamento, di prevenzione tumorale e dei processi neurodegenerativi, di regolazione delle funzioni immuno-infiammatorie, e soprattutto di fattore protettivo dei vasi e quindi di agente preventivo delle lesioni aterosclerotiche (4, 5). A ciò è conseguito lo sviluppo di un fiorente mercato di supplementi ed integratori a base di vitamina E che è rappresentato da prodotti con elevato valore aggiunto e che

hanno avuto discreto successo nei paesi anglosassoni ed in particolare negli USA. Un altro settore d'interesse per questa vitamina è quello cosmetico, dove la vitamina E trova impiego in particolare nelle creme per applicazione topica oltre che in una vastissima gamma di oli, lozioni e prodotti a base lipidica per la cura del corpo. In termini quantitativi, comunque, il maggiore destino d'uso di questa vitamina è quello alimentare, dove trova impiego come antiossidante (Regolamento CE N. 1925/2006 del Parlamento Europeo e del

Consiglio, del 20 dicembre 2006) e quindi come conservante della componente grassa degli alimenti, e come ingrediente vitaminico in ambito mangimistico vista l'importanza che si dà a questa vitamina in ambito zootecnico come fattore di fertilità e costituzionale in genere (6). Infatti, quasi la totalità della produzione industriale di questa vitamina su scala planetaria è destinata all'impiego nell'industria alimentare, e per soddisfare la domanda di questo settore, ogni anno si producono essenzialmente mediante sintesi chimica e sotto forma

di α -tocoferolo, decine di migliaia di tonnellate di vitamina E.

Le fonti naturali di questo lipide sono rappresentate dai vegetali (ne sono particolarmente ricchi il germe di grano, i semi in genere, la frutta da guscio ed i loro derivati oleosi di varia natura) anche se quantità apprezzabili sono presenti anche nei grassi animali soprattutto come α -tocoferolo. Da un punto di vista chimico, la forma di sintesi e quella naturale non sono identiche. Nella forma naturale sono presenti solo stereoisomeri *RRR*, mentre nella forma di sintesi abbiamo una miscela di isomeri (ovvero una miscela racemica, definita come *all-rac*, con forme *R* ed *S* nelle varie combinazioni). La forma *RRR* è quella che il nostro organismo a livello epatico seleziona ed utilizza preferenzialmente, con un rapporto di almeno 2:1 rispetto alla forma *all-rac* (7, 8).

Secondo quanto proposto dalla Comunità Europea (European Council Directive 90/496/EEC, 1990) l'assunzione quotidiana raccomandata (anche detta RDA dall'acronimo inglese *Recommended Daily Allowance*) per questa vitamina (come α -tocoferolo) è di 10 mg. Nelle tabelle LARN – INRAN italiane prodotte alla fine degli anni 90 (http://www.sinu.it/larn/tab_rias.asp), questa è la dose è raccomandata per l'uomo mentre per la donna il valore di RDA è di 8 mg. Due cucchiaini di

olio di germe di grano sono in grado di soddisfare questi livelli di fabbisogno. Negli USA il valore di RDA è fissato a 15 mg per ambo i sessi (<http://www.usda.gov/wps/portal/usdahome>).

Va detto che nei paesi occidentali difficilmente si raggiungono questi livelli e che i livelli più elevati di assunzione alimentare si registrano nei paesi mediterranei ed asiatici dove lo stile alimentare favorisce l'impiego in quantità superiori di buone sorgenti di vitamina E. Alcune stime definiscono l'assunzione di vitamina E negli USA deficitaria in oltre il 90% della popolazione adulta con un valore medio stimato di circa 6 mg/die (9). Nella popolazione italiana alcune stime indirette ci fanno ritenere che in parte della popolazione sana ed in alcuni gruppi sottoposti a particolari regimi dietetici, possa essere presente un difetto d'assunzione di vitamina E (10). Nei bambini in età scolare e nei giovani adulti la tendenza a mostrare questo difetto d'assunzione è in genere ancora più spiccata vista la scarsa propensione ad assumere alimenti d'origine vegetale. Una recente indagine su gruppi di popolazione in età scolare residenti nei centri urbani a maggiore densità abitativa dell'Italia centrale (regione Umbria) conferma questo dato e dimostra come questa tendenza si aggravi nel tempo sotto l'influenza di fattori

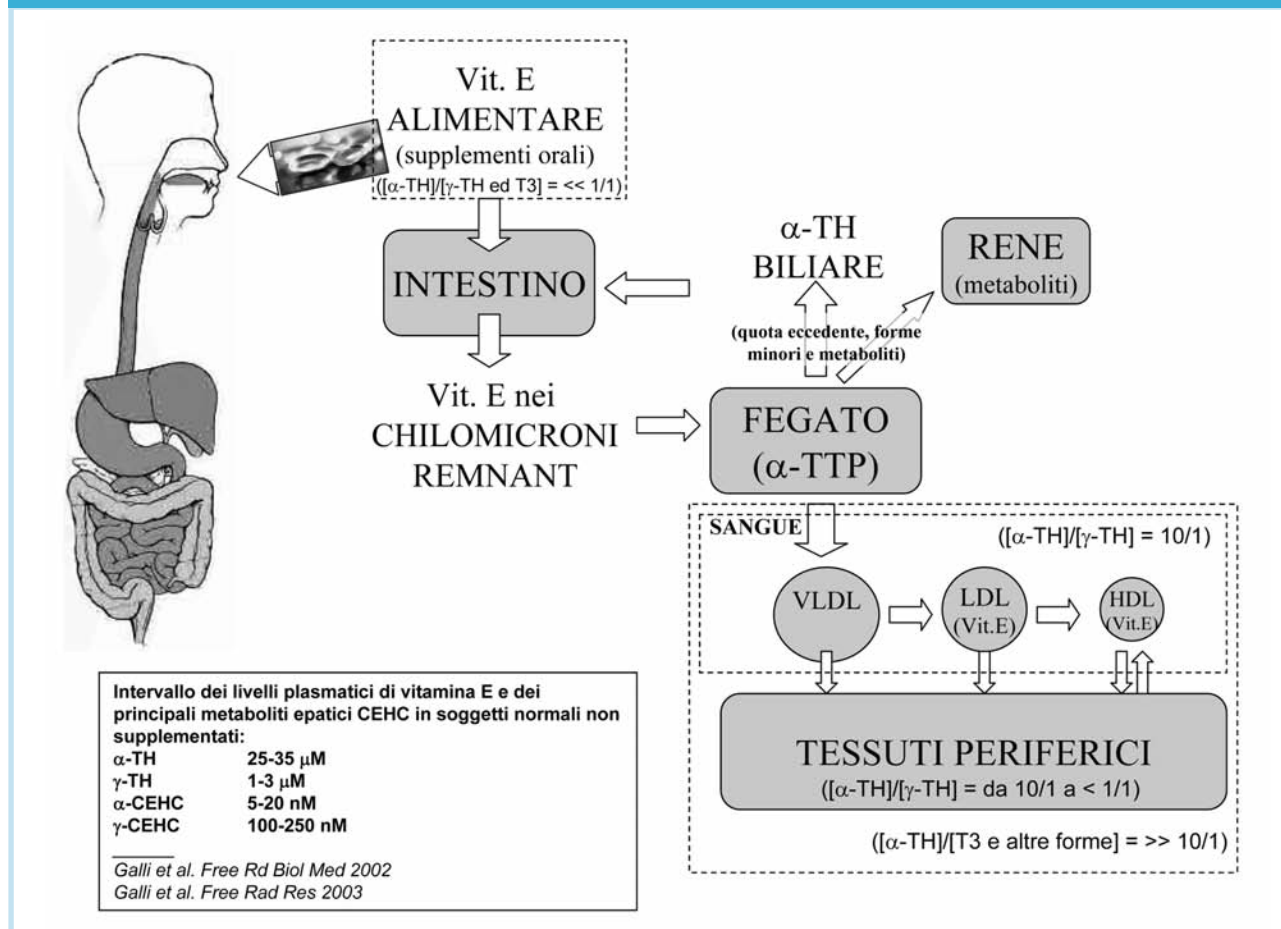
socio-economici e culturali ben identificabili e modificabili (11).

Livelli e metabolismo

La presenza di vitamina E nel nostro corpo consegue al suo assorbimento a livello intestinale assieme agli altri lipidi d'origine alimentare ed alla successiva captazione selettiva nel fegato da parte della α -TTP (Fig. 3). Questa proteina quindi ne permette il trasferimento mediante le lipoproteine al sangue e successivamente la distribuzione ai tessuti.

Questo sistema in tutte le sue componenti, oltre ad essere selettivo per la forma alfa del tocoferolo, è saturabile. Quindi la quota di vitamina E che possiamo trovare nel sangue e nei tessuti non può superare un certo livello. Nel sangue normalmente troviamo livelli inclusi tra 20 e 35 μ M (12, 13) (Fig. 4) e dopo supplementazione adeguata (almeno 100 mg per un tempo di almeno 2 settimane) si raggiungono livelli che difficilmente superano la concentrazione di 60 μ M e ciò è ritenuto limitare anche la variazione dei livelli dei vari distretti corporei a cui la vitamina giunge tramite le lipoproteine. A conferma di ciò si può citare lo studio DATATOP che ha valutato l'effetto della supplementazione di elevate dosi di vitamina E (2000 UI/die per un tempo medio di 14 mesi) sul pro-

Figura 3 - Rappresentazione schematica del metabolismo della vitamina E



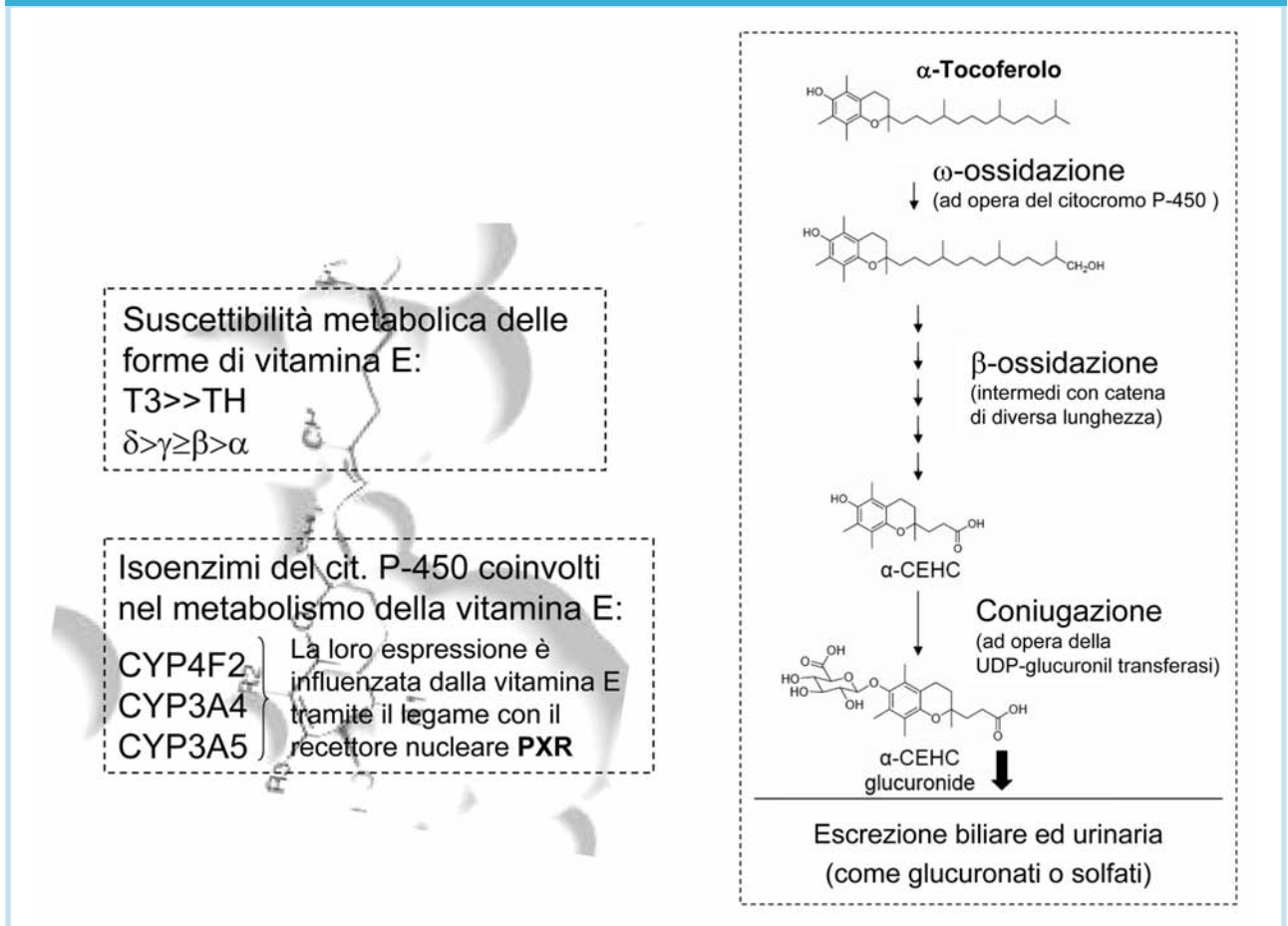
gresso clinico della morbo di Parkinson (14). In questo studio, a fronte di un dosaggio così elevato e protratto nel tempo, si è osservato solo un aumento del 76% dei livelli di questa vitamina nel liquor dei pazienti. Ciò fa escludere fenomeni di accumulo nel tessuto nervoso che erano confermati anche dall'assenza di effetti sia positivi sia di tossicità del trattamento.

La risposta dei livelli plasmatici all'assunzione alimentare è soggetta a criteri di spiccata variabilità intra ed inter-individuale (15, 16).

L'assorbimento, oltre che dalla dose somministrata, è influenzato anche dalla quantità e dalla composizione del pasto (un'adeguata razione alimentare e di componenti lipidiche favoriscono l'assorbimento). Inoltre alcuni polimorfismi possono in-

fluenzare il metabolismo ed i livelli di questa vitamina nell'uomo [per una recente rassegna vedi (4, 5)]. Questa variabilità è sostenuta da alcuni eventi di rilevanza fisiopatologica ed in particolare dalla presenza di difetti della funzione gastrointestinale, come ad esempio si può osservare nel caso di difetti della funzione epatica (17), nella sindrome dell'intestino corto o "short bo-

Figura 4 - Metabolismo epatico della vitamina E. Processo di attivazione metabolica e degradazione della catena laterale fitilica. (Kaempf-Rozzoli et al. Vitamin E and transfer proteins. Current Opinion in Lipidology, 2003; Galli et al. Vitamin E biotransformation in humans. Vitamins and Hormones. 2007)



wel sindrome”, ed in alcuni interventi di chirurgia bariatrica particolarmente severi ed in pazienti gastromizzati (18-20). Una situazione di malassorbimento che specificamente si associa ad un difetto nel metabolismo della vitamina E è quella che caratteristicamente colpisce il paziente con fibrosi cistica

(21) e che deriva dall’insufficiente funzione epatobiliare e pancreatica che si manifesta con vari gradi di severità a seguito alla presenza di questo tratto genetico. Ciò che conosciamo meno di questa vitamina sono la sua distribuzione ed il metabolismo a cui va incontro negli organi extraepatici. Questi aspetti so-

no oggetto d’intense ricerche tese a determinare anche il ruolo biologico della vitamina E nei vari tessuti. Le forme della vitamina E, infatti, raggiungono con vario grado d’efficacia organi come il cervello, il polmone, i vasi, il muscolo e la pelle, dove producono diversi effetti generando segnali cellulari e regolando

l'espressione di geni rilevanti per funzioni tessuto- ed organo-specifiche particolarmente importanti (4, 22-24). Pochi sono gli studi che hanno determinato nell'uomo la distribuzione tissutale in termini di livelli ed abbondanza relativa delle varie forme di vitamina E. Questa cambia in modo tessuto-specifico ed in funzione della composizione nei vitameri principali che sono presenti negli alimenti e nei supplementi alla dieta (8, 23). In condizioni normali nel plasma la forma alfa è presente in un rapporto di circa 10:1 con la forma gamma del tocoferolo, che sono forme più abbondanti. Le altre forme (β - e δ -tocoferolo, e tocotrienoli) sono presenti in tracce. Questa proporzione rispecchia abbastanza fedelmente il grado d'affinità di legame che la proteina epatica α -TTP mostra verso questi vitameri. Nei tessuti la forma alfa del tocoferolo è ancora la più rappresentata ma in alcuni casi come nella pelle, nel tessuto adiposo, nei vasi venosi e nel muscolo, i livelli di γ -tocoferolo sono da 1,4 a 4,6 volte superiori a quelli osservati nel plasma (8).

L'eccesso d'assunzione, o sovradosaggio, di vitamina E è un evento che nel senso classico del termine parrebbe essere scongiurato dello spiccato controllo metabolico a cui questa vitamina è soggetta. La vitamina E non si accumula nel fegato od in altri organi grazie al fatto che la quota eccedente la capaci-

tà legante della α -TTP epatica viene metabolizzata ad opera di isoenzimi del citocromo P450 nel fegato stesso, e quindi viene escreta con la bile ed in parte con le urine sotto forma di metaboliti cromatici glucuronati o sulfonati (Fig. 3 e 4) (13, 25, 26). Per altri lipidi sono invece noti fenomeni da accumulo; ad esempio, nel caso della vitamina D la supplementazione a dosi elevate può portare a superare anche di 5 volte i livelli plasmatici di 25-idrossi colecalciferolo che sono noti produrre effetti di tossicità nell'uomo (500 nM) (27, 28). Gli effetti di tossicità acuta e cronica della vitamina A sono altresì ben noti in letteratura (29).

D'altro canto un eccesso d'assunzione di vitamina E potrebbe creare un sovraccarico metabolico. Questo metabolismo è particolarmente spiccato per le forme non-alfa del tocoferolo e per i tocotrienoli che, come detto sopra, non sono trasferiti in modo efficace alle VLDL nascenti dalla α -TTP epatica.

Questo è l'aspetto meno conosciuto di questa vitamina ed il più interessante per le conseguenze che potrebbe produrre nell'organismo umano. Alcuni metaboliti della vitamina E mostrano, infatti, attività biologiche influenzando la produzione di segnali cellulari e la regolazione dell'espressione e dell'attività di alcuni prodotti genici (4, 24, 26, 30). Nel loro complesso questi effetti potrebbero avere conseguenze

biologiche importanti che ad oggi rimangono in larga parte indefinite. Tra queste, ad esempio, è incluso il rischio di interazioni con il metabolismo di farmaci e nutrienti che coinvolgono la funzione degli stessi isoenzimi del citocromo P450 e le vie di detossificazione stimulate dalla vitamina E (31, 32) (Fig. 4). A questo livello, è stata proposta ad esempio un'interazione tra vitamina E e K (33), che potrebbe produrre una ridotta risposta coagulativa in soggetti supplementati con dosi massicce di vitamina E. In accordo con quanto osservato nel ratto, quest'effetto assimilabile a quello di farmaci quali il warfarin, potrebbe aumentare il rischio di episodi emorragici che possono essere scongiurati in seguito a supplementazione con vitamina K (34). Altri autori non concordano con quest'ipotesi di rischio ed anzi propongono che questa interazione potrebbe produrre un meccanismo di prevenzione da parte della vitamina E verso il rischio trombo-ischemico (33).

Effetti positivi di un'assunzione ottimale e dell'impiego di dosi farmacologiche di vitamina E

Uno dei maggiori benefici che dovrebbero derivare dall'assunzione di questa vitamina è ritenuto essere quello di un'aumentata protezione antiossidante (35). La vitamina E si distribuisce nella matri-

ce lipidica di lipoproteine e membrane cellulari e, grazie alla sua funzione antiossidante (Fig. 2), è in grado di interrompere la reazione a catena che l'ossigeno molecolare innesca sui doppi legami dei lipidi polinsaturi. Questa funzione di *chain-breaker* è chiaramente utile nella protezione di matrici lipidiche di varia natura ed è alla base ad esempio dell'utilizzo di questa vitamina come conservante alimentare, ma ad oggi non sappiamo dire con certezza se quest'effetto sia rilevante per la protezione *in vivo* di cellule e tessuti (in particolare dei vasi e del cervello) e dei lipidi circolanti.

In ogni caso, alcuni autori ritengono che il ruolo di antiossidante lipidico sia da porre in secondo piano rispetto alle funzioni molecolari di signaling e di controllo dell'espressione genica recentemente scoperte per questa vitamina (Fig. 1) e che, in ultima analisi, queste potrebbero essere ben più rilevanti per un possibile effetto sulla salute umana (4, 36). Questo dibattito, comunque, fa intravedere le molteplici facce ed il potenziale biologico di questa vitamina, ed è il sale di un settore di ricerca che rimane particolarmente fervente (solo nel 2009, digitando sul motore di ricerca PubMed il termine "tocopherol" vengono visualizzate 733 voci bibliografiche, delle quali 168 avevano questa parola nel titolo; 76 voci in totale erano rintracciate nello

stesso periodo usando il termine "tocotrienols", di cui 39 contenevano questo termine nel titolo).

Quindi, è possibile che il ruolo principale della vitamina E *in vivo* possa essere quello di fornire una maggiore protezione verso gli insulti che xenobiotici ed endobiotici sostengono durante i processi di tossicità cellulare fisiologici od accelerati da condizioni di stress ossidativo (associati a fenomeni degenerativi ed infiammatori). Ma se ciò realmente avviene e come ciò può avvenire *in vivo*, sono aspetti da stabilire.

Rimane il fatto che in accordo con quanto discusso da altri ed eminenti studiosi del settore (37), il mantenimento di livelli ottimali di vitamina E ha il significato di garantire le funzioni positive che si possono attribuire a questa vitamina in quanto tale, e quindi deve essere inteso come una azione di carattere salutistico. Ma qual è il rapporto esistente tra livello di assunzione alimentare o di supplementazione ed il raggiungimento di questi livelli ottimali? Da alcuni studi di coorte e di intervento come lo α -tocopherol, β -carotene (ATBC) Cancer Prevention Study, il Women's Health Study (WHS), il Cache Country study ed il *Supplementation en Vitamine set Minéraux Antioxydants* (SU.VI.MAX) presi in esame nella recente rassegna di Traber et al. (37), sono stati arbitrariamente estrapolati i target

di assunzione alimentare, e quindi circolatori, di vitamina E utili a produrre effetti positivi ed a carattere preventivo verso eventi cardiovascolari e neurodegenerativi. Secondo questi Autori, essi potrebbero rispettivamente corrispondere al raggiungimento dei livelli prossimi al valore di RDA (cioè ≥ 12 mg/die) e di livelli plasmatici tra 25 e 30 μ M. Come discusso nella sezione precedente, lo stile alimentare dei paesi industrializzati ed altri fattori di carattere soggettivo, rendono il raggiungimento questi livelli di assunzione raccomandata e circolatori un evento poco probabile nella popolazione adulta ed in particolare nell'infanzia (è da notare che per questa fascia d'età non esistono stime precise dei fabbisogni e degli effetti della supplementazione con vitamina E). I livelli ottimali di vitamina E in circolo devono essere riferiti alla popolazione normolipidemica, visto che le iperlipidemie così come i farmaci ipolipemizzanti interferiscono con i livelli in circolo di vitamina E (10, 38, 39).

C'è un rischio reale per la salute umana nella supplementazione con vitamina E?

Che la vitamina E intesa come supplemento alla dieta possa essere nociva alla salute umana è stato proposto con un certo fragore

scientifico e mediatico (40) a partire dal 2005 a seguito di uno studio di metanalisi pubblicato da Miller *et al.* (41) nella rivista americana *Annals of Internal Medicine*, uno dei più rilevanti periodici scientifici nel settore della medicina generale. Questi stessi autori definirono il 2005 come *Annus Horribilis of vitamin E* (42).

Nello studio di metanalisi di Miller *et al.*, per la prima volta, si è prodotta l'ipotesi di un aumento di circa il 4% (tra 1 e 8% nell'intervallo di confidenza del 95%) del rischio relativo di morte, per tutte le cause prese in esame, in pazienti con diverso grado di rischio o malattia cardiovascolare se trattati con dosi di vitamina E superiori alle 400 IU/die (equivalenti a 400 mg/die della forma sintetica *all-rac- α -tocoferolo* e 185 mg/die della forma naturale *RRR-alfa-tocoferolo*).

Questo dato era confermato successivamente da Bielakovic *et al.* (43) esaminando un numero di trial clinici più ampio, da Gerss (44) e quindi recentemente dallo stesso gruppo di Miller (45) in una valutazione preliminare dei trial clinici più ampi condotti negli ultimi 5 anni.

In realtà altri autori avevano in passato suggerito che l'eccesso di somministrazione di vitamina E potesse implicare rischi per la salute. Ad esempio, ed in accordo con quanto discusso sopra, è noto

che la vitamina E potrebbe interferire con il metabolismo e la funzione della vitamina K, e che pertanto potrebbe produrre rischi di tipo emorragico in particolari gruppi di pazienti ed a dosi particolarmente elevate (33). Nel trial clinico ATBC condotto su maschi fumatori con età tra 50 e 70 anni con dosi di supplementazione giornaliera contenuta (50 mg), fu riportato un aumento del rischio di stroke emorragico (46). Questa, comunque, è rimasta una evidenza isolata e probabilmente prodotta da un vizio sperimentale che ad oggi non è stato spiegato.

Alcuni studi negli ultimi anni hanno suggerito che alte dosi di vitamina E possono interferire con il metabolismo ed i livelli delle forme minori della vitamina E stessa. Il γ -tocoferolo, ovvero la seconda forma di vitamina E per abbondanza relativa nell'organismo umano, è suscettibile di questo effetto che potrebbe alterare alcune proprietà biologiche ed il ruolo omeostatico che il complesso dei vitameri, e non il semplice α -tocoferolo, producono nell'uomo. Una rassegna di questi studi è proposta in (4, 12, 40). Nel caso dell' α -tocoferolo effetti di tossicità a dosi molto elevate sono stati riportati solo negli animali da esperimento e questi dati sono stati usati per estrapolare la soglia massima di assunzione tollerabile in regime di somministrazione cronica, o *tole-*

erable upper intake level (UL). Come discusso in dettaglio nel capitolo seguente, questo valore è particolarmente elevato se paragonato alla dose che l'uomo normalmente assume con la dieta e che solo protocolli di supplementazione particolarmente aggressivi (non giustificati ad oggi da nessuna evidenza di beneficio per la salute umana) possono permettere di raggiungere. Questi aspetti sono stati di recente valutati anche rispetto all'assunzione ed ai possibili effetti di tossicità dei tocotrienoli (47). In un recente studio condotto su animali da esperimento si è dimostrato che la vitamina E somministrata con gli alimenti a dosi molto elevate (15 g/kg mangime; normalmente si somministrano da alcune decine ad alcune centinaia di mg/Kg) prima del concepimento, durante la gravidanza e la lattazione, può esporre la prole a difetti organici e di funzione del sistema nervoso centrale (48).

Tossicità della vitamina E

Gli studi di tossicità non hanno meritato la notorietà e l'attenzione generale degli studi di metanalisi e di coorte di recente apparsi in letteratura e discussi in questo lavoro. Questa attenzione di fatto è mancata in quanto, ad oggi, un'ampia letteratura ha portato a stabilire che nell'uomo sia la somministra-

zione in acuto che cronica di dosi anche molto elevate di vitamina E è sicura [un'ampia rassegna è disponibile in (47, 49)]. In particolare, una serie di ricerche (24 studi) valutate nel 2005 da Hathcock et al. (49) dove venivano presi in esame dosaggi da 0,05 a 3,2 g/die (con una media di circa 750 mg/die) somministrati per periodi che andavano da pochi mesi a parecchi anni, ha dimostrato sia per la forma naturale sia sintetica dello α -tocoferolo l'assenza di effetti di tossicità sub-cronica e cronica. Questa sperimentazione si è spinta in alcuni studi a dosaggi tra 1,6 e 2 g per tempi che variano tra alcuni mesi e più di 8 anni, ed in un caso sino a 3,2 g per 9 settimane, senza riportare effetti avversi. Il *Food and Nutrition Board* dello *Institute of Medicine* statunitense ha fissato nella dose di 1 g/die il valore UL. Lo stesso valore è stato fissato nel 2003 in 300 mg di alfa-tocoferolo eq/die dallo *Scientific Committee of Food* (SCF) europeo, un parametro analogo alla quantità giornaliera di assunzione compatibile nell'arco di vita con l'assenza di rischi apprezzabili per la salute, definito come *Acceptable Daily Intake* (ADI), che il *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) ha valutato e definito essere per α -tocoferolo di 0,15-2 mg/Kg di peso corporeo/die [vedi l'articolata descrizione di questi livelli e del loro si-

gnificato in (47, 49) e per ulteriori approfondimenti su questi aspetti tossicologici si rimanda il lettore a (50, 51)]. Il calcolo del valore UL è stato effettuato mediante l'utilizzo di criteri di valutazione tossicologica che eliminano i gradi di incertezza nei dati disponibili per l'esame. Questo tipo di calcolo prende in esame anche il più alto livello di dose che non produce effetti avversi, definito come *No-Observed-Adverse-Effect Level* (NOAEL), che nel caso della vitamina E non era determinabile in base ai protocolli di supplementazione umana disponibili come sorgenti di dati (49). Quindi il valore di UL è stato calcolato utilizzando un parametro analogo, il *Lowest-Observed-Adverse-Effect Level* (LOAEL), e dati ottenuti in animali da esperimento. La verifica di questi calcoli condotta indipendentemente dal *Food and Nutrition Board* statunitense ha prodotto un valore di UL simile (47). Gli studi più accurati svolti ad oggi a riguardo degli effetti di tossicità da somministrazione di vitamina E non hanno in ogni caso preso in esame tutti i gruppi di popolazione e le fasce di età a rischio; rimangono ad esempio escluse da valutazioni specifiche donne in gravidanza, puerpere e bambini lungo tutto l'arco della prima infanzia sino al periodo dell'adolescenza. Per questi gruppi di popolazione vale quindi oltre al-

l'ovvio buonsenso di chi effettua la raccomandazione nutrizionale e di chi la riceve, anche l'applicazione del principio di precauzionalità (51) verso la supplementazione con dosi superiori a quelle raccomandate (vedi "Conclusioni").

L'“effetto Miller”: criticità degli studi di metanalisi, limiti e prospettive dei trial clinici

L'ipotesi di Miller *et al.* (41) ha suscitato un certo clamore ed è risultata sconcertante per la comunità scientifica che era da anni proiettata verso lo studio delle proprietà benefiche di questa vitamina. Si è quindi generata un'ondata lunga di iniziative di ricerca ed editoriali di vario genere che, come spesso accade in ambito scientifico, ha prodotto ciò che potremmo definire un sorta di “effetto Miller”. Sono stati infatti pubblicati un numero di commenti e valutazioni di metodo ed epidemiologiche (40, 52) e sono stati espressi pareri da parte di organismi scientifici internazionali quali ad esempio lo *American Heart Association Nutrition Committee* (53), i quali discutendo i risultati di queste analisi mettono in guardia dai possibili rischi che la somministrazione in dosi elevate di vitamina E potrebbe implicare. Dal 2005 ad oggi altri studi di metanalisi ed osservazionali (con

carattere descrittivo del tipo studi di coorte) sono stati condotti sulle stesse popolazioni di dati esaminate da Miler *et al.* ed anche sui dati di altri e più recenti trial clinici. In base a queste indagini l'ipotesi originaria di aumento del rischio è stata confermata dallo stesso gruppo di Miller (45) e da altri (44, 54), ma dati discordanti sono emersi in altri studi (55, 56), che hanno in qualche caso hanno prodotto revisioni analitiche (44) ed in altri casi hanno suscitato un acceso dibattito sulla criticità ed i pericoli interpretativi dei metodi applicati (40, 57).

Proprio l'aspetto metodologico-interpretativo mina fortemente il valore del messaggio finale che si può estrapolare dallo studio di Miller *et al.* e da quelli che lo hanno seguito. Gli studi di metanalisi, infatti, mettono a raffronto ed analizzano i risultati ottenuti in una serie di trial clinici in modo da evidenziare l'effetto che questi hanno prodotto. Per fare ciò si devono eliminare variabili confondenti di tipo ecologico (58), ovvero quelle generate dalla segmentazione del modello e dalle estrapolazioni sperimentali prodotte nei singoli trial esaminati. Queste variabili sono particolarmente importanti proprio nel caso della metanalisi di Miller *et al.* nella quale si valutava una modifica di un effetto atteso. Ovvero, dall'attesa di un effetto di prevenzione median-

te supplementazione di vitamina E di eventi cardiovascolari in soggetti ad elevato rischio di malattia o malati, si passava all'evidenza di un aumento del rischio di morte per tutte le cause.

Nella metanalisi di Miller *et al.*, le verifiche ed il rigore statistico dei modelli applicati evidentemente non sono stati sufficienti a superare errori di interpretazione e disomogeneità dei campioni, e quindi a fornire un'evidenza incontrovertibile di rischio. Si pensi che in questa metanalisi sono stati messi a confronto 19 trial con numerosità del campione e disegno dello studio ritenuti sufficienti a garantire l'attendibilità della valutazione clinica. In questi trial la vitamina E era somministrata in genere come supplemento orale in forma sintetica ed a vari dosaggi, in pazienti con diverso grado di rischio o malattia cardiovascolare. Le popolazioni di soggetti differivano per età, sesso, estrazione sociale, stile di vita, razza ed area geografica di provenienza, diagnosi clinica primaria e comorbidità presenti all'arruolamento e nel corso dello studio, tipo di intervento (diversi dosaggi e forme di vitamina E venivano usate), ecc. Quindi anche se molte di queste variabili erano considerate ed in qualche misura corrette, appare alquanto improbabile che si possa ottenere una stima precisa dell'effetto della supplementazione con vitamina E sia

esso positivo od avverso, a meno che questo non sia eclatante. Si noti che nella metanalisi di Miller *et al.* si è stimato un aumento del rischio di morte inferiore al 5% che è un valore troppo piccolo per fugare i suddetti dubbi metodologici ed interpretativi. D'altronde per un evento di tali proporzioni si dovrebbe ipotizzare che alcuni soggetti, e quindi una sottopopolazione di pazienti cardiovascolari, sia suscettibile di un effetto negativo da parte della vitamina E, ma ciò non è emerso in nessuno dei singoli considerati in questa metanalisi.

A fianco di queste considerazioni, va sottolineata con chiarezza l'assenza di efficacia della supplementazione con vitamina E nella prevenzione secondaria cardiovascolare. Questo è il vero e più importante messaggio che emerge da questa metanalisi e dai trial che essa ha valutato, saggiando in definitiva centinaia di migliaia di soggetti su scala mondiale. Quindi l'"effetto Miller" ha avuto il merito di richiamare l'attenzione della comunità scientifica verso il problema dell'utilizzo indiscriminato e superficiale di supplementi ed integratori a base di vitamina E ed anche di altra natura.

Da un punto di vista metodologico, la ricerca clinica ha chiarito nel suo complesso che il ruolo di fattore vitaminico della vitamina E così come l'abbiamo studiata fino

ad oggi (e quindi dell' α -tocoferolo di sintesi) non andrebbe confuso con, od arbitrariamente estrapolato e divulgato come, un possibile ruolo terapeutico.

È altresì vero che non abbiamo conoscenze sufficienti ad escludere definitivamente un ruolo di protezione e prevenzione cardiovascolare da parte della vitamina E, dei suoi derivati metabolici ed analoghi. Proprio le forme naturali minori di questa vitamina (ad esempio il γ -tocoferolo ed i tocotrienoli), potrebbero essere utili a progettare una nuova e più promettente generazione di trial clinici. Va inoltre considerato che alcune patologie potrebbero giustificare un razionale clinico e molecolare più consistente di quello sino ad oggi proposto per l'utilizzo di vitamina E come agente preventivo nel rischio cardiovascolare. È proprio dei mesi scorsi uno studio pubblicato sulla rivista "New England Journal of Internal Medicine" che ha suggerito in uno studio randomizzato controllato in doppio cieco, l'efficacia della supplementazione orale di vitamina E (800 UI/die per un periodo di due anni) nella correzione di alcuni sintomi istologici della steatoepatite non-alcolica (59).

È auspicabile che nuovi trial, adottino strumenti di ricerca clinica e di laboratorio più efficaci quali, ad esempio, nuove strategie di randomizzazione che tengano maggior

conto di fattori genetici e nutrizionali utili a definire eventuali popolazioni di "responder" e "non-responder", e che includano indicatori di compliance biochimica, farmacologica e clinica utili a stimare l'efficacia dell'intervento nutrizionale. Un aspetto chiave da considerare è anche quello del timing dell'intervento (60). Per i trial sulla vitamina E (ed anche su molte altre molecole), ad oggi, non disponiamo di conoscenze e strumenti utili ad affrontare in modo efficace tutti questi aspetti.

Conclusioni

Le evidenze prodotte dallo studio di metanalisi di Miller et al. (41) e di altri studi che lo hanno seguito (vedi nei paragrafi precedenti) devono essere considerate con estrema cautela. L'aumento del rischio di mortalità in soggetti supplementari con vitamina E è ben lontano dall'essere un dato certo e pertanto va considerato alla stregua di un'ipotesi di studio, che peraltro appare anche molto poco probabile.

A parere degli autori di questo contributo, di eminenti epidemiologi e statistici, e della gran parte dei colleghi che fanno parte della comunità scientifica che studia questa vitamina e che nell'Agosto 2009 si sono riuniti a Roma in occasione del convegno internazio-

nale *Vitamin E Satellite Symposium* della *Society for Free Radical Research-Europe* (30, 61), queste non sono da considerare evidenze cliniche ma interpretazioni che dovranno essere confermate con futuri trial clinici appositamente disegnati per stimare i rischi della supplementazione con vitamina E. A latere di questa conclusione, si sottolinea che:

1. alla luce dei trial clinici ad oggi condotti vi è sostanziale assenza di evidenza rispetto all'efficacia preventiva della supplementazione di vitamina E verso le principali malattie associate all'invecchiamento ed in primis delle forme più rilevanti di malattia cardiovascolare su base atero-trombotica;
2. questa mancanza di evidenza deve portare tutta la comunità scientifica e gli operatori sanitari a tutti i livelli a non raccomandare l'assunzione di supplementi a base di vitamina E in forma sintetica ed a dosi elevate (allo stato attuale delle conoscenze e della normativa vigente il valore di UL ed ADI per la forma naturale della vitamina E come α -tocoferolo equivalenti sono rispettivamente di 300 mg/die e 0,15-2 mg/kg peso/die).

Questo tipo di atteggiamento applica il ben noto principio di precauzionalità in medicina che il legislatore ha considerato anche nel valutare le problematiche relative

alla regolamentazione su nutraceutici, cibi funzionali e supplementi dietetici (51). Nel caso della supplementazione con vitamina E, l'azione precauzionale consiste nell'evitare di raccomandare qualcosa che da un lato dobbiamo ritenere con buona approssimazione clinicamente inefficace, e che dall'altro non possiamo escludere produca effetti avversi. Questo atteggiamento va applicato a tutti gli altri fattori essenziali ed oligoelementi usati come supplementi alla dieta di tipo antiossidante ed anche di altra natura (53). Come nel caso della vitamina E, questi vanno assunti nelle dosi raccomandate (ove queste siano note) e se possibile associati agli alimenti nella loro forma naturale. Tra l'altro, per quanto concerne la vitamina E, questa si trova in particolare negli alimenti di origine vegetale che dovrebbero rappresentare la base di uno stile alimentare sano. Il raggiungimento dei livelli di RDA e quindi di livelli ottimali in circolo e nei tessuti può essere ottenuto abbastanza facilmente con una dieta equilibrata e ricca di alcune classi di alimenti vegetali facilmente reperibili.

Ringraziamenti

Questo lavoro è stato supportato dalla Fondazione Italiana per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica (Grant FFC# 13/2008) con il contributo di "Jump Italia".

Bibliografia

1. Manor D, Morley S. (The alpha-tocopherol transfer protein. *Vitam Horm* 2007; 76, 45-65.
2. Ouahchi K, Arita M, Kayden H, et al. Ataxia with isolated vitamin E deficiency is caused by mutations in the alpha-tocopherol transfer protein. *Nat Genet* 1995; 9: 141-5.
3. Evans HM, Bishop KS. On the Existence of a Hitherto Unrecognized Dietary Factor Essential for Reproduction. *Science* 1922; 56: 650-1.
4. Galli F, Azzi A. Present trends in vitamin E research. *Biofactors* 2010; 36: 33-42.
5. Zingg JM, Azzi A, Meydani M. Genetic polymorphisms as determinants for disease-preventive effects of vitamin E. *Nutr Rev* 2008; 66: 406-14.
6. Castellini C, Mourvaki E, Dal Bosco A, and Galli F. Vitamin E biochemistry and function: a case study in male rabbit. *Reprod Domest Anim* 2007; 42: 248-56.
7. Traber MG, Burton GW, Hamilton RL. Vitamin E trafficking. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1031: 1-12.
8. Burton GW, Traber MG, Acuff RV, et al. Human plasma and tissue alpha-tocopherol concentrations in response to supplementation with deuterated natural and synthetic vitamin E. *Am J Clin Nutr* 1998; 67, 669-84.
9. Gao X, Martin A, Lin H, Bermudez OI, Tucker KL. alpha-Tocopherol intake and plasma concentration of Hispanic and non-Hispanic white elders is associated with dietary intake pattern. *J Nutr* 2006; 136: 2574-9.
10. Galli F, Floridi AG, Floridi A, Buoncristiani U. Accumulation of vitamin E metabolites in the blood of renal failure patients. *Clin Nutr* 2004; 23: 205-12.
11. Galli F, Coli R, Cristofori M. Principali determinanti di salute in Umbria: L'alimentazione. In *La Salute in Umbria: Documento di Valutazione sui determinanti di Salute e sulle Strategie del servizio sanitario regionale* Vol. Volume A, Edizioni SEDES, Perugia, 2006.
12. Hensley K, Benaksas EJ, Bolli R, et al. New perspectives on vitamin E: gamma-tocopherol and carboxyethylhydroxychroman metabolites in biology and medicine. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 1-15.
13. Galli F, Lee R, Dunster C, Kelly FJ. Gas chromatography mass spectrometry analysis of carboxyethylhydroxychroman metabolites of alpha- and gamma-tocopherol in human plasma. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 333-40.
14. Vatassery GT, Fahn S, Kuskowski MA. Alpha tocopherol in CSF of subjects taking high-dose vitamin E in the DATATOP study. *Parkinson Study Group. Neurology* 1998; 50: 1900-2.
15. Roxborough HE, Burton GW, Kelly FJ. Inter- and intra-individual variation in plasma and red blood cell vitamin E after supplementation. *Free Radic Res* 2000; 33, 437-45.
16. Iuliano L, Micheletta F, Maranghi M, Frati G, Diczfalusy U, Violi F. Bioavailability of vitamin E as function of food intake in healthy subjects: effects on plasma peroxide-scavenging activity and cholesterol-oxidation products. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: E34-37.
17. Corradini SG, Micheletta F, Natoli S, et al. High preoperative recipient plasma 7beta-hydroxycholesterol is associated with initial poor graft function after liver transplantation. *Liver Transpl* 2005; 11: 1494-504.
18. Ueda N, Suzuki Y, Rino Y, et al. Correlation between neurological dysfunction with vitamin E deficiency and gastrectomy. *J Neurol Sci* 2009.
19. Di Sario A, Candelaresi C, Omenetti A, Benedetti A. Vitamin E in chronic liver diseases and liver fibrosis. *Vitam Horm* 2007; 76: 551-73.

20. Luo M, Estivariz CF, Schleicher RL, et al. Prospective analysis of serum carotenoids, vitamin A, and tocopherols in adults with short bowel syndrome undergoing intestinal rehabilitation. *Nutrition* 2009; 25, 400-7.
21. Iuliano L, Monticolo R, Straface G, et al. Association of cholesterol oxidation and abnormalities in fatty acid metabolism in cystic fibrosis. *Am J Clin Nutr* 2009; 90, 477-84.
22. Rigotti A. Absorption, transport, and tissue delivery of vitamin E. *Mol Aspects Med* 2007; 28: 423-36.
23. Traber MG. Vitamin E regulatory mechanisms. *Annu Rev Nutr* 2007; 27: 347-62.
24. Galli F, C. Polidori M, Stahl W, Mecocci P, Kelly FJ. Vitamin E biotransformation in humans. *Vitam Horm* 2007; 76: 263-80.
25. Galli F, Lee R, Atkinson J, Floridi A, Kelly FJ. (2003) gamma-Tocopherol biochemistry and transformation in humans. *Free Radic Res* 2003; 37: 1225-33.
26. Zingg JM. Molecular and cellular activities of vitamin E analogues. *Mini Rev Med Chem* 2007; 7: 543-58.
27. Heaney RP. Vitamin D: criteria for safety and efficacy. *Nutr Rev* 2008; 66: S178-181.
28. Jones G. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. *Am J Clin Nutr* 2008; 88: 582S-586S.
29. Penniston KL, Tanumihardjo SA. The acute and chronic toxic effects of vitamin A. *Am J Clin Nutr* 2006; 83: 191-201.
30. Brigelius-Flohe R, Galli F. Vitamin E: a vitamin still awaiting the detection of its biological function. *Mol Nutr Food Res* 2010; 54: 583-7.
31. Mustacich DJ, Gohil K, Bruno RS, et al. Alpha-tocopherol modulates genes involved in hepatic xenobiotic pathways in mice. *J Nutr Biochem* 2009; 20: 469-76.
32. Brigelius-Flohe R. Vitamin E and drug metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305: 737-40.
33. Traber MG. Vitamin E and K interactions - a 50-year-old problem. *Nutr Rev* 2008; 66: 624-9.
34. Wheldon GH, Bhatt A, Keller P, Hummler H. (1983) d,1-alpha-Tocopherol acetate (vitamin E): a long term toxicity and carcinogenicity study in rats. *Int J Vitam Nutr Res* 1983; 53: 287-96.
35. Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med* 2007; 43: 4-15.
36. Azzi A. Molecular mechanism of alpha-tocopherol action. *Free Radic Biol Med* 2007; 43: 16-21.
37. Traber MG, Frei B, Beckman JS. Vitamin E revisited: do new data validate benefits for chronic disease prevention? *Curr Opin Lipidol* 2008; 19: 30-8.
38. Galli F, Iuliano L. Do statins cause myopathy by lowering vitamin E levels? *Medical Hypotheses* In press, 2009.
39. Arca M, Natoli S, Micheletta F, et al. Increased plasma levels of oxysterols, in vivo markers of oxidative stress, in patients with familial combined hyperlipidemia: reduction during atorvastatin and fenofibrate therapy. *Free Radic Biol Med* 2007; 42: 698-705.
40. Bell SJ, Grochoski GT. How safe is vitamin E supplementation? *Crit Rev Food Sci Nutr* 2008; 48: 760-74.
41. Miller ER 3rd, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, Guallar E. Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med* 2005; 142: 37-46.
42. Guallar E, Hanley DF, Miller ER 3rd. An editorial update: Annus horribilis for vitamin E. *Ann Intern Med* 2005; 143: 143-5.
43. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *Jama* 2007; 297: 842-57.
44. Gerss J. The association of vitamin E supplementation and mortality - Finally consistent results of statistical analysis. Re: The questionable association of vitamin E supplementation and mortality - Inconsistent results of different meta-analytic approaches. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* In press, 2010.
45. Miller ER 3rd, Guallar E. Vitamin E supplementation: what's the harm in that? *Clin Trials* 2009; 6, 47-49; discussion 50-41.
46. Leppala JM, Virtamo J, Fogelholm R, et al. Controlled trial of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on stroke incidence and mortality in male smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 230-5.
47. EFSA, E. F. S. A. Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission on mixed tocopherols, tocotrienol tocopherol and tocotrienols as sources for vitamin E. In (EFSA, E. F. S. A. - ed) Vol. 640 pp. 1-34, The EFSA Journal, 2008.
48. Betti M, Ambrogini P, Minelli A, et al. Maternal dietary loads of alpha-tocopherol depress protein kinase C signaling and synaptic plasticity in rat postnatal developing hippocampus and promote permanent deficits in adult offspring. *J Nutr Biochem* 2010.
49. Hathcock JN, Azzi A, Blumberg J, et al. Vitamins E and C are safe across a broad range of intakes. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 736-45.
50. Allegrucci M. Principi di tossicologia. In *Tossicologia: principi ed applicazioni all'uso dei farmaci e dei prodotti della salute* (Ghini, P., ed) pp. 1-13, Edizioni Minerva Medica, S.p.A., Torino, 2009.
51. Coppens P, da Silva MF, Pettman S. European regulations on nutraceuticals, dietary supplements and functional foods: a framework based on safety. *Toxicology* 2006; 221: 59-74.

52. Clarke MW, Burnett JR, Croft KD. Vitamin E in human health and disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2008; 45: 417-50.
53. Lichtenstein AH, Appel LJ, Brands M, et al. Diet and lifestyle recommendations revision 2006: a scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation* 2006; 114: 82-96.
54. Dotan Y, Pinchuk I, Lichtenberg D, Leshno M. Decision analysis supports the paradigm that indiscriminate supplementation of vitamin E does more harm than good. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 1304-9.
55. Berry D, Wathen JK, Newell M. Bayesian model averaging in meta-analysis: vitamin E supplementation and mortality. *Clin Trials* 2009; 6: 28-41.
56. Gerss J, Kopcke W. The questionable association of vitamin E supplementation and mortality - inconsistent results of different meta-analytic approaches. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2009; 55 Suppl: OL1111-1120
57. Greenland S. Weaknesses of Bayesian model averaging for meta-analysis in the study of vitamin E and mortality. *Clin Trials* 2009; 6, 42-46; discussion 50-41.
58. Greenland S. Ecologic versus individual-level sources of bias in ecologic estimates of contextual health effects. *Int J Epidemiol* 2001; 30: 1343-50.
59. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, et al. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2010; 362: 1675-85.
60. Hensley K. The importance of getting a good start: gestational nutrition interacts with adult nutrition to affect function of the aging brain. *Neurobiol Dis* 2009; 35: 1-2.
61. Galli F. Vitamin E Satellite Symposium (VESS) associated to the Annual Meeting of the SFRR-Europe, Rome, 26 August, 2009. *Free Radic Res* 2009.