UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FCF/FEA/FSP
Programa de Pós-Graduação Interunidades
em Nutrição Humana Aplicada - PRONUT

Impacto da dieta cetogênica nas características oxidativas, físicas e lipídicas de lipoproteínas de crianças e adolescentes com epilepsia refratária

Patricia Azevedo de Lima

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Orientadora: Profª. Dra. Nágila Raquel Teixeira Damasceno

São Paulo

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FCF/FEA/FSP
Programa de Pós-Graduação Interunidades
em Nutrição Humana Aplicada - PRONUT

Impacto da dieta cetogênica nas características oxidativas, físicas e lipídicas de lipoproteínas de crianças e adolescentes com epilepsia refratária

Patricia Azevedo de Lima

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Orientadora: Profª. Dra. Nágila Raquel Teixeira Damasceno

São Paulo

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Lima, Patrícia Azevedo de
Impacto da dieta cetogênica nas características oxidativas, físicas e lipídicas de lipoproteínas de crianças e adolescentes com epilepsia refratária / Patrícia Azevedo de Lima. – São Paulo, 2014.
174 p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, 2014.
Orientador: Nágila Raquel Teixeira Damasceno.

1. Dieta cetogênica 2. Epilepsia refratária 3. Tamanho de lipoproteínas I. Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública. II. Título.

CDD – 613.2

Patricia Azevedo de Lima

Impacto da dieta cetogênica nas características oxidativas, físicas e lipídicas de lipoproteínas de crianças e adolescentes com epilepsia refratária

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profª. Dra. Nágila Raquel Teixeira Damasceno

orientador/presidente

_____

1° Examinador

_____

2° Examinador

São Paulo, _____de_____de 2014.

DEDICATÓRIA

Ao meu noivo, Flavio Masuda, que sempre me apoiou mesmo quando teve vontade de sair correndo. Por todo seu carinho, dedicação e zelo.

Ao meu pai, Francisco, por me ensinar que vale a pena ter determinação.

A minha mãe, Maria, pelo seu carinho e simplesmente por confiar em mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado capacidade para desenvolver esta pesquisa e concluir mais esta etapa.

À minha orientadora, Profa. Nágila Raquel Teixeira Damasceno, por me acompanhar desde a graduação me fazendo gostar cada dia mais do ensino e da pesquisa. Por me ensinar a questionar, a planejar e construir.

A nutricionista Daniela Murakami e a Neuropediatra Leticia Sampaio do Instituto da Criança, por apoiarem esta pesquisa e permitirem a minha participação de forma ativa no Ambulatório.

As representantes do Serviço de Nutrição e Dietética, Ana Paula Alves da Silva e Andréa Gislene do Nascimento pela oportunidade do meu crescimento profissional e por apoiarem esta pesquisa.

A Profa. Dra. Maria Joaquina Marques Dias e as nutricionistas Maria Aparecida Vieira e Paola Dolce que permitiram o início do meu aprendizado com a dieta cetogênica.

A aluna de iniciação científica, Mariana P. Baldini, por sempre ser tão comprometida e dedicada com tudo. Por ter abraçado este projeto.

Às técnicas de laboratório Geni, Rosana e Liânia, por sempre estarem dispostas a ajudar.

A Profa. Dulcinéia Saes Parra Abdalla, do Laboratório de Bioquímica Clínica da FCF-USP por doar gentilmente os anticorpos utilizados nas análises.

A todos os alunos da Profa. Nágila (Flavia, Augusto, Caroline Pappiani, Camila, Diana, Thais, Marlene, Giusi, Caroline Oliveira, Ângela, Elisa, Laura), por compartilhar conhecimento, dúvidas, aflições e soluções. Por permitirem que minl vivência acadêmica fosse além do meu projeto.

Em especial agradeço ao Antônio Augusto Ferreira Carioca, Caroline Pappiani, Maria Camila Pruper e Marlene Aldin por me auxiliarem nas análises bioquímicas.

As crianças, adolescentes e responsáveis que permitiram que essa pesquisa acontecesse.

A FAPESP pelo incentivo a esta pesquisa com a concessão de bolsa sob o processo n° 2012/03775-0.

Ao INCT-FCx-USP e NAP-FCx-USP pelo apoio financeiro as análises desse projeto.

RESUMO

Lima PA. Impacto da dieta cetogênica nas características oxidativas, físic lipídicas de lipoproteínas de crianças e adolescentes com epilepsia refratária [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Economia e Administração, Faculdade de Saúde Pública da USP; 2014.

Introdução - A dieta cetogênica (DC) é um tratamento não farmacológico prescrito especialmente para crianças e adolescentes com epilepsia refratária. **Objetivo** – Avaliar o impacto da dieta cetogênica clássica nas características oxidativas, físicas e lipídicas das lipoproteínas de crianças e adolescentes com epilepsia refratária. **Métodos –** Ensaio clínico não controlado de séries temporais com recrutamento de crianças e adolescentes com epilepsia refratária de 1 a 19 anos de ambos os sexos do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da FMUSP. Parâmetros bioquímicos foram analisados: perfil lipídico, concentração de ácidos graxos não esterificados (AGNEs), LDL eletronegativa [LDL(-)], Anticorpo anti-LDL(-), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), subfrações da lipoproteína de alta densidade (HDL) e lipoproteína de baixa densidade (LDL). Além das análises bioquímicas foram avaliadas medidas antropométricas para classificação do estado nutricional, medidas de composição corporal por bioimpedância elétrica e consumo alimentar por registro alimentar de 3 dias. Todas essas medidas foram coletadas antes da DC (T=0), 3 meses após a DC (T1) e 6 meses após a DC (T2). **Resultados** – A concentração de colesterol total (CT), triacilgliceróis (TG), LDL, HDL, apolipoproteínas (APO A-I e APOB) e não-HDL aumentaram significativamente nos momentos T1 e T2. As razões CT/HDL, LDL/HDL e APOB/APOA-I também apresentaram aumento significativo indicando aumento superior das lipoproteínas e apolipoproteínas mais aterogênicas. Apesar desses aumentos, nenhuma dessas relações ou concentração de lipoproteínas e apolipoproteínas apresentaram aumento progressivo comparando-se T1 versus T2. De modo contrário, observamos aumento progressivo ao longo do tempo na concentração de AGNEs, partículas pequenas de LDL e redução no tamanho médio da LDL de 27,3 nm no T0 versus 26,7 nm no T2. A concentração de TBARs aumentou enquanto a LDL(-) reduziu. A classificação do estado nutricional bem como o % de massa magra e % de massa gorda não mudaram ao longo do tempo. **Conclusões –** A DC apresentou impacto negativo no metabolismo lipídico contribuindo com o aumento de partículas pequenas de LDL e um fenótipo mais aterogênico.

Descritores: Dieta cetogênica, Epilepsia refratária, Tamanho de lipoproteínas, Oxidação, Estado nutricional

ABSTRACT

Lima PA. Impact of the ketogenic diet on oxidative, physical and lipid characteristics of lipoproteins in children and adolescents with refractory epilepsy [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Economia e Administração, Faculdade de Saúde Pública da USP; 2014.

Introduction - The ketogenic diet (KD) is a non-pharmacological treatment prescribed for children and adolescents with refractory epilepsy. **Objective** – To assess the impact of the classic ketogenic diet in the oxidative, physical and lipid lipoprotein characteristics of children and adolescents with refractory epilepsy. **Methods –** Single arm, times series trial with recruitment of children and adolescents 1-19 years of both sexes of the Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da FMUSP, after doctor indication for treatment with KD. Biochemical parameters were analyzed: lipid profile, level of non esterified fatty acids (NEFAS), LDL electronegative [LDL (-)], anti-LDL (-), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), subfractions of high density lipoprotein (HDL), subfractions of low density lipoprotein (LDL) and LDL size. In addition, anthropometric measurements for classification of nutritional status, body composition by bioimpedance electrical and dietary intake through food records evaluated in 3 days. All these measures were collected before the KD (T = 0), three months after the KD (T1) and 6 months after KD (T2). **Results -** The level of total cholesterol (TC), triglycerides (TG), LDL, HDL, apolipoproteins (Apo A-I and Apo B) and non-HDL increased significantly in T1 and T2. The rations TC/HDL, LDL/HDL and APOB/APO A-I also showed a significant increase indicating higher increase in lipoproteins and apolipoproteins atherogenic. Despite these increases, any such rations or levels of lipoproteins and apolipoproteins progressive increase comparing T1 versus T2. Conversely, we observed a progressive increase along time in the levels of NEFAS, small LDL and reduction of LDL size of 27.3 nm (T0) to 26.7 nm (T2). The levels of TBARS increased while LDL (-) reduced. The classification of nutritional status as well as the % of lean mass and % of fat mass didn´t change along time. **Conclusions -** The KD showed a negative impact on lipid metabolism contributing to increased small LDL particles and a more atherogenic phenotype.

Keywords: Ketogenic diet, Refractory epilepsy, Oxidation, Lipoprotein size, Nutritional status

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO **17**

1.1 ETIOLOGIA E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS 17

1.2 CLASSIFICAÇÃO DAS CRISES EPILÉPTICAS 18

1.3 ASPECTOS DIETOTERÁPICOS 19

1.3.1 Absorção de lipídeos e β-oxidação: triacilgliceróis de cadeia longa e cadeia média 20

1.4 MECANISMOS NEUROBIOQUÍMICOS DA DIETA CETOGÊNICA 23

1.5 EFEITOS ADVERSOS AO TRATAMENTO DIETOTERÁPICO 26

1.5.1 Impacto da Dieta Cetogênica na Composição corporal e crescimento 29

1.6 IMPACTO ECONÔMICO:EPILEPSIA E DOENÇA CARDIOVASCULAR 31

1.7 JUSTIFICATIVA 32

1.8 HIPÓTESE 32

2. OBJETIVOS **35**

2.1 GERAL 35

3. MATERIAL E MÉTODOS **37**

3.1 CASUÍSTICA 37

3.2 TAMANHO DA AMOSTRA 38

3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO e NÃO INCLUSÃO 38

3.4 ANÁLISE DE RISCOS E BENEFÍCIOS 39

3.5 PERFIL SOCIOECONÔMICO E CLÍNICO 39

3.6 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA E COMPOSIÇÃO CORPORAL 40

3.7 CÁLCULO DA DIETA E PROTOCOLO DE ORIENTAÇÃO 41

3.8 AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR 43

3.9 ADESÃO A DIETA CETOGÊNICA 44

3.9.1 Determinação de β-hidroxibutirato 45

3.10 OBTENÇÃO DE SANGUE 45

3.11 DETERMINAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO 46

3.12 DETERMINAÇÃO DAS APOLIPOPROTEÍNAS 47

3.13 DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS NÃO ESTERIFICADOS 47
3.14 SEPARAÇÃO DE LDL(-) .....
3.15 DETECÇÃO DE LDL(-) 48
3.16 DETECÇÃO DE AUTO-ANTICORPOS ANTI-LDL(-) NO PLASMA 49
3.17 SUBFRAÇÕES DE LDL E HDL E TAMANHO DE LDL 49
3.18 DETECÇÃO DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS) 50
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA 52
5. RESULTADOS 55
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA 55
5.1.1 Perfil Socioeconômico e clínico 57
5.2 EFEITO DA DC NAS CRISES EPILÉPTICAS 60
5.3 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA E COMPOSIÇÃO CORPORAL 62
5.4 ADESÃO A DIETA CETOGÊNICA 65
5.4. 1 Dieta Cetogênica 65
5.4. 2 Cetonúria 65
5.4. 3 Detecção de β-hidroxibutirato 65
5.5 AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR 66
5.6 PERFIL BIOQUÍMICO 69
6. DISCUSSÃO 76
7. CONCLUSÃO 86
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 88
ANEXOS 103
Anexo 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 103
Anexo 2 – Aprovação do Instituto da Criança do HC-FMUSP 105
Anexo 3 – Aprovação do Comitê de Ética da FSP-USP 106
Anexo 4 - Questionário de Identificação e Avaliação Sócioeconômica e Clínica do Paciente 107
Anexo 5 – Classificação das crises epilépticas (ILAE, 2010) 111
Anexo 6 – Exemplo de Dieta Cetogênica 4:1 112
Anexo 7 – Modelo de Registro Alimentar 116

Anexo 8 – Manuscrito 1 117

Anexo 9 – Manuscrito 2 136

Anexo 10 – Manuscrito 3 156

Lista de Tabelas

TABELA 1 - Determinação de calorias por quilo de peso corporal (Kcal/Kg) e calorias totais, a partir da idade e peso ideal estimado por Z IMC/I/I 42

TABELA 2 – Cálculo da composição dietética e cronograma de tratamento..... 42

TABELA 3 – Caracterização socioeconômica e demográfica dos participantes. Instituto da Criança – HC-FMUSP, São Paulo, 2014. 58

TABELA 4 – Etiologia da epilepsia e classificação das crises dos participantes segundo ILAE (2010). Instituto da Criança-HC-FMUSP, São Paulo, 2014 60

TABELA 5 – Percentual de redução de crises segundo tempo de tratamento. Instituto da Criança-HC-FMUSP, São Paulo, 2014 61

TABELA 6 – Frequência e dosagem de antiepilépticos (mg) utilizados pelos participantes segundo tempo de intervenção. Instituto da Criança-HC-FMUSP, São Paulo, 2014 62

TABELA 7 – Caracterização antropométrica e composição corporal por bioimpedância elétrica segundo tempo de intervenção. Instituto da Criança-HC-FMUSP, São Paulo, 2014.... 63

TABELA 8 – Caracterização do consumo de energia, macronutrientes, ácidos graxos e fibras segundo tempo de intervenção. Instituto da Criança-HC-FMUSP, São Paulo, 2014 67

TABELA 9 – Caracterização do consumo de micronutrientes (vitaminas, antioxidantes e minerais) segundo tempo de intervenção. Instituto da Criança-HC-FMUSP, São Paulo, 2014..... 68

TABELA 10 – Perfil bioquímico segundo tempo de intervenção. Instituto da Criança-HC-FMUSP, São Paulo, 2014.....70

Lista de Figuras

FIGURA 1 – Absorção dos triacilgliceróis de cadeia longa e cadeia média no sistema gastrointestinal 22

FIGURA 2 – Produção de corpos cetônicos e possíveis efeitos anticonvulsivos no cérebro 24

FIGURA 3 – Possíveis efeitos da DC no metabolismo lipídico 33

FIGURA 4 – Delineamento do estudo nos diferentes momentos de monitoramento 37

FIGURA 5 – Fracionamento de sangue e realização das análises no plasma 46

FIGURA 6 – Fluxograma de pacientes inclusos e perdas no seguimento 56

FIGURA 7 – Classificação do estado nutricional, segundo Z IMC/I/I (WHO, 2006 e 2007) e soma das dobras (DCT e DCS) segundo Frisancho (1990). Instituto da Criança – HC-FMUSP, São Paulo, 2014. 64

FIGURA 8 – Consumo de energia e lipídeos (Kcal) segundo prescrição, ingestão e tempo de intervenção 65

FIGURA 9 – Detecção de β-hidroxibutirato 66

FIGURA 10 – Mudanças no perfil lipídico clássico e suas relações segundo tempo de intervenção 72

FIGURA 11 – Mudanças nos principais marcadores associados ao estresse oxidativo e concentração de AGNEs segundo tempo de intervenção 73

FIGURA 12 – Mudanças nas subfrações e no tamanho médio de LDL segundo tempo de intervenção 74

Lista de Abreviaturas

A_1R – Receptor de Adenosina

ACTmm – Água corporal total na massa magra

ACTpeso – Água corporal no peso total

AF° – Ângulo de fase

AGM – Ácido monoinsaturado

AGNEs – Ácidos graxos não esterificados

AGP – Ácido graxo poli-insaturado

AGS – Ácido graxo saturado

AI – Água intracelular

AIG – Adequado para idade gestacional

APO A-I – apolipoproteína A-I

APO B – apolipoproteína B

ATP – Adenosina trifosfato

AVE – Acidente Vascular Encefálico

BHB – β-hidroxibutirato

BHE – Barreira hematoencefálica

BIA – Bioimpedância elétrica

CAT – Carnitina acil transferase

CPT – Carnitina palmitoil transferase

CT – Colesterol Total

DAEs – Drogas antiepilépticas

DC – Dieta cetogênica

DCS – Dobra cutânea subescapular

DCT – Dobra cutânea triciptal

DCV – Doenças cardiovasculares

DEXA – Absorciometria radiológica de dupla energia

DHA – Ácido graxo docosahexaenóico

EEG – Eletroencefalograma

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EPA – Ácido graxo eicosapentaenóico

GABA – Ácido γ-aminobutírico

GEE – Equações de Estimação Generalizadas

GLUT-1 – Transportador de glicose 1

HDL – Lipoproteína de alta densidade

IDL – Lipoproteína de densidade intermediária

IMC – Índice de massa corporal

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

LDL (-) – LDL eletronegativa

LDLox – LDL oxidada

MCC – massa celular corporal

ME – massa extracelular

MG – massa gorda

MM – massa magra

MSM – Multiple Source Method

PIG – Pequeno para idade gestacional

R – Resistência

ROS – Espécies reativas ao oxigênio

SNC – Sistema Nervoso Central

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCG – Tônico-clônica generalizada

TCL – Triacilgliceróis de cadeia longa

TCM – Triacilgliceróis de cadeia média

TG – Triacilgliceróis

UCPs – Proteínas desacopladoras

VGLUT – Transportador vesicular de glutamato

VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade

VS – Versus

Xc – Reactância

Z E/I – escore Z de estatura para idade

Z IMC/I – escore Z do índice de massa corporal para idade

Z P/I – escore Z do peso para idade

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 ETIOLOGIA E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

A epilepsia é uma desordem neurológica caracterizada por crises epilépticas que refletem a atividade elétrica anormal, preferencialmente em uma ou várias áreas do córtex cerebral, podendo ser causada por inúmeras disfunções estruturais ou neuroquímicas, como trauma, doenças infecciosas, malformações congênitas, e anormalidades genéticas (FISHER et al., 2005; GITAÍ et al., 2008). As repercussões desta desordem cerebral envolvem consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e consequências sociais (FISHER et al., 2014).

A etiologia da epilepsia pode ser classificada em quatro categorias: epilepsia sintomática – associada a anomalias patológicas e anatômica; epilepsia provocada – associada a um fator sistêmico ou ambiental desencadeante, epilepsia criptogênica – de natureza sintomática em que a causa não foi identificada e, epilepsia idiopática – predominantemente genética em que não há anormalidade neuroanatômica ou neuropatológica identificada (SHORVON, 2011). Assim, mutações genéticas são constantemente associadas à etiologia da epilepsia, sendo também associadas as epilepsias sintomáticas e criptogênicas, entretanto muitos desses genes ainda não foram identificados (LOWENSTEIN e HELBIG, 2013).

Segundo LEONARDI e USTUN (2002), a prevalência da epilepsia era de 0,5% a 1,0% da população nos países desenvolvidos, podendo essa ser maior nos países em desenvolvimento. Recentemente a Organização Mundial da Saúde estimou que 0,7% da população mundial apresenta epilepsia, ou seja, 50 milhões de indivíduos, sendo que 80% vivem em países em desenvolvimento (WHO, 2012).

O Ministério da Saúde não possui estudos nacionais que estimem a prevalência e incidência de epilepsia no Brasil. Em 2005, NETO e MARCHETTI, baseados em estudos internacionais estimaram que aproximadamente 1,8 milhões de brasileiros apresentavam epilepsia ativa e 9 milhões já apresentaram crises epilépticas 1 vez na vida, considerando uma estimativa de 177.450.609 brasileiros na época.

O estudo realizado na comunidade de Paraisópolis no estado de São Paulo verificou prevalência de 9,7 em 1000 crianças e adolescentes (SAMPAIO, 2009). Mais recentemente,

em estudo de coorte, NUNES et al., (2011) encontraram prevalência de 5,3 em 1000 crianças nascidas na cidade de Passo Fundo, Rio Grande do Sul.

O levantamento de óbitos por epilepsia em brasileiros feito no período de 1980 a 2003 mostrou redução de 20,35% do coeficiente de mortalidade por epilepsia (1,13/100.000 em 1980 para 0,9/100.000 em 2003) (FERREIRA e SILVA, 2009). Essa redução pode ser relacionada a melhor e maior disponibilidade das drogas antiepilépticas.

Na maioria dos casos a base do tratamento da epilepsia consiste do uso de drogas antiepilépticas. No entanto, 20% a 30% das crianças acometidas têm crises epilépticas refratárias a essas drogas (KOSSOFF et al., 2009). A baixa ou ausente eficácia das drogas nestas crianças eleva as chances de óbito para nove vezes mais do que naquelas com crises controladas (HAUSER e HESDORFFER, 2001).

O estudo holandês de CALLENBACH et al., (2001), encontrou taxa de mortalidade de 3,8/1000 ao ano em crianças com epilepsia refratária. As possíveis causas de morte incluem: pneumonia aspirativa, afogamento acidental, morte súbita inexplicável, o estado epiléptico, complicações com o tratamento medicamentoso ou por morbidades como doença neurodegenerativa e tumor cerebral (APPLETON, 2003).

A morte súbita parece ser causa de óbito frequente na epilepsia refratária, podendo ocorrer em 2 a 5 casos/1000 ao ano, diferentemente de pacientes com crises controladas (< 1 caso/1000 ao ano) (HAUSER e HESDORFFER, 2001).

1.2 CLASSIFICAÇÃO DAS CRISES EPILÉPTICAS

As crises epilépticas são resultantes da ocorrência isolada ou simultânea de dois ou mais fenômenos no cérebro. Embora a etiologia da epilepsia seja relacionada aos tipos de crises, mesmo as epilepsias com causas desconhecidas podem ter as crises caracterizadas com base nos achados clínicos, exames de eletroencefalograma e de imagem (SHORVON, 2011).

Segundo a Comissão de Classificação e Terminologia da Liga Internacional contra Epilepsia (ILAE, 2010), as crises, podem ser classificadas como generalizadas, focais e em espasmos epilépticos.

As formas generalizadas manifestam-se por crises epilépticas cujo início envolve ambos os hemisférios cerebrais simultaneamente e podem incluir as estruturas corticais e sub-corticais, mas não necessariamente o córtex inteiro. Essas crises também podem ser

assimétricas e tanto a localização como a lateralização não são consistentes de uma crise para outra. Crises de ausência, crises mioclônicas e crises tônico-clônicas generalizadas (TCG) são seus principais exemplos (ILAE, 2010).

As crises focais são conceitualmente limitadas a um hemisfério e iniciam-se consistentemente de forma localizada numa área específica do cérebro, e suas manifestações clínicas dependem do local de início e da velocidade de propagação da descarga. Apesar de o início ser localizado em um hemisfério, os padrões de propagação preferencial podem envolver o hemisfério contralateral (ILAE, 2010).

Os espasmos epilépticos também são inclusos na classificação, mas não são agrupados nem como crises generalizadas ou focais, e sim se apresentam em outro grupo determinado até o momento como desconhecido (ILAE, 2010). Os espasmos consistem em uma súbita flexão, extensão ou misto de flexão-extensão dos músculos predominantemente proximais e do tronco, que normalmente é mais sustentado que o movimento de uma crise mioclônica, mas não mais sustentado que uma crise tônica (ILAE, 2001).

1.3 ASPECTOS DIETOTERÁPICOS

Na época de Hipócrates, no século cinco antes de Cristo, o jejum foi indicado para cura da epilepsia (WHELESS, 2008). Na Bíblia, Evangelho de São Mateus, há o relato de Jesus Cristo ter dito aos discípulos que para a cura de um epiléptico é preciso jejum e oração (Mt 17:14-21).

Posteriormente, no século XX o conceito de dieta cetogênica foi estabelecido e considerado como tratamento alternativo não farmacológico (WILDER, 1921). Atualmente, a Dieta Cetogênica (DC) é prescrita especialmente para crianças, na maioria dos centros especializados, que apresentam refratariedade a pelos menos duas drogas de primeira linha (INUZUKA-NAKAHARA, 2008).

A composição da DC é baseada no alto teor de gorduras, baixo teor de carboidratos e teor proteico moderado, sendo o catabolismo de gordura a fonte primária de energia e, consequentente, responsável pela produção de corpos cetônicos, que parecem estar envolvidos no mecanismo terapêutico do controle das crises (LEE e KOSSOFF, 2011).

Os benefícios da DC como tratamento apresentam redução acima de 50% das crises epilépticas, o que é considerado relevante clinicamente (PORTA et al., 2009; KINDEREN et al., 2011).

Em um estudo prospectivo, conduzido em centro de referência do Estado de São Paulo avaliou-se 54 crianças sob tratamento de epilepsia refrataria com DC. Os resultados mostraram redução superior a 75% das crises em 57,4% das crianças, e redução de 50-75% das crises em 31,4% das crianças, além da ocorrência rara de efeitos adversos como náuseas, vômitos e hipoglicemia, demonstrando a eficácia da dieta na epilepsia refratária (FREITAS et al., 2007).

Na evidência de resultados positivos, o tempo médio de tratamento com a DC é de 2 a 3 anos e essa deve ser descontinuada após este período. Os riscos e benefícios devem ser avaliados se a decisão for manter o tratamento por um período maior (KOSSOFF et al., 2009).

A introdução da DC segue prescrições específicas (proporção de gorduras para carboidratos e proteínas) e o controle das crises geralmente ocorre quando esta proporção é 3:1, sendo 4:1 a proporção mais comumente utilizada. As dietas com menores proporções (2:1) são normalmente utilizadas na introdução do tratamento (LEE e KOSSOFF, 2011).

O método tradicional para início da DC envolve jejum de 12 a 48 horas, e a produção de cetose que deve ser monitorada na urina (KOSSOFF et al., 2009). Entretanto, atualmente existem trabalhos demonstrando que não é necessária à indução de cetose por jejum para a introdução da dieta; podendo ser realizada ambulatorialmente com proporção menor de gordura (2:1) e evolução desta proporção, conforme estabilização de cetose do paciente (KIM et al., 2004).

1.3.1 Absorção de lipídeos e β-oxidação: triacilgliceróis de cadeia longa e cadeia média

A DC clássica, estabelecida pelo protocolo inicial e mais tradicionalmente utilizada nos tratamentos fornece triacilgliceróis de cadeia longa (TCL) como fonte de gorduras (FREEMAN et al., 1994). Recentemente, a dieta suplementada com triacilgliceróis de cadeia média (TCM), considerados mais cetogênicos, tem sido utilizada em alguns casos, permitindo uma oferta maior de carboidratos e proteínas (NEAL e CROSS, 2010).

O processo de digestão e absorção de lipídios depende das características físico-químicas de seus ácidos graxos, portanto o tamanho da cadeia carbônica influencia diretamente seus efeitos fisiológicos (BACH e BABAYAN, 1982). Os TCM consistem em ácidos graxos saturados com comprimento de cadeia de 6 a 12 carbonos enquanto os TCL são ácidos graxos saturados com cadeia de 14 a 22 carbonos.

Após sofrer a ação da lipase lingual e lipase gástrica, os ácidos graxos no intestino delgado, especialmente no duodeno, sofrem a ação dos sais biliares que intensificam o processo de emulsificação favorecendo posteriormente a ação da lipase pancreática (CAREY et al., 1983). Este processo é característico dos TCL que são absorvidos nos enterócitos e incorporados a quilomícrons atingindo o sistema linfático e, posteriormente, convergem para a circulação sanguínea via artéria subclávia esquerda e ducto portal. Já os TCM apresentam maior biodisponibilidade digestiva. Sua absorção ocorre de maneira independente da secreção pancreática sendo absorvidos diretamente na circulação portal e prontamente oxidados nas mitocôndrias dos hepatócitos (BEERMANN et al., 2003), conforme a **Figura 1**.

Além disso, os ácidos graxos de cadeia longa necessitam da ação da carnitina palmitoil transferase I e II (CPT I e II), pois essas enzimas permitem que os ácidos graxos entrem na mitocôndria, onde serão substratos para a β-oxidação (SHINOHARA et al., 2005). Por sua vez, os ácidos graxos de cadeia média por apresentarem menor tamanho molecular são menos dependentes da atividade da CPT favorecendo sua entrada na mitocôndria.

Embora as diferenças estruturais dos ácidos graxos de cadeia longa e média possam promover respostas cetogênicas distintas, dados de 20 anos de estudos mostraram que não há diferença quanto à eficácia entre ambas as dietas (KOSSOFF et al., 2009).

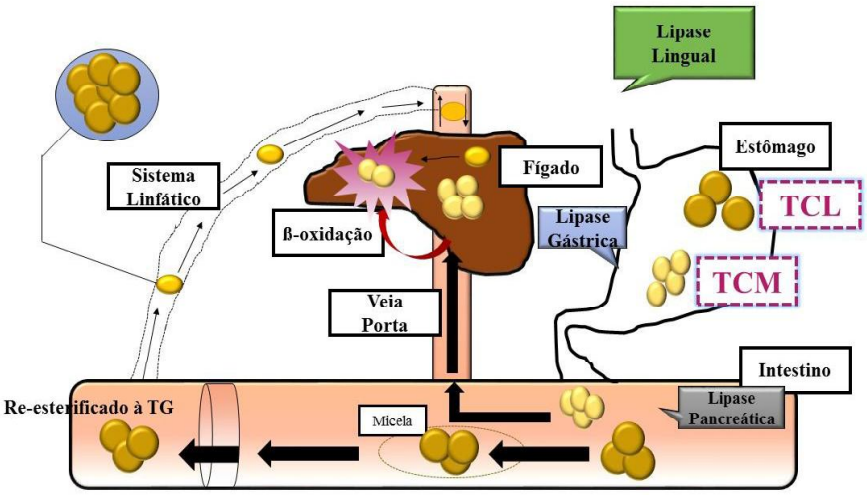


Figura 1: Absorção dos triacilgliceróis de cadeia longa e cadeia média no sistema gastrointestinal. Os TCM e TCL sofrem ação da lipase lingual e gástrica sendo a biodisponibilidade digestiva dos TCM maior que dos TCL. Os TCL sofrem ação emulsificante dos sais biliares facilitando a ação da lipase pancreática. Os ácidos graxos livres e monoacilgliceróis formam complexos com os sais biliares (micelas) permitindo a passagem dos lipídios através do meio aquoso do lúmen intestinal. Na mucosa intestinal grande parte dos ácidos graxos e monoacilgliceróis se une em novos TG (reesterificação). Estes juntamente com o colesterol e os fosfolipídios formam os quilomícrons que são incorporados pelo sistema linfático e posteriormente são captados pelo sistema portal sofrendo a β-oxidação no tecido hepático. Já os TCM atingem a circulação portal após passarem pelos enterócitos sendo transportados ao fígado, ligados fracamente à albumina, sem haver passagem pelo sistema linfático e incorporação em quilomícrons. TCL: triacilgliceróis de cadeia longa; TCM: triacilgliceróis de cadeia média; TG: triacilgliceróis. Adaptado de AYOAMA et al., (2007).

1.4 MECANISMOS NEUROBIOQUÍMICOS DA DIETA CETOGÊNICA

Apesar de quase um século de investigação e da utilização clínica da DC, os mecanismos envolvidos no controle das crises ainda são pouco compreendidos. O efeito anticonvulsivante envolve a produção de corpos cetônicos a partir da oxidação dos ácidos graxos no fígado.

Os ácidos graxos são oxidados na mitocôndria gerando um excesso de acetil-CoA que em baixa concentração de oxaloacetato reduz a velocidade de oxidação pelo ciclo de Krebs, estimulando sua conversão em acetoacetato e, subsequentemente, em acetona e β-hidroxibutirato. Os corpos cetônicos atravessam a barreira hematoencefálica, sendo transportados para o espaço intersticial do cérebro através dos transportadores de ácido monocarboxílico (MCNALLY et al., 2012).

A influência dos corpos cetônicos nos mecanismos anticonvulsivantes vem sendo estudada tanto em modelos experimentais *in vivo* como *in vitro* (FREEMAN et al., 2007*)*. A modulação dos neurotransmissores, potencial de membrana, canais de íons, alteração na concentração das monoaminas biogênicas e ação neuroprotetora, são os principais mecanismos propostos (**Figura 2**).

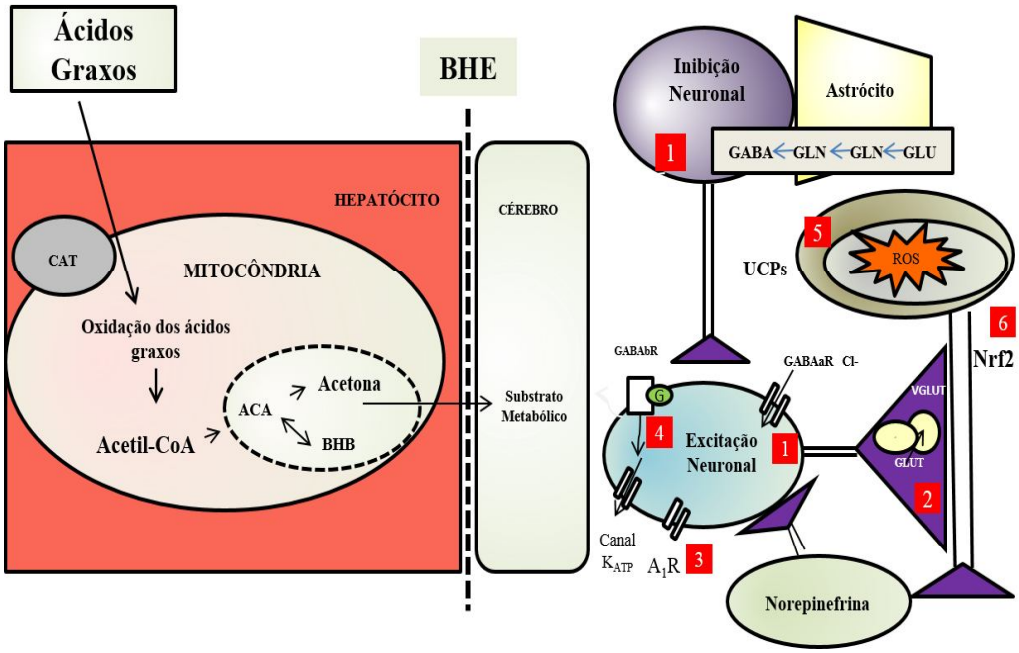


Figura 2: Produção de corpos cetônicos e possíveis efeitos anticonvulsivos no cérebro. Os ácidos graxos provenientes da DC são oxidados e o excesso de Acetil-CoA é convertido em ACA e posteriormente em acetona e β-hidroxibutirato. Os corpos cetônicos atravessam a BHE promovendo o efeito anticonvulsivante. 1- Aumento da síntese de GABA através da alteração do ciclo glutamato-glutamina ou pelo estímulo nos canais de Cl^- (receptor GABAa); 2- Redução de glutamato pela inibição da VGLUT; 3-Alteração nas concentrações das monoaminas biogênicas (norepinefrina, adenosina, dopamina, serotonina); 4- Hiperpolarização neuronal pelos canais de K_{ATP} possivelmente mediada pelo receptor GABAb. 5- Diminuição de ROS por ativação das proteínas desacopladoras (UCPs). 6- Efeito antioxidante por ativação do fator de transcrição (Nrf2). CAT: carnitina acil transferase; ACA:acetoacetato; BHB: β-hidroxibutirato; BHE: barreira hematoencefálica; VGLUT: transportador vesicular de glutamato; A_1R: receptor de adenosina; GABAaR: Receptor alfa do GABA; GABAbR: receptor beta do GABA; ROS: espécies reativas de oxigênio. Adaptada de MCNALLY et al., (2012).

Alterações nas concentrações dos principais neurotransmissores excitatórios e inibitórios (glutamato e ácido γ-aminobutírico – GABA, respectivamente) têm sido propostas como um possível mecanismo de ação da DC (DAHLIN et al., 2005). O GABA é um intermediário do α-cetoglutarato sintetizado no ciclo de Krebs via glutamato e convertido em GABA pela glutamato descarboxilase (MCNALLY et al., 2012). Além disto, os corpos cetônicos reduzem a concentração de aspartato estimulando a glutamato descarboxilase e aumentando a síntese de GABA, otimizando o controle das crises (CHENG et al., 2004).

O modelo *in vitro* de cultura de astrócitos proposto por YUDKOFF et al., (1997), mostrou redução na concentração de aspartato após 1 hora de exposição a acetoacetato ou β-

hidroxibutirato. Outro estudo experimental, usando isótopos de sinaptossomas de ratos expostos a acetoacetato e β-hidroxibutirato mostrou aumento da concentração de GABA (ERENCISKA et al., 1996). Esses resultados também foram semelhantes ao observado em crianças que receberam a DC e passaram a ter aumento significativo da concentração de GABA (DAHLIN et al, 2005).

O aumento da inibição ou redução da excitabilidade, se suficientemente intensa, pode influenciar na função do cérebro, controlando as crises (RUSKIN et al, 2012). A alta concentração de GABA parece estimular os receptores dos canais de cloreto (Cl^-), aumentando o influxo negativo de íons, induzindo a hiperpolarização neuronal (CHENG et al., 2004). Esta hiperpolarização é responsável por inibir a ativação dos canais de cálcio e sódio, atividades necessárias para a excitação neuronal (TANNER et al, 2011). Além disto, a indução da hiperpolarização neuronal também pode ser associada ao aumento da abertura dos canais de K_{ATP} (TANNER et al, 2011).

A razão glutamato-cetose pode modular as funções fisiológicas através dos transportadores vesicular de glutamato (VGLUT), que são responsáveis pelo preenchimento das vesículas pré-sinápticas com glutamato dependente dos canais de Cl^- (JUGE et al., 2010). Este estudo *in vitro* permite mostrar que o cloro é um ativador alostérico do VGLUTs que é competitivamente inibido pelos corpos cetônicos (acetoacetato > β-hidroxibutirato) (JUGE et al., 2010).

As monoaminas biogênicas têm sido investigadas em animais e humanos (WEINSHENKER, 2008; DAHLIN et al., 2012; MARTILOTTI et al, 2006; MASINO et al, 2012). Em modelos animais, a concentração de norepinefrina aumentou em ratos que receberam a DC, enquanto que os ratos que tiveram o transportador de norepinefrina alterado não apresentaram esta mesma resposta (MARTILOTTI et al, 2006). Posteriormente, outro estudo também demonstrou que a concentração de norepinefrina no hipocampo de ratos alimentados com DC foi maior que em ratos alimentados com dieta normal (WEINSHENKER, 2008).

Um estudo clínico (DAHLIN et al., 2012) mostrou redução significativa na concentração de dopamina (de 410 para 342 nmol/L) e serotonina (de 158 para 137 nmol/L) após 3 meses de tratamento, enquanto que a concentração de norepinefrina permaneceu inalterada (de 51,7 para 51,0 nmol/L). As mudanças nessas concentrações também podem ser diferentes em crianças respondedoras e não respondedoras a DC (DAHLIN et al, 2012).

A adenosina é considerada como o principal neuromodulador inibitório das crises epilépticas (MASINO et al., 2009). Esta possibilidade foi reforçada por FEDELE et al.,

(2005), que mostraram convulsões eletrográficas no hipocampo de camundongos transgênicos que tinham deficiência de adenosina. Há evidências sugerindo que a DC exerce efeitos anticonvulsivantes, restaurando a concentração de adenosina e ativação de receptores (A_1R) através de mecanismos relacionados à baixa concentração de glicose (DAHLIN et al., 2012).

A mitocôndria também tem uma função importante no mecanismo de controle das crises pela geração de adenosina trifosfato (ATP), controle de apoptose, manutenção da homeostase de cálcio, e produção e detoxificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (MILDER et al., 2012). No estudo experimental de BOUGH et al., (2006), camundongos mantidos em DC por pelo menos 3 semanas tiveram aumento da biogênese mitocondrial no hipocampo em comparação com os controles, sugerindo uma alternativa nos estoques de energia. Embora o papel antiepiléptico ligado a apoptose não esteja claro, esse mecanismo se deve provavelmente a restrição calórica (MAALOUF et al., 2009). Além da restrição calórica, os corpos cetônicos também têm efeitos antioxidantes e os ácidos graxos ativam as proteínas desacopladoras mitocondriais (UCPs) (MILDER et al., 2012; MAALOUF et al., 2007; SULLIVAN et al., 2004). De acordo com SULLIVAN et al., (2004), a DC pode exercer efeito neuroprotetor pela redução de ROS através da ativação das UCPs. O estudo de revisão de MILDER et al., (2012) mostrou que apesar deste mecanismo não estar claro, além da ativação dessas proteínas, há um estimulo no fator de transcrição Nrf2 que parece estimular os elementos de resposta antioxidante e promover aumento na razão glutationa reduzida/glutationa oxidada.

Desta forma as evidências apontam para um efeito antioxidante da DC no cérebro. Portanto, monitorar essa resposta nos outros compartimentos corporais, como no plasma, pode ampliar o conhecimento sobre os efeitos sistêmicos da DC.

1.5 EFEITOS ADVERSOS AO TRATAMENTO DIETOTERÁPICO

Apesar dos benefícios da DC no controle da epilepsia serem inquestionáveis na literatura, a DC está associada ao desenvolvimento de diversos efeitos adversos como a hiperuricemia, hipocalcemia, acidose metabólica, hipercolesterolemia, litíase renal e alterações gastrointestinais como vômitos, diarreia e constipação intestinal. (KOSSOFF et al., 2009). Dentre esses efeitos, a principal manifestação clínica observada nos estudos são as dislipidemias como demonstrado por CHESNEY et al., (1999), LIU et al., (2003), KWITEROVICH et al., (2003), NIZAMUDDIN et al., (2008). Esses estudos mostraram que

o aumento da lipoproteína de baixa densidade (LDL), assim como de triacilgliceróis (TG) foram os principais efeitos adversos observados no metabolismo lipídico ao longo da intervenção com DC.

No estudo prospectivo de KWITEROVICH et al., (2003) 141 crianças tratadas por mais de 2 anos com DC apresentaram aumento na concentração de colesterol total (CT), TG, LDL e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), além da redução da lipoproteína de alta densidade (HDL), que é um forte indicador anti-aterogênico.

Anteriormente, em 2002, TUMAS avaliou o perfil lipídico de 34 crianças durante o tratamento com a DC por 2 anos e encontrou aumento significativo do CT após 6 meses de intervenção. Esse perfil manteve-se sem variação significativa até os 24 meses. Surpreendentemente, observou-se redução significativa de TG após 6 meses, seguido de aumento significativo até os 24 meses; e elevação progressiva, mas não significativa de LDL e HDL até o final do estudo. Em 2010, esse mesmo autor avaliando 20 crianças desta mesma amostra verificou aumento significativo tanto no CT como na LDL.

A relação entre as dislipidemias e o desenvolvimento das doenças cardiovasculares, particularmente, da aterosclerose, está amplamente documentada na literatura (SBC, 2013). Portanto considerando essas alterações, é provável que crianças e adolescentes submetidos a DC apresentem maior risco cardiometabólico que crianças e adolescentes não submetidos a DC.

Além das alterações no perfil lipídico, os estudos realizados nas últimas duas décadas têm demonstrado que as modificações oxidativas das lipoproteínas bem como o aumento das partículas pequenas de LDL são essenciais à iniciação e progressão da aterosclerose tanto em adultos como em crianças e adolescentes (SEVANIAN et al., 1999; TOSHIMA et al., 2000; e HULTHE e FAGERBERG, 2002). Portanto, esses estudos apontam que o aumento do risco cardiometabólico e cardiovascular não se limita apenas a concentração de LDL, mas também a qualidade desta partícula.

A LDL é uma partícula estruturalmente complexa composta por proteína de alto peso molecular, a APOB-100, lipídeos neutros e polares e antioxidantes lipofílicos como o α-tocoferol e beta-caroteno. Quando presa a parede vascular, essas partículas se tornam susceptíveis a modificação oxidativa por enzimas como as lipoxigenases e mieloperoxidases, e também através de reações oxidantes não enzimáticas gerando LDL oxidada (LDLox), cujo potencial aterogênico é amplamente descrito na literatura (KETELHUTH e HANSSON, 2011). Assim, a LDLox induz o recrutamento de monócitos, a formação de células

espumosas e o acúmulo de lipídios na parede arterial, contribuindo para o processo aterogênico (YOSHIDA e KISUGI, 2010).

Estudos prévios em crianças e adolescentes demonstram que além do excesso de peso, a concentração elevada de TG e LDL estão associadas á formação de LDLox, enquanto que a concentração de HDL apresenta uma associação negativa (KELISHADI et al., 2008; KELLY et al., 2010; ALVES et al., 2010).

Neste sentido, inúmeros estudos demonstraram uma concentração maior da LDLox na circulação de indivíduos dislipidêmicos, que também foi associada a LDL com carga de íons mais negativa e a partículas de LDL minimamente oxidadas, classicamente denominadas como LDL eletronegativa [LDL(-)]. A LDL(-) está associada ao aumento dos ácidos graxos não esterificados, aumento no conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), dos óxidos de colesterol e concentração reduzida de α-tocoferol (AVOGARO et al., 1988; AVOGARO et. al., 1991; CAZZOLATO et al., 1991; DEJAGER et al., 1993; HODIS et al., 1994, SEVANIAN et al., 1997).

Em 2011, MELLO et al., em estudo de revisão mostraram que a origem da LDL(-) é múltipla e complexa, incluindo o processo oxidativo e sendo capaz de ativar a inflamação e resposta imune. Essa revisão mostrou ainda que o aumento no conteúdo de LDL(-) está associado com a formação de auto-anticorpos anti-LDL(-).

Desse modo, é plausível que indivíduos submetidos a DC apresentem condições metabólicas favoráveis a geração de LDL(-), os predispondo a um maior risco cardiometabólico.

As propriedades físicas das lipoproteínas também vêm sendo estudadas e sua variação sugere que o tamanho das partículas de lipoproteínas pode fornecer mais detalhes do risco cardiovascular individual, além do clássico perfil lipídico (PACKARD et al., 2000; BERNEIS et al., 2002). Até o momento a literatura não apresenta estudos que avalie este efeito no contexto clínico da DC no tratamento da epilepsia, entretanto dois estudos avaliam essas mudanças em adultos.

SHARMAN et al., (2002) mostraram que homens eutróficos e normolipidêmicos após 6 semanas recebendo DC não apresentaram alterações nas concentrações de TG, LDL-C e LDLox. Entretanto, os indivíduos com predomínio de partículas pequenas de LDL apresentaram aumento no diâmetro da partícula e maior concentração de colesterol na partícula LDL-1 após a DC.

Mais recentemente, WESTMAN et al., (2006) utilizaram a DC por 6 meses como forma de tratamento para perda de peso em adultos. Esses autores observaram que a

quantidade reduzida de carboidratos na DC favorece a redução na concentração de TG e aumento na formação de partículas grandes de HDL e LDL, quando comparada a uma dieta com baixo teor de gorduras. De forma semelhante, um estudo em ratos mostrou melhora da perfusão cardíaca com DC em relação a ratos que receberam uma dieta normal ou com alto teor de carboidratos (AL-ZAID et al., 2007).

O estudo de revisão de VINING (2008) evidenciou que não existem dados de estudos prospectivos de longa duração que avaliaram o impacto da DC na saúde cardiovascular. De acordo com as diretrizes da Universidade de Johns Hopkins nos Estados Unidos para tratamento dietético da epilepsia, as alterações no perfil lipídico em longo prazo, não parecem ser significativas, entretanto a influência dessas mudanças nas doenças coronarianas são desconhecidas (LEE e KOSSOFFF, 2011).

Apesar dessas observações, até o momento a literatura não descreve estudos nacionais ou internacionais que tenham avaliado o possível impacto da DC no contexto da epilepsia refratária sobre as características oxidativas e físicas das lipoproteínas.

1.5.1 Impacto da Dieta Cetogênica na Composição Corporal e Crescimento

Além dos efeitos adversos da DC descritos acima, o inadequado crescimento e desenvolvimento têm sido considerado um aspecto negativo associados à DC (VINING et al., 2002, NEAL et al., 2008). Desse modo, é fundamental que crianças e adolescentes sob tratamento com DC sejam regularmente monitoradas, visando a adoção de estratégias que possam minimizar o impacto da DC sobre o crescimento e desenvolvimento.

A avaliação do estado nutricional constitui etapa fundamental na qual se verifica a adequação do crescimento e das proporções corporais, segundo os padrões de crescimento esperados (MELLO, 2002). No segmento pediátrico, as medidas mais comumente utilizadas envolvem a aferição de peso, estatura e a classificação pelas curvas de crescimento. Adicionalmente, a avaliação da composição corporal é indicativa do estado nutricional, podendo essa ser feita pelos seguintes métodos: pesagem hidrostática, hidrometria, plestimografia, ultrassonografia, tomografia computadorizada, bioimpedância elétrica (BIA) e absorciometria radiológica de dupla energia (DEXA) (SIGULEM et al., 2000).

A escolha do método de avaliação do estado nutricional está vinculada ao objetivo, ao custo, ao tempo disponível para realização, ao nível de dificuldade e de habilidade

requeridos, a validade do método e à receptividade por parte da população e aos possíveis riscos envolvidos (SIGULEM et al., 2000).

O uso da bioimpedância elétrica como um dos métodos de avaliação da composição corporal em crianças é questionado pela Sociedade Brasileira de Pediatria (2009), pelo fato da infância ser um período caracterizado por rápidas mudanças e grande variabilidade interindividual de fluidos corporais. No entanto, alguns estudos vêm apresentando boa aplicabilidade da bioimpedância elétrica em crianças (WU et al., 1993; OKASORA et al., 1999; NGUYEN et al., 2007; WRIGHT et al., 2008; ERCEG et al., 2010).

WU et al., (1993) avaliaram 47 crianças e adolescentes com idade entre 8 e 20 anos pela bioimpedância elétrica e pela pesagem hidrostática e encontraram uma correlação de 0,98 nos meninos e 0,97 nas meninas para a massa livre de gordura. Outro estudo mostrou um coeficiente de correlação de 0,90 para o percentual de gordura corporal, 0,95 para massa livre de gordura e 0,95 para a massa de gordura na avaliação de 104 crianças por bioimpedância elétrica e DEXA (OKASARA et al., 1999).

O índice de impedância foi o melhor preditor em comparação ao DEXA e medidas antropométricas para estimar a massa livre de gordura em crianças de 2,5 a 18 anos de um hospital universitário na Alemanha (NGUYEN et al., 2007).

Em 2008, um estudo desenvolveu um método para obtenção de índices de massa gorda e massa livre de gordura através da bioimpedância e concluiu que esses índices permitem uma avaliação mais precisa do aporte energético de crianças com limitações neurológicas, além de fornecer identificação mais válida do risco de baixo peso ou obesidade em crianças (WRIGHT et al., 2008).

Mais recentemente, ERCEG et al., (2010) sugeriram que a bioimpedância é a alternativa mais segura comparada ao DEXA e a pesagem hidrostática tanto em adultos como em crianças.

As mudanças provocadas no estado nutricional de crianças com epilepsia refratária submetidas a DC vêm sendo estudadas (FREEMAN et al., 2007). Entretanto, esses estudos consideram apenas o peso e estatura como forma de avaliação e não avaliam medidas como massa gorda e massa magra da composição corporal dessas crianças.

Em 2002, VINING et al., em um estudo prospectivo de mais de 2 anos mostraram que após o início da dieta os escores de peso para idade (P/I) diminuíram e os escores de estatura para idade (E/I) apresentaram redução apenas nos primeiros 6 meses de tratamento. Resultados semelhantes na perda de peso avaliada pelo Z P/I foram encontrados por NEAL et al., (2008). No entanto, a redução significativa na estatura foi observada somente no

período de 6 a 12 meses após a introdução da dieta. Em contrapartida, LIU et al., (2003) observaram aumento significativo na estatura de crianças com DC.

Neste mesmo ano (2002) TUMAS, avaliou o percentual de gordura corporal por quatro dobras cutâneas (triciptal, subescapular, supra-ilíaca e biciptal) em 31 crianças no momento basal, entre 6 e 12, 18 e 24 meses de DC, e verificou que não houve diferença significativa, indicando que a DC não apresenta impacto negativo na composição corporal. No entanto, ao monitorar por 2 anos o estado nutricional de 20 crianças desta mesma amostra, esses mesmos autores verificaram redução significativa nos escores P/I e E/I, sendo que para o índice de massa corporal para idade (IMC/I) esta redução não foi significativa (TUMAS et al., 2010).

Portanto, monitorar parâmetros antropométricos e de composição corporal em crianças com epilepsia refratária podem contribuir na avaliação clínica dos benefícios e efeitos adversos do tratamento dietoterápico.

1.6 IMPACTO ECONÔMICO DA EPILEPSIA E DA DOENÇA CARDIOVASCULAR

Outro aspecto importante nos anos recentes é o impacto econômico, tanto da epilepsia como das doenças cardiovasculares na saúde pública (NETO e MARCHETTI, 2005 e AZAMBUJA et al., 2008).

O custo das doenças cardiovasculares (DCV) são significativos (AZAMBUJA et al., 2008). Aproximadamente dois milhões de casos de DCV foram relatados em 2004 no Brasil, representando 5,2% da população acima de 35 anos de idade. O custo anual em 2004 foi de, pelo menos, R$ 30,8 bilhões (36,4% para a saúde, 8,4% para o seguro social e reembolso por empregadores e 55,2% como resultado da perda de produtividade), correspondendo a R$ 500,00 per capita (para a população de 35 anos e acima) e R$ 9.640,00 por paciente (AZAMBUJA et al., 2008). Somente nesse subgrupo, os custos diretos em saúde representaram 8% do gasto total do país com saúde e 0,52% do PIB (R$ 1767 bilhões = 602 bilhões de dólares), o que corresponde a uma média anual de R$ 182,00 para os custos diretos per capita (R$ 87,00 de recursos públicos) e de R$ 3.514,00 por caso de DCV grave (AZAMBUJA et al., 2008).

As novas drogas antiepilépticas (DAEs) têm um custo mais de 100 vezes superior ao do fenobarbital e 10 a 20 vezes superior ao da fenitoína e carbamazepina (NETO e MARCHETTI, 2005). O custo do tratamento pelas DAEs é, entretanto, apenas uma pequena

parte da “conta” global do tratamento de um paciente epiléptico. Custos indiretos (custos de morbidade, benefícios, mortalidade excessiva, pensões, desemprego, dias de trabalho perdidos e outros custos sociais), assim como custos relacionados ao tratamento, particularmente hospitalização, são muito mais representativos.

Somando-se aos custos diretos com o tratamento da epilepsia, deveriam ser acrescentados os gastos com o tratamento das morbidades associadas. Dentre essas, as doenças cardiovasculares podem estar inseridas, especialmente se considerarmos os possíveis efeitos colaterais das DAEs que podem contribuir com a dislipidemia, bem como as possíveis mudanças promovidas no metabolismo lipídico induzidas pela DC.

Neste sentido, avaliar parâmetros lipídicos considerados fatores de risco clássicos para doença cardiovascular e, particularmente para a aterosclerose, pode contribuir com a avaliação clínica e redução de possíveis efeitos adversos no seguimento de pacientes tratados com DC.

1.7 JUSTIFICATIVA

Considerando que a dieta cetogênica é um tratamento terapêutico com eficácia comprovada no controle das crises epilépticas e que a literatura não apresenta estudos que avaliem o efeito da DC no risco cardiovascular, torna-se importante estudar, além do perfil lipídico, os fatores de risco não clássicos como o tamanho de partículas e o perfil oxidativo das lipoproteínas envolvidas na patogênese da aterosclerose.

1.8 HIPÓTESE

Esse estudo foi baseado nas seguintes hipóteses:

a) Crianças e adolescentes apresentarão maiores concentrações de CT, LDL, TG, APO B e Ácidos graxos não esterificados (AGNEs) após 3 (T1) e 6 meses (T2) de DC.
b) Crianças e adolescentes sob tratamento com DC apresentarão menores concentrações de APO A-I.
c) Crianças e adolescentes sob tratamento com DC apresentarão maiores concentrações de marcadores oxidativos [LDL(-), anticorpos anti-LDL(-) e TBARS] no T1 e T2.

d) Crianças e adolescentes sob tratamento com DC apresentarão aumento na concentração de partículas pequenas de LDL e redução do tamanho médio de LDL.

A **Figura 3** resume esquematicamente as hipóteses propostas por este estudo:

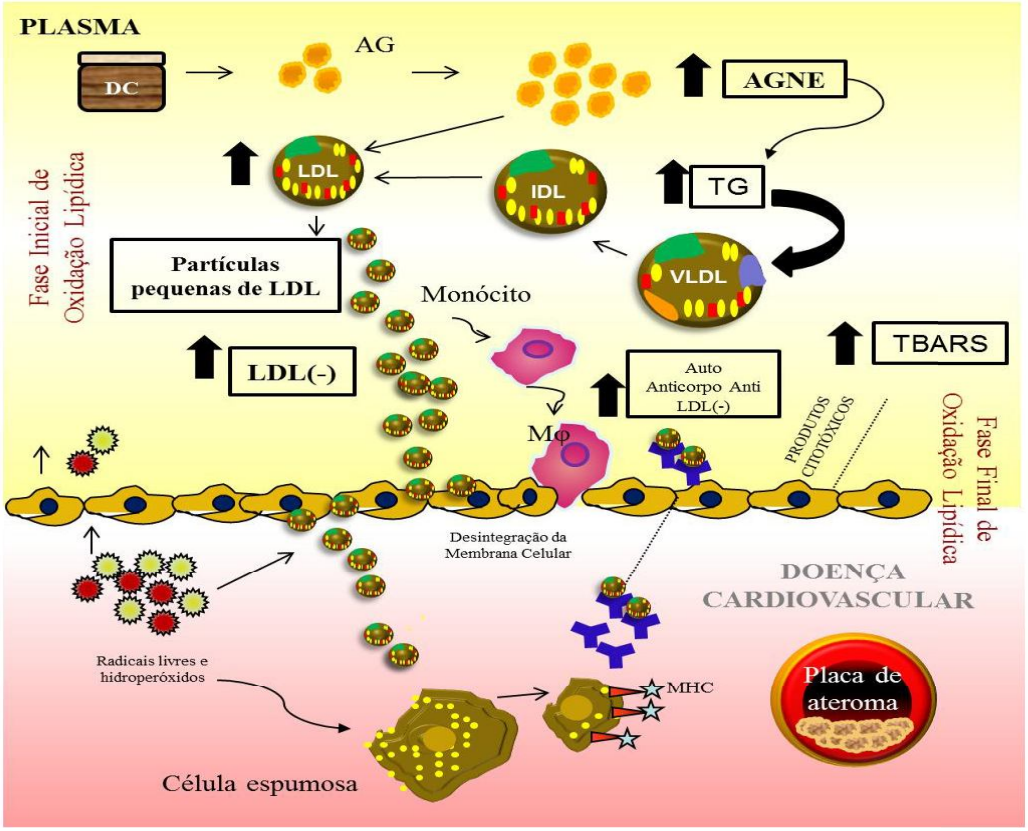


Figura 3: Possíveis efeitos da DC no metabolismo lipídico.
A dieta cetogênica fornece alta concentração de ácidos graxos e após a ação das lipases liberam os AGNE. Esses ácidos graxos são absorvidos pelos enterócitos onde são reesterificados em TG. Os TG e colesterol são incorporados na VLDL contribuindo com o aumento da concentração de LDL e geração de LDL(-), além da formação de partículas pequenas de LDL. Essas partículas migram para o espaço subendotelial iniciando o processo inflamatório diferenciando monócitos em macrófagos formando células espumosas e consequentemente a placa de ateroma. Na fase inicial de oxidação lipídica os radicais livres favorecem a geração de LDL(-) e na fase final de oxidação lipídica a formação de TBARS. Em resposta a este aumento de LDL(-) há um aumento da produção de anticorpos Anti-LDL(-). DC: dieta cetogênica; AG: ácido graxo; AGNE: ácido graxo não esterificado; TG: triacilgliceróis; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; IDL: lipoproteína de densidade intermediária; LDL: lipoproteína de baixa densidade; LDL(-): LDL eletronegativa; Anti-LDL(-): Anticorpos Anti-LDL(-).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o impacto da dieta cetogênica clássica nas características oxidativas, físicas e lipídicas das lipoproteínas de crianças e adolescentes com epilepsia refratária.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Trata-se de um ensaio clínico não controlado de séries temporais com seguimento de 6 meses (GRADY et al., 2003). Foram incluídas crianças e adolescentes de ambos os sexos com epilepsia refratária, com idade entre 1 e 19 anos, avaliadas em três momentos: T0 – após indicação do tratamento e antes da introdução da DC; T1 – após 3 meses de tratamento com a DC e; T2 – após 6 meses de tratamento com a DC. Portanto, o estudo seguiu o fluxo abaixo (**Figura 4**):

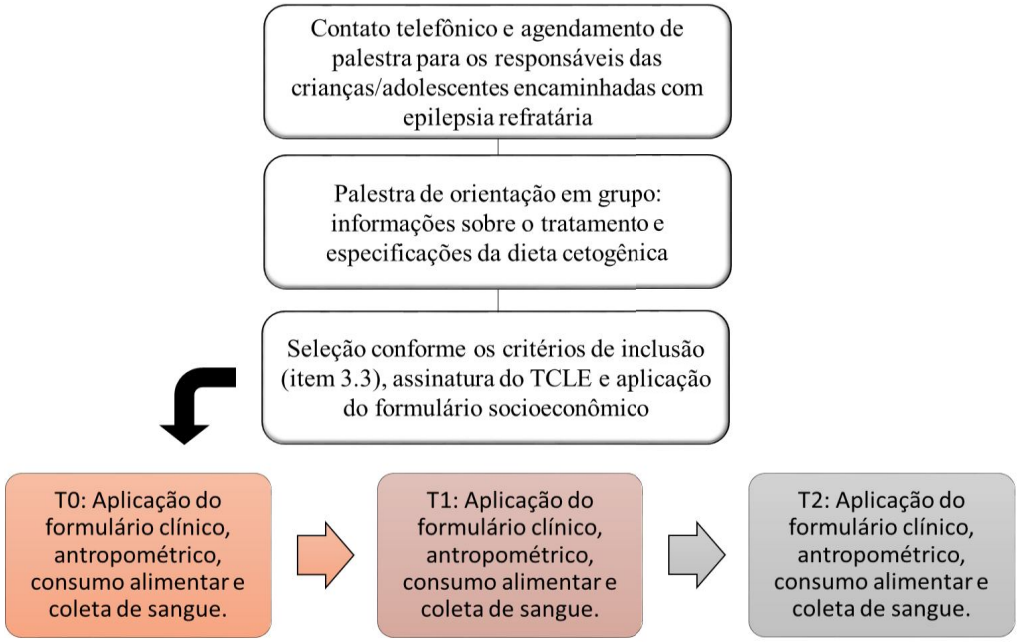


Figura 4: Delineamento do estudo nos diferentes momentos de monitoramento.

As crianças e adolescentes inclusas neste estudo foram recrutadas do Ambulatório de Dieta Cetogênica do ICr-HC-FMUSP (São Paulo, São Paulo). O encaminhamento dos pacientes ao ambulatório se deu por duas vias: mala direta com divulgação do projeto para Sociedade Brasileira de Neurologia Infantil e captação de pacientes do Ambulatório de

Neurologia do Instituto Central - HC-FMUSP pela neuropediatra responsável do ambulatório do ICr-HC-FMUSP.

Todos os responsáveis pelas crianças participantes passaram pelo processo de esclarecimento e assinaram o termo de consentimento (TCLE), conforme **Anexo 1.** Todos os procedimentos de obtenção de amostras, análises e divulgação dos resultados seguiram as normas do Conselho Nacional de Saúde, no que se refere à ética em pesquisa com seres humanos (BRASIL, 1996). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da FSP-USP (CAEE 00608012.1.0000.5421), sendo o ICr-HC-FMUSP a instituição coparticipante (**Anexos 2 e 3**).

3.2 TAMANHO DA AMOSTRA

A amostra do estudo foi de conveniência. Devido à baixa prevalência da epilepsia refratária e o Instituto da coleta de dados ser um Centro de Referência Nacional para o tratamento com a DC, não se fez necessário um cálculo amostral, visto que todas as crianças e adolescentes com refratariedade tem indicação da dieta. Portanto, foram convidadas para compor a amostra todas as crianças e adolescentes com epilepsia refratária não controlada por politerapia medicamentosa (drogas antiepilépticas) e com indicação para início do tratamento com a DC, respeitando-se os critérios de inclusão, encaminhados ao Ambulatório de Dieta Cetogênica do Instituto da Criança do HC-FMUSP no período de junho de 2012 a março de 2014. Sendo a estimativa inicial de tamanho amostral de 30 crianças.

3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E NÃO INCLUSÃO

Participaram do estudo crianças e adolescentes com diagnóstico de epilepsia refratária em politerapia medicamentosa (drogas antiepilépticas) e indicação de tratamento com DC, conforme os seguintes critérios de inclusão:

- Crianças e adolescentes de ambos os sexos com idade de 1 a 19 anos;
- Crianças e adolescentes que não utilizavam nenhum tipo de reposição hormonal;
- Crianças e adolescentes que não apresentavam diagnóstico de diabetes mellitus e hipotireoidismo ou hipertireoidismo;

- Crianças e adolescentes que não apresentavam doenças agudas como cardiopatias e doenças renais que impediram a indicação da DC avaliadas por anamnese e exame clínico completo pela médica neuropediatra responsável pelo ambulatório.

3.4 ANÁLISE DE RISCOS E BENEFÍCIOS

Embora os pacientes inclusos no estudo receberam um tratamento dietético terapêutico, esses pacientes já seriam submetidos a esse tratamento independente da pesquisa realizada. Portanto, o risco considerado foi mínimo. Os benefícios resultantes da realização deste estudo basearam-se na identificação do impacto da DC na oxidação de lipoproteínas, perfil lipídico e parâmetros físicos das lipoproteínas. Neste contexto, os benefícios para a população inclusa no estudo ainda são experimentais, mas contribuirão com a conduta médica e/ou dietética no tratamento com a dieta cetogênica em crianças com epilepsia, sobretudo pelas modificações significativas na qualidade das lipoproteínas (maior oxidabilidade e menor tamanho da LDL), além das mudanças no conteúdo de lipídeos presentes nesta partícula.

3.5 PERFIL SOCIOECONÔMICO E CLÍNICO

Os responsáveis pelos participantes do projeto responderam por meio de entrevista direta um Questionário de Identificação, Avaliação Socioeconômica e Clínica do Paciente (**Anexo 4**), de modo que a caracterização dos grupos estudados seja realizada.

As faixas de classificação Socioeconômica apresentadas no **Anexo 4** foram baseadas em parâmetros previamente estabelecidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2011).

As crises epilépticas foram classificadas após avaliação clínica e avaliação de eletroencefalograma pela neuropediatra com base na classificação internacional proposta pelo ILAE, 2010 **(Anexo 5)**. A etiologia da epilepsia foi determinada com base na anamnese e história clínica da doença, exames de imagem (ressonância magnética nuclear), além da presença ou não de exames genéticos.

3.6 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA E COMPOSIÇÃO CORPORAL

Para avaliação antropométrica e de composição corporal foram aferidos peso (Kg), estatura (cm), composição corporal por bioimpedância elétrica e dobras cutâneas: subescapular (DCS) e triciptal (DCT).

O peso foi determinado com os pacientes utilizando o mínimo de roupas e descalços, através da balança digital W-200A® (Welmy, São Paulo, Brasil) com limite de capacidade de 200 Kg e precisão de 100 g. Para crianças que não deambulavam, o método peso canguru foi utilizado.

A medida de estatura para crianças que deambulavam foi determinada através do estadiômetro (Tonelli®), onde os pacientes ficaram descalços, em posição ereta, com os pés paralelos, calcanhares, panturilha, glúteos, ombros e cabeça encostados no estadiômetro, com a cabeça sob o plano horizontal de *Frankfurt*. Para crianças que não deambulavam a medida foi determinada através do antropômetro pediátrico para crianças com até 100 cm. Este foi apoiado em uma superfície plana e firme sendo a cabeça da criança apoiada firmemente contra a parte fixa do equipamento, mantendo o pescoço reto, o queixo afastado do peito, os braços estendidos ao longo do corpo, e os joelhos posicionados para baixo unindo os pés formando um ângulo reto com as pernas encostando na parte móvel do equipamento. Crianças maiores de 100 cm que não deambulavam tiveram a estatura estimada pela altura do joelho (CHUMLEA, 1994), onde a criança foi mantida em posição supina e o comprimento entre o calcanhar e a superfície anterior da perna na altura do joelho (côndilo do fêmur) foi medido com o antropômetro pediátrico.

Os dados de peso e estatura foram utilizados para cálculo do índice de massa corporal (IMC). Os escores z de estatura para idade (Z E/I) e IMC para idade (Z IMC/I) foram obtidos, conforme as curvas de crescimento preconizadas pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2006, 2007), e a classificação do estado nutricional foi baseada no Z IMC/I. Devido às curvas de crescimento só apresentarem Z P/I (escore Z de peso/I) até 10 anos, o ZP/I não foi utilizado. Desta forma os resultados foram baseados no Z E/I e Z IMC/I tanto para as crianças como para os adolescentes.

Para realização da bioimpedância elétrica (BIA) foi utilizado o aparelho tetrapolar *Biodynamics*®, modelo 450 (TBW, São Paulo, Brasil) através da aplicação de corrente elétrica de 800µA e frequência de 50KHz com obtenção dos valores de resistência (R), reactância (Xc) e dados de composição corporal: ângulo de fase (AF◦), percentuais de massa celular corporal (%MCC), massa extracelular (%ME), massa magra (%MM), massa gorda

(%MG), água corporal na massa magra (%ACTmm) e água corporal no peso total (%ACTpeso). Para a realização da BIA todos os pacientes foram orientados a permanecerem em jejum por um período de 12 horas.

Devido a faixa etária dos participantes do estudo, foi tomado o cuidado dos eletrodos serem conectados a uma distância de pelo menos 3 cm um do outro (NGUYEN et.al., 2007). As medidas de BIA foram tomadas do lado direito do paciente, orientado a manter-se deitado em posição supina, com os braços em ângulo de 30º em relação ao seu corpo e as pernas sem contato entre si. Calçados e meias foram retirados e durante o teste a criança permaneceu o mais imóvel possível.

As medidas das dobras cutâneas foram realizadas com adipômetro (*Lange Skinfold Caliper® – Cambrige Scientific Industries, USA*) de pressão constante de 10 g/mm^2. A DCT foi obtida a partir do ponto médio do braço direito, entre o acrômio e o olecrano, na região posterior ajustando-se a mandíbula do compasso perpendicularmente ao eixo longitudinal da dobra, cerca de 1 cm abaixo dos dedos do pesquisador. A medida da DCS foi aferida imediatamente abaixo do ângulo inferior da escápula, posicionando-se a mandíbula do compasso em ângulo de 45 graus em relação à coluna vertebral. Ambas as medidas foram tomadas com os braços e ombros o mais relaxado possível. As medidas obtidas foram somadas e classificadas em percentis, conforme FRISANCHO, 1990.

3.7 CÁLCULO DA DIETA E PROTOCOLO DE ORIENTAÇÃO

O protocolo de orientação e planejamento dietético da instituição de coleta considera as recomendações estabelecidas por FREEMAN et al., (1994) (**Tabela 1**). O peso ideal foi estabelecido após a avaliação do Z IMC/I (WHO 2006, 2007), sendo considerado o peso referente ao Z IMC/I mais próximo do estado nutricional de eutrofia. A prescrição de proteínas segue a recomendação de 0,75g a 1g/Kg de peso (FREEMAN et. al.,1994).

A introdução da dieta e evolução do aumento da proporção de gorduras foi realizada após o cálculo da composição dietética e monitoramento da concentração de corpos cetônicos na urina (**Tabela 2**).

Tabela 1 – Determinação de calorias por quilo de peso corporal (Kcal/Kg) e calorias totais, a partir da idade e peso ideal estimado por Z IMC/I.

Idade (anos)	Kcal/Kg
< 1	80
1 - 3	75
4 - 6	68
7 - 10	60
≥ 11	40 - 50 ou <

Fonte: FREEMAN et al., (1994)

Desta forma, os pacientes inclusos no T0 passaram por todos os exames e foram coletados os dados de antropometria, e somente na segunda semana receberam orientação para início da DC 2:1 dando continuidade ao cronograma de tratamento.

Tabela 2 – Cálculo da composição dietética e cronograma de tratamento.

Proporção	Gordura	Calorias	Carboidratos e Proteínas	Kcal por unidade dietética	Cronograma de Tratamento
2:1	2g x 9 Kcal/g = 18	18	1g x 4 Kcal/g = 4	18 + 4 = 22	1ª semana
3:1	3g x 9 Kcal/g = 18	27	1g x 4 Kcal/g = 4	27 + 4 = 31	2ª semana
4:1*	4g x 9 Kcal/g = 18	36	1g x 4 Kcal/g = 4	36 + 4 = 40	4ª semana

Fonte: Adaptado de FREEMAN et. al. (1994).* A dieta 4:1 é introduzida conforme a medida de cetonúria

As calorias totais foram distribuídas em 4 refeições (café da manhã, almoço, merenda ou lanche noturno e jantar), sendo a dieta clássica o tipo de dieta adotada pela instituição. A dieta foi composta por creme de leite, ovo, maionese ou toucinho fresco, azeite de oliva ou óleo vegetal, queijo processado tipo *Polengui®*, carnes e embutidos, frutas, legumes e verduras (**Anexo 6**). As bebidas permitidas eram sucos de limão e maracujá natural, suco artificial em pó sem açúcar, chás sem adição de açúcar e água. O uso de adoçantes sem frutose e lactose foi orientado como opção para substituição do açúcar. Alimentos com alto teor de carboidratos e proteínas como arroz, feijão, doces, pães, bolachas, macarrão e massas não podem ser consumidos. Alguns tubérculos e raízes (batata, mandioquinha, mandioca, beterraba, cará e inhame) fizeram parte da dieta apenas na proporção 2:1.

A orientação da DC foi realizada em parceria com a Nutricionista do Ambulatório do Instituto da Criança (ICr-HC-FMUSP) e a Nutricionista pesquisadora do estudo da Faculdade de Saúde Pública (FSP-USP). A introdução da dieta foi realizada somente para os responsáveis da criança/adolescente que atenderam os seguintes requisitos: presença do responsável da criança/adolescente que se comprometeu com o preparo da dieta, aquisição

de balança com precisão de 1g para a pesagem dos alimentos e caderno de anotações. Durante a orientação os responsáveis receberam o impresso da DC e simulando a prática diária do preparo, aprenderam a manusear a balança aferindo o peso correspondente de uma maçã (alimento da lista de frutas).

A concentração de corpos cetônicos na urina foi detectada por fita específica para cetonúria (*Accu-chek/Keto-diabur test do Laboratório Roche®*) pelo responsável da criança/adolescente, a partir da 2ª semana de dieta após orientação prévia. A marcação foi feita pelo símbolo em cruz (+) correspondente a cor e concentração dos corpos cetônicos em mg/dL: + (10mg/dL), ++ (50mg/dL), +++ (150mg/dL). O responsável foi orientado a registrar a medida 2 a 4 vezes/dia de acordo com a liberação de urina. Após 3 meses de DC o registro foi realizado 1 vez/dia.

Portanto, a concentração de corpos cetônicos indicou a necessidade do paciente receber a orientação da dieta 4:1 ou permanecer na dieta 3:1, sendo a meta a marcação de +++ (150mg/dL).

3.8 AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR

A avaliação do consumo alimentar foi realizada por meio de aplicação de três Registros Alimentares em cada momento do estudo (**Anexo 7**), visto que esta ferramenta já faz parte do protocolo do ambulatório para o monitoramento da DC. Os responsáveis foram orientados quanto ao preenchimento e todos os registros entregues passaram por conferência dos entrevistadores onde foi feita a complementação necessária de qualquer informação (quantidade, preparo, tipo de alimento). Para facilitar essa complementação os registros foram sempre referentes aos 3 dias anteriores a data da coleta de dados.

Período Basal (T0) – Três registros solicitados no momento da inclusão

Período 3 meses (T1) – Três registros recolhidos do caderno de monitoramento da DC

Período 6 meses (T2) – Três registros recolhidos do caderno de monitoramento da DC

Os dados foram preenchidos em um formulário padrão que compreende a listagem de alimentos e descrição detalhada. Desta forma, foi possível definir e quantificar todos os alimentos e as bebidas consumidas. Nos momentos T1 e T2 a referência para informação do consumo foi o peso dos alimentos (g) prescritos na DC, visto que esses foram pesados em balança com precisão de 1 g antes do preparo.

Devido a DC não apresentar quantidades adequadas de vitaminas e minerais o ICr-HC-FMUSP indicou o uso de suplemento padrão a partir da 3ª semana de DC para todas as crianças e adolescentes que faziam parte do ambulatório. O uso desses suplementos foi monitorado, conforme **Anexo 4** e somados às vitaminas e minerais obtidos por meio da dieta.

A energia (Kcal) e os seguintes nutrientes: proteínas (g), carboidratos (g), açúcar (g), lipídeos (g), colesterol (mg), fibras (g), ácidos graxos saturados (g), ácido graxo palmítico (g), ácido graxo esteárico (g), ácidos graxos poli-insaturados (g), ácido graxo linoleico (g), ácido graxo linolênico (g), ácido graxo araquidônico (g), ácido graxo eicosapentaenóico (mg), ácido graxo docosahexaenóico (mg), ômega 3 (g), ômega 6 (g), ácidos graxos monoinsaturados (g), ácido graxo palmitoil (g), ácido graxo oleico (g), α-caroteno (µg) β-caroteno (µg), licopeno (µg), vitamina A (µg RE), vitamina D (ug),vitamina E (mg de α-tocoferol), vitamina K (ug), vitamina B1 (mg), vitamina B2 (mg), vitamina B3 (mg), vitamina B6 (mg), vitamina B12 (ug), vitamina C (mg), cálcio (mg), ferro (mg), sódio (mg), zinco (mg) foram analisados por meio do programa *Food Processor Software: Esha Research*® versão 10.11.0 (2012).

Para analisar os registros de consumo, os alimentos e preparações foram padronizados e adicionados ao programa. As medidas caseiras foram padronizadas conforme a tabela de medidas caseiras de PINHEIRO et al., (2001) e apenas os alimentos que não foram encontrados no software foram adicionados utilizando como referência as tabelas de composição de alimentos: PHILLIPI (2002) e Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO (2011).

A partir da forma bruta os resultados de consumo alimentar foram ajustados pelo programa *The Multiple Source Method* (MSM), versão 1.0.1 (*DEPARTMENT OF EPIDEMIOLOGY OF THE GERMAN INSTITUTE OF HUMAN NUTRITION*, 2011), que utiliza técnicas de modelagem estatística para a remoção da variabilidade intrapessoal.

Portanto, os resultados finais referentes ao consumo alimentar foram apresentados sob a forma ajustada pelo MSM.

3.9 ADESÃO A DIETA CETOGÊNICA

O monitoramento da adesão à dieta foi baseado na ingestão adequada dos macronutrientes prescritos respeitando a proporção de gorduras, carboidratos e proteínas. As medidas de cetose na urina (item 3.7), e mais precisamente a detecção do β-hidroxibutirato

no plasma (item 3.9.1) foi indicativo da produção de corpos cetônicos. Visando reforçar a adesão a intervenção, os responsáveis pelos pacientes foram monitorados quinzenalmente por telefone e e-mail, e possuíam contato com o pesquisador para sanar eventuais dúvidas durante o tratamento.

3.9.1 Determinação de β-hidroxibutirato

A concentração do β-hidroxibutirato foi determinada por método enzimático cinético através do kit Ranbut® (*Randox Laboratories Limited, Reino Unido*). Ao plasma (6,2 µl) foi adicionado 250 µl da solução reagente (NAD+ 2,5 mmol/L e 3-hidroxibutirato desidrogenase 0,12 U/ml) previamente reconstituída em solução tampão, sendo posteriormente incubada por 60 segundos a 37°C. Imediatamente após a incubação, 100 µl da solução foram monitorados a 340 nm em temperatura de 37°C durante 3 minutos, sendo a reatividade registrada em intervalo de 60 segundos. A quantificação de β-hidroxibutirato foi realizada pelas médias das 3 leituras das absorbâncias dividida pela média do padrão destas leituras. Os valores foram expressos em mmol/L. Todas as análises foram realizadas em duplicata no Laboratório de Nutrição Humana da FSP-USP.

3.10 OBTENÇÃO DE SANGUE

Nos momentos T0, T1 e T2 e após um jejum de 12 horas foi coletada uma amostra de sangue (20 mL) no Laboratório do Instituto da Criança do HC-FMUSP. O sangue foi coletado em tubos vacutainer contendo ácido etileno-diaminotetraacético-EDTA (1 mg/mL) (BD, Brasil), utilizado como anticoagulante e antioxidante, mantido em gelo e protegido da luz até a obtenção do plasma. As análises descritas nos itens 3.11 foram realizadas no Laboratório do Instituto da Criança do HC-FMUSP e as análises descritas do item 3.12 a 3.18 estão foram realizadas no Laboratório de Nutrição Humana da FSP-USP, sendo a amostra de sangue distribuída entre os laboratórios (**Figura 5**).

Ao plasma (3000 rpm, 15 min, a 4°C) obtido no Laboratório de Nutrição Humana da FSP-USP acrescentamos os seguintes inibidores de proteases: aprotinina (10 µg/mL), benzamidina (10 µM) e fluoreto de fenilmetilsulfonila-PMSF (5 µM), além do antioxidante 2,6-di-tert-butil-p-hidroxitolueno-BHT (100 µM). Em seguida o plasma foi aliquotado em

tubos criogênicos, conforme número de análises pré-estabelecidas, e armazenados a -80°C até o momento dessas análises.

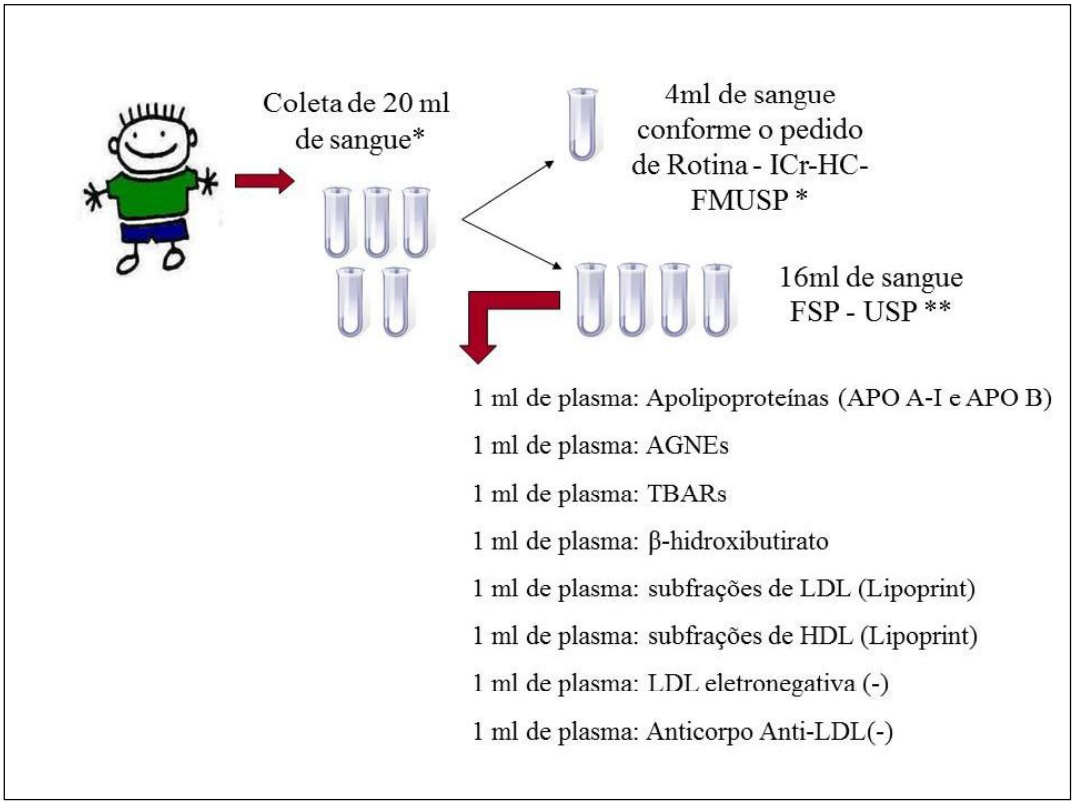


Figura 5 – Fracionamento de sangue e realização das análises no plasma. *****Realizado pelo Laboratório do Instituto da Criança do HC-FMUSP; ** Realizado pelo Laboratório de Nutrição Humana da FSP-USP.

3.11 DETERMINAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO

As concentrações de CT, TG no plasma e colesterol associado a HDL e LDL foram determinadas por método colorimétrico enzimático pelo equipamento *Cobas 6000 modelo C 501* utilizando os kits CHOL2, TRIGL, HDLC3 e LDL-C (*Laboratório Roche Diagnostics GmbH®, D-68298 Mannheim).* Todas essas análises foram realizadas pelo *Laboratório do Instituto da Criança do HC-FMUSP*. A partir dos resultados acima foram calculadas as razões TG/HDL-C, CT/HDL-C, LDL-C/HDL-C, não HDL-C.

Para classificação do perfil lipídico dos pacientes foram utilizados os valores de referência propostos pela Academia Americana de Pediatria (2011).

3.12 DETERMINAÇÃO DAS APOLIPOPROTEÍNAS

As apolipoproteínas Apo AI e Apo B foram determinadas por métodos padrão, através da utilização dos kits APO AI® e APO B® (*Randox Laboratories Limited, Reino Unido*), respectivamente, pelo método imuno-turbidimétrico. As análises foram realizadas no equipamento *Cobas Mira Classic* (Roche). A partir dos resultados acima foram calculadas as razões HDL-C/Apo AI, LDL-C/Apo B, APOB/APOA-I. Todas essas análises foram realizadas no *Laboratório de Nutrição Humana da FSP-USP*.

Para classificação das apolipoproteínas A-I e B foram utilizados os valores de referência propostos pela Academia Americana de Pediatria (2011).

3.13 DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS NÃO ESTERIFICADOS

Os ácidos graxos não esterificados (AGNEs) foram determinados pelo método colorimétrico enzimático, através do kit NEFAS® (*Randox Laboratories Limited, Reino Unido*). As análises foram realizadas no sistema automático *Cobas Mira Classic* (Roche) no *Laboratório de Nutrição Humana da FSP-USP*. Os valores foram expressos em mmol/L.

3.14 SEPARAÇÃO DE LDL(-)

A partir de um pool de LDL obtido por ultracentrifugação (55.000 rpm, 18h, 4°C), foi identificada e purificada a sub-fração LDL(-), utilizando-se a técnica de *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) descrita previamente por DAMASCENO et al., (2006). Deste modo, uma partícula lipoproteica altamente pura foi obtida e utilizada como padrão de LDL(-) para ser usada na curva padrão do ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para detecção de LDL(-) no plasma de pacientes inclusos no presente estudo. A obtenção da LDL(-) foi realizada em parceria com a Profa. Dulcineia Abdalla do Laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (FCF-USP).

3.15 DETECÇÃO DE LDL(-)

A LDL(-) foi detectada por meio de ELISA sanduíche, seguindo protocolo padronizado por nosso grupo de pesquisa (DAMASCENO, 2006). A sensibilização das placas (Costar®, modelo 3690, Corning, USA) foi feita com Anticorpo Monoclonal Anti-LDL(-) (MAb-1A3) (10µg/mL, 50,0 µL/poço), diluído em tampão Carbonato-Bicarbonato, (0,25 M, pH 9,6), sendo as placas incubadas por 17 horas a 4°C. Após esse período, as placas foram lavadas três vezes com PBS-Tween (0,05%) e os sítios livres bloqueados com leite desnatado (Molico®, Nestlé, São Paulo, Brasil), diluído a 2% em tampão Fosfato Salina 0,01mol/L (PBS - pH 7,4) e incubados a 37°C por 1:30 hora. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com PBS-Tween (0,05%). Foi adicionado 50,0 µL/poço de plasma diluído 1:1000 em tampão PBS-Tween 0,01% com 1% de leite desnatado (Molico®, Nestlé, São Paulo, Brasil), sendo a placa incubada a 37°C por 1:30 hora. Após essa etapa, a placa foi lavada, conforme descrito anteriormente, e foi adicionado 50,0 µL/poço de anticorpo monoclonal anti-LDL(-) biotinilado (MAb-2C7) diluído em PBS-Tween 0,01% com 1% de leite desnatado (Molico®, Nestlé, São Paulo, Brasil) (10 µg/mL). As placas foram incubadas em a 37°C por 1 hora, em seguida, foram lavadas conforme descrito acima. Após essa etapa, foram adicionados 50,0 µL/poço de estreptoavidina-peroxidase (1:100000) diluída em PBS-Tween 0,01% com 1% de leite desnatado (Molico®, Nestlé, São Paulo, Brasil). As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C, e, novamente lavadas 4 vezes, sendo que a última vez o tampão de lavagem foi deixado em contato com a placa por 30 segundos. A reação de cor foi desenvolvida através da adição de substrato composto por ortofenilenodiamina (OPD), tampão citrato-fosfato (0,1 M, pH 4,2) e H_2O_2 (30%) (250/12/10, µL/mL/µL). As placas foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente, protegidas da luz. A reação foi bloqueada com 50µL/poço de H_2SO_4 (2,0 M) e a absorbância monitorada em 492 nm. Os resultados foram expressos a partir da média das absorbâncias das amostras e, posteriormente, aplicados à curva padrão (0,6 a 20µg/ml) e multiplicados pela respectiva diluição, sendo os resultados expressos em U/L. Todas as análises foram realizadas em duplicata no Laboratório de Nutrição Humana da FSP-USP.

3.16 DETECÇÃO DE AUTO-ANTICORPOS ANTI-LDL(-) NO PLASMA

Os auto-anticorpos anti-LDL (-) foram detectados através de ELISA de captura de anticorpo, conforme proposto por FAULIN et al., (2011). A LDL(-), isolada por FPLC, foi diluída em tampão Carbonato-Bicarbonato (0,25 M, pH 9,6) até concentração final de 0,5 μg de proteína/poço, e incubada overnight a 4°C. Os espaços livres foram bloqueados com 5% de leite desnatado diluído em tampão Fosfato-Salina 0,01mol/L (PBS - pH 7,4) e incubados a 37°C por 2 horas. As placas foram lavadas quatro vezes com PBS-Tween (0,05%). As amostras foram diluídas (1:4000) em PBS e incubadas em temperatura de 37°C por 2 horas. As placas foram novamente lavadas, conforme descrito acima. Foi adicionado 50,0 μL/poço de anti-IgG humana marcada com peroxidase (1:2000) diluída em PBS. As placas foram incubadas por 1 hora e 30 min, à 37°C, seguida de lavagem, conforme descrito acima. A reação de cor se desenvolveu através da adição de substrato composto por 3,3',5,5'-tetrametilbenzina (TMB), tampão citrato-fosfato (0,1M, pH 4,2) e H_2O_2 (30%) (250/12/10, μL/mL/μL). As placas foram incubadas por 30 minutos à 37oC sob proteção da luz. A reação foi bloqueada com 50μL/poço de H_2SO_4 (2,0 M) e a absorbância monitorada em 450 nm. Os resultados foram expressos a partir da média das absorbâncias das amostras e, posteriormente, aplicados à curva padrão de IgG humana (0,008 a 250 mU/L) e multiplicados pela respectiva diluição, sendo os resultados expressos em U/L. Todas essas análises foram realizadas no Laboratório de Nutrição Humana da FSP-USP.

3.17 SUBFRAÇÕES DE LDL E HDL E TAMANHO DE LDL

O tamanho da LDL e as subfrações de LDL e HDL foram determinados através do sistema Lipoprint System, Quantrimetrix®. Esse sistema utiliza em eletroforese linear em gel de poliacrilamida não desnaturante para separar e quantificar as frações e subfrações de lipoproteínas. O teste utiliza um corante lipofílico, que se liga ao colesterol nas partículas de lipoproteínas antes da eletroforese. Os tubos passaram por eletroforese e foram escaneados para determinar a área relativa de cada subfração de lipoproteína, e posteriormente a intensidade da área integrada foi multiplicada pela concentração de colesterol total da amostra, sendo determinada a quantidade de colesterol em cada subfração.

Para realizar esse procedimento 25 μl de plasma foram acrescentados aos tubos de gel, e posteriormente foram adicionados 200 μl da solução gel do Kit de LDL e 300 μl da

solução gel do Kit de HDL. Após homogeneização e fotopolimerizados das amostras por 35 minutos, as lipoproteínas foram separadas por eletroforese no intervalo de 1h a 3 mA.

Para LDL foram identificadas 7 subfrações (LDL-1 a LDL-7), sendo LDL-1 e LDL-2 as partículas grandes e LDL-3 a LDL-7 as partículas pequenas, além da identificação do tamanho médio de partícula de LDL, expressa em nanômetros. A partir do tamanho de LDL os pacientes foram classificados em fenótipo A ($\geq$ 26,8 nm), fenótipo intermediário (26,51 a 26,79 nm) e fenótipo B ($\leq$ 26,5 nm). O fenótipo intermediário e B foram denominados fenótipo não-A.

Para HDL foram identificadas 10 subfrações (HDL-1 a HDL-10), que foram agrupadas do seguinte modo: grande (HDL-1 a HDL-3), intermediárias (HDL-4 a HDL-7) e pequenas (HDL-8 a HDL-10). Todas essas análises foram realizadas no Laboratório de Nutrição Humana da FSP-USP.

3.18 DETECÇÃO DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

A peroxidação lipídica no plasma foi avaliada através da quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), utilizando-se o método descrito por OHKAWA et al., (1979). Ao plasma (75 μl) foi adicionado 1 ml de solução reativa formada pelos ácidos tiobarbitúrico (0,046 M), ácido tricloroacético (0,92 M) e ácido clorídrico (0,25 M), sendo posteriormente incubado em banho-maria fervente com agitação constante (100°C) por 30 minutos. Em seguida as amostras são centrifugadas a 4°C por 15 minutos a 8000g e na sequência foi realizada a leitura de 200 μl do sobrenadante a 535nm. A quantificação foi realizada através da curva padrão (0,2 a 2,0 μmol/ml) de 1,1,3,3 tetraetoxiprapano (TEP). Os valores foram expressos em μmol de TBARs/ml de plasma. Todas as análises foram realizadas em duplicata no Laboratório de Nutrição Humana da FSP-USP.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados coletados foram duplamente digitados no programa EpiData versão 3.1 (*The EpiData Association, 2008*), com o objetivo de eliminar erros de digitação. Os resultados foram apresentados sob a forma de tabelas e gráficos.

Para as variáveis qualitativas, os resultados foram apresentados sob a forma de valor absoluto, seguido de sua respectiva porcentagem. Utilizou-se o teste Qui-quadrado (χ^2) e o teste Exato de Fisher para as comparações entre os indivíduos. Para as comparações das variáveis qualitativas ao longo do tempo utilizou-se o teste de McNemar.

As variáveis quantitativas foram testadas quanto a distribuição utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov ($p>0,05$). Aquelas que apresentaram distribuição normal foram analisadas utilizando-se teste t-Student e para as demais variáveis, utilizou-se os testes não paramétricos de Mann-Whitney.

As mudanças observadas nas variáveis antropométricas, de composição corporal, bioquímicas e de consumo alimentar ao longo do tempo foram analisadas por meio das Equações de Estimação Generalizadas (GEE). Os modelos de variáveis bioquímicas, antropométricas e de composição corporal foram ajustados por sexo, idade e dosagem de drogas antiepilépticas (DAEs).

O ajuste pela dosagem de drogas antiepilépticas foi considerado nessas análises devido aos estudos apresentados na literatura que propõem associação positiva do uso de antiepilépticos com a síntese e metabolismo de colesterol, além da influência nas medidas de composição corporal (CHUANG et al., 2012; KIM et al., 2013; PICKRELL et al., 2013; CHUKWU et al., 2014). Este ajuste foi baseado nos 3 tempos avaliados considerando a quantidade em miligramas (mg) em cada tempo visto que ao longo do período de intervenção essas dosagens podem ser alteradas pela conduta médica.

Para as análises de GEE foram utilizados modelos com distribuição normal e Gamma com função de ligação log, inversa e identidade, e teste de comparação múltipla com objetivo de verificar diferença significativa entre os tempos. Os valores foram apresentados na forma de média e desvio-padrão (DP).

Todos os testes estatísticos foram realizados com o auxílio dos programas *Statistical Package for the Social Sciences*® (SPSS) versão 20.0 e R versão 3.0.2 (*The R Foundation for Statistical Computing*, 2013). O nível de significância adotado para todas as análises foi de $p<0,05$.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

A coleta de dados foi iniciada em junho de 2012 e foram incluídos crianças e adolescentes até setembro de 2013. O último tempo (T2) de coleta foi finalizado em março de 2014.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Os participantes que faltaram na reunião foram remarcados para o mês subsequente e, portanto todos os 52 pacientes que foram contatados por telefone compareceram e participaram da palestra (reunião de grupo). Deste total (n=52), 4 pacientes não possuíam indicação para DC, pois apresentavam controle significativo das crises convulsivas, 5 pacientes não foram incluídos por apresentar diabetes mellitus, hipotireoidismo e/ou Síndrome de Down. Outros 5 pacientes recusaram receber o tratamento alegando não terem condições de organização para o planejamento e preparo da dieta (**Figura 6**).

Após o momento T0, 12 pacientes foram excluídos da pesquisa, 9 por não apresentarem adesão adequada a DC devido a problemas sociais de organização e entendimento familiar, 1 por internações recorrentes devido a um quadro de insuficiência respiratória e dificuldade de manutenção da DC, outro por apresentar intolerância a DC com vômitos recorrentes e 1 por suspensão da DC por orientação médica de outro centro ao verificar o colesterol elevado da adolescente. Portanto, para análise dos resultados foram considerados os pacientes (n=26) que aderiram à dieta até o 3° mês (T1).

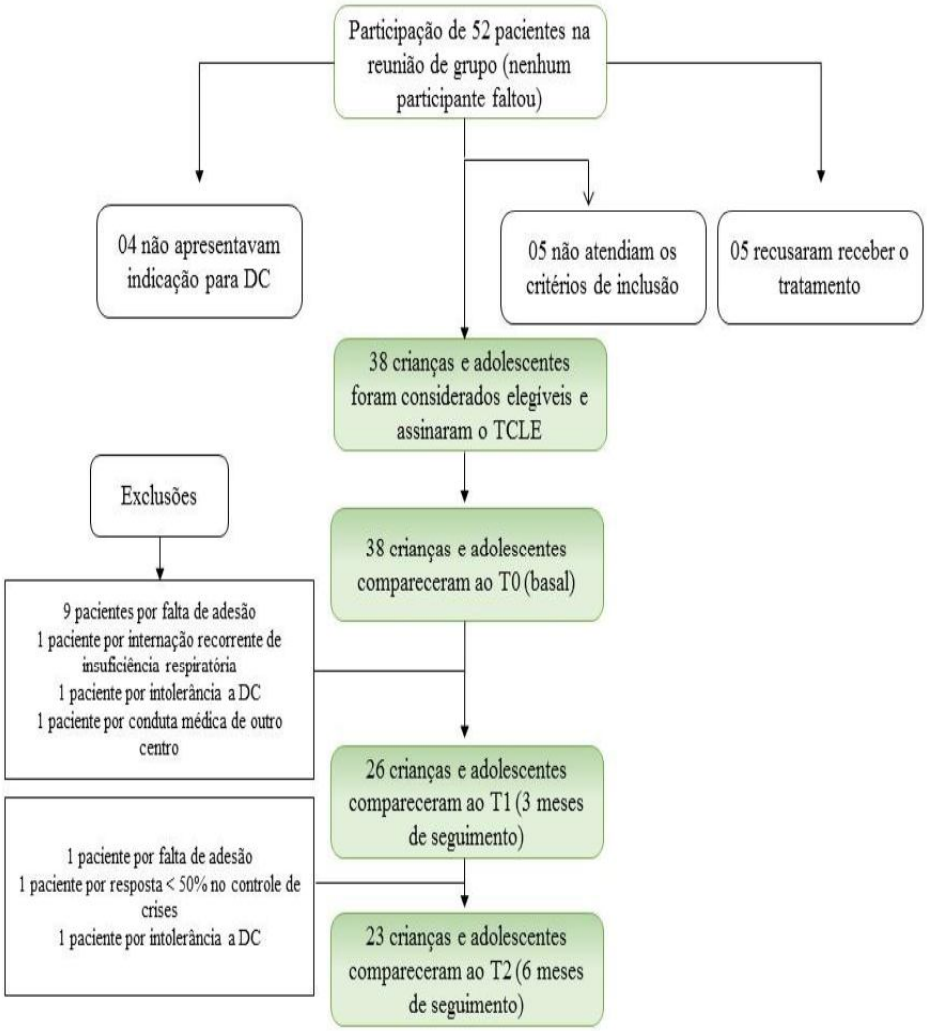


Figura 6: Fluxograma de pacientes inclusos e perdas no seguimento.

Após o T1, as perdas totalizaram 3 pacientes, sendo 1 por intolerância a DC com vômitos recorrentes, 1 por falta de adesão a DC e recusa em continuar seguindo a conduta nutricional mesmo diante da resposta positiva a intervenção e 1 por resposta inferior a 50% de redução no controle das crises com mudanças pouco significativas, mesmo a família aderindo de forma adequada a DC.

5.1.1 Perfil Socioeconômico e clínico

A média de idade dos pacientes inclusos no estudo foi de 6,5 anos (1,3 a 18 anos). Desses, 7 eram adolescentes, conforme critério da WHO (2007), que classifica a faixa etária de adolescente de 10 a 19 anos completos. A maioria dos pacientes era do sexo masculino 76,9%, sendo a raça branca predominante nesta amostra (65,4%). Em relação ao peso de nascimento, segundo a Sociedade Brasileira de Pediatria (SBP, 2007), 53,8% das crianças e adolescentes tinham peso adequado ao nascer e 6 crianças prematuridade ao nascimento, sendo 5 nascidas com peso adequado para idade gestacional (AIG) e 1 criança pequena para idade gestacional (PIG) (**Tabela 3).**

Em relação ao responsável pelo preparo da dieta, o qual recebeu as orientações médicas e nutricionais, a mãe foi a principal responsável (92,3%). A maioria dos responsáveis (64%) apresentaram ensino superior completo ou ensino médio completo. A renda familiar, não apresentou diferença significativa entre os participantes ($p > 0,05$).

A média do número de pessoas que moravam na mesma casa foi 3,78 (0,9), sendo no mínimo 2 e no máximo 6 pessoas. A quantidade de crianças foi em média 1,4 (0,7), sendo que em algumas casas não havia nenhuma criança (visto que alguns participantes eram adolescentes) e o máximo foi de 3 crianças residentes na mesma casa.

Tabela 3 – Caracterização socioeconômica e demográfica dos participantes. Instituto da Criança – HC-FMUSP, São Paulo, 2014.

Variáveis	n	%	P
Sexo			**0,006**
Masculino	20	76,9	
Feminino	6	23,1	
Raça			**0,001**
Branca	17	65,4	
Negra	1	3,8*	**<0,001**
Parda	8	30,8	0,072
Peso ao nascer			**<0,001**
Peso extremamente baixo: < 1000 g	1	3,8*	**0,001**
Baixo peso: < 2500 g	3	11,5*	**0,008**
Peso insuficiente: 2500 ├─ 3000	7	26,9	0,127
Peso adequado: 3000 ├─ 4500	14	53,8	
Excessivamente grande: ≥ 4500	1	3,8*	**0,001**
Idade Gestacional			**0,006**
Pré-termo: < 37 semanas	6	23,1	
Termo: 37 semanas ├─ 42 semanas	20	76,9	
Responsável pela dieta			**< 0,001**
Mãe	24	92,3	
Pai	1	3,8*	**< 0,001**
Avó	1	3,8*	**< 0,001**
Escolaridade do Responsável			**0,037**
Ensino Fundamental Incompleto	1	3,8*	**0,020**
Ensino Fundamental Completo	1	3,8*	**0,020**
Ensino Médio Completo	8	30,8	
Ensino Superior Incompleto	5	19,2	0,405
Ensino Superior Completo	8	30,8	
Pós Graduação	3	11,5	0,132
Renda familiar			**0,688**
< R$ 600	4	15,4	
R$ 600 ├─┤ 1200	2	7,7	
R$ 1200 ├─ 1800	6	23,1	
R$ 1800 ├─ 3000	6	23,1	
R$ 3000 ├─ 6000	5	19,2	
>R$ 6000	3	11,5	

Análise comparativa entre as categorias realizada pelo *teste* X^2 e *Exato de Fisher* . *vs categoria referencial (Raça = Branca; Peso ao nascer = peso adequado; Responsável pela dieta = mãe; Escolaridade do Responsável: ensino superior completo). Nivel de significância adotado p<0,05.

Considerando que o Instituto da Criança (ICr-HC-FMUSP) é um Centro de Referência Nacional, 23,1% das crianças e adolescentes eram de outros estados: 3,8% de Alagoas,

11,6% de Goiás, 7,7% de Pernambuco. E, embora 76,9% eram do estado de São Paulo, 38,5% residiam no interior do estado.

A etiologia da epilepsia e os tipos de crises foram determinados pela neuropediatra com base em exames de imagem, exames genéticos, eletroencefalograma e avaliação clínica (**Tabela 4**). Desta forma a distribuição percentual (%) das doenças de base associadas à epilepsia foi: 34,6% de origem desconhecida; 11,5% má formação do Sistema Nervoso Central (SNC); 11,5% Síndrome de Doose; 7,7% Sequela de meningite; 7,7% Encefalopatia Hipóxia Isquêmica; 7,7% Displasia Cortical; 3,8% Síndrome De Vivo (Deficiência GLUT-1), 3,8% Síndrome de Pallister Killin; 3,8% Acidente Vascular Encefálico (AVE) Perinatal, 3,8% Deleção do cromossomo 2 e 3,8% Heterotropia Periventricular.

Tabela 4 – Etiologia da epilepsia e classificação das crises dos participantes, segundo ILAE (2010). Instituto da Criança – HC-FMUSP, São Paulo, 2014.

Paciente	Etiologia da Epilepsia	Tipos de Crises
1	Sd Doose	Mioclônica Atônica
2	Desconhecida	Tônica
3	Displasia Cortical	Tônica, Espasmos
4	Desconhecida	Tônica
5	Má formação do SNC	Ausência atípica, Mioclônica atônica
6	Sd Doose	Mioclônica Atônica
7	Encefalopatia Hipóxia Isquêmica	Focal e TCG
8	Deficiência GLUT-1	Focal
9	Desconhecida	Espasmos
10	Má formação do SNC	Tônica, Espasmos
11	Sd Doose	Mioclônica Atônica
12	Displasia Cortical	Focal
13	Encefalopatia Hipóxia Isquêmica	Tônica
14	Desconhecida	Mioclônica, Espasmos
15	Desconhecida	Ausência Típica, Tônica, Focal
16	Sd Pallister Killian	TCG
17	AVE perinatal	Espasmos
18	Sequela de meningite	Tônica
19	Má formação do SNC	Espasmos
20	Deleção cromossomo 2	Focal
21	Desconhecida	Ausência mioclônica
22	Desconhecida	Mioclônica Atônica
23	Desconhecida	Tônica
24	Sequela de meningite	Crise não classificada
25	Heterotopia Periventricular	Focal e TCG
26	Desconhecida	Espasmos

Sd: Síndrome; SNC: Sistema Nervoso Central; TCG: Tônico-clônica generalizada, AVE: acidente vascular encefálico.

5.2 EFEITO DA DC NAS CRISES EPILÉPTICAS

Após 3 meses de DC (T1) 64% das crianças e adolescentes apresentaram redução > 50% das crises, sendo esse efeito semelhante após 6 meses de tratamento (68,2%). Destaca-se que 7 participantes não apresentaram mais nenhuma crise convulsiva após 6 meses de DC (**Tabela 5**).

Tabela 5 – Percentual de redução de crises segundo tempo de tratamento. Instituto da Criança – HC-FMUSP, São Paulo, 2014.

Redução de crises	**T1**		**T2**	
	n	**%**	**n**	**%**
Redução <50%	9	36	7	32
Redução 50 a 90%	7	28	7	32
Redução >90%	9	36	8	36

n=25. DC: dieta cetogênica, não foi possível monitorar as crises de 1 criança (crises acompanhadas por EEG).

O uso de drogas antiepilépticas (DAEs) apresentou redução significativa para vigabatrina e nitrazepam após 6 meses de DC, além da redução significativa na quantidade total (mg) das DAEs (**Tabela 6**). Todos os pacientes inclusos nesse estudo utilizavam pelo menos 2 DAEs. O valproatro foi a DAE de primeira escolha utilizada em 62% das crianças e adolescentes, seguida do clobazam (54%) para controle da epilepsia.

Tabela 6 – Frequência e dosagem de antiepilépticos (mg) utilizados pelos participantes segundo tempo de intervenção. Instituto da Criança – HC-FMUSP, São Paulo, 2014.

Drogas Antiepilépticas	**T0** (n=26)		**T1** (n=26)		**T2** (n=23)		
	n (%)	**Posologia (mg)**	**n (%)**	**Posologia (mg)**	**n (%)**	**Posologia (mg)**	**p**
Valproato	16(62)	1016 (795)	16(62)	777 (396)	16(62)	591 (425)	0,150
Clobazam	14(54)	24 (22)	14(54)	21 (16)	14(54)	31 (16)	0,442
Topiramato	10(39)	193 (127)	10(39)	153 (133)	10(39)	315 (387)	0,231
Lamotrigina	9(35)	147 (74)	9(35)	144 (76)	9(35)	142 (102)	0,307
Nitrazepam	6(24)	2 (4)	6(24)	2 (4)	6(24)	1 (4)*,**	**0,031**
Vigabatrina	5(19)	1100 (518)	5(19)	900 (720)	5(19)	200 (274)*,**	**0,035**
Clonazepam	5(19)	5 (7)	5(19)	5 (3)	5(19)	2 (4)	0,357
Levetiracetam	5(19)	1660 (1029)	5(19)	1150 (894)	5(19)	1050 (1304)	0,121
Oxcarbamazepina	4(15)	1080 (831)	4(15)	825 (826)	4(12)	1000 (917)	0,073
Fenobarbital	4(15)	60 (49)	4(15)	60 (49)	4(15)	70 (48)	0,622
Etoxussimida	3(12)	1000 (661)	3(12)	500 (500)	3(12)	417 (382)	0,140
Fenitoína	1(4)	300	1(4)	300	1(4)	300	-
Primidona	1(4)	1000	1(4)	750	1(4)	0	0,310
Carbamazepina	1(4)	400	1(4)	400	1(4)	0	0,310
Total (mg)	-	1417 (1014)	-	1047(801)*	-	1050(976)*	**0,003**

Comparações ao longo do tempo avaliadas pela técnica de Equações de Estimação Generalizadas (GEE). Valores apresentados em média e desvio padrão. *Diferença significativa em relação ao T0, ** Diferença significativa em relação ao T1 (p<0,05).

Da introdução ao 3º mês de DC, 61,4% dos participantes relataram intercorrências: 19,2% apresentaram constipação intestinal; 19,2% vômito; 11,5% náusea, 7,7% diarreia e 3,8% gastrite. Esse percentual foi inferior (15,2%) do 3º ao 6º mês de dieta: 3,8% apresentaram constipação intestinal; 3,8% dor abdominal; 3,8% vômitos e 3,8% náusea.

5.3 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA E COMPOSIÇÃO CORPORAL

A variação dos valores de peso e estatura apresentaram aumento significativo ao longo do tempo, entretanto não foi observada mudança significativa para o índice de massa corporal (IMC) bem como para ZE/I e Z IMC/I/I em nenhum período de avaliação (**Tabela 7**).

Os valores de %MM e %MG não apresentaram diferenças significativas ao longo do período de intervenção. Contudo, a resistência aumentou cerca de 7% no T2, enquanto que a reactância aumentou aproximadamente 11% no T2. Apesar desse aumento, quando o T2 foi comparado ao T1 houve redução significativa em cerca de 4% na reactância. Portanto o

ângulo de fase (AF◦) apresentou aumento significativo apenas após 3 meses de DC, assim como o % de água intracelular (AI), e redução significativa no % de massa extracelular (ME).

Tabela 7 – Caracterização antropométrica e composição corporal por bioimpedância elétrica segundo tempo de intervenção. Instituto da Criança – HC-FMUSP, São Paulo, 2014.

Variáveis	**T0** n=26	**T1** n=26	**T2** n=23	**P**
Peso (Kg)	25,7 (16,4)	29,6 (22,1)*	29,7 (21,9)*	**0,015**
Estatura (cm)	116,5 (24,2)	118,3 (23,9)*	119 (24,2)*,**	<**0,001**
IMC (Kg/m^2)	19 (5,5)	18,7 (6)	18,3 (5,9)	0,219
ZE/I	-0,23(1,3)	-0,34(1,2)	-0,58(1,2)	0,340
Z IMC/I	0,93(1,5)	0,61(1,8)	0,39(1,7)	0,148
R (Ω)	728,9 (141,6)	760,1 (143,6)	776 (155,9)*	**0,032**
Xc (Ω)	58,8 (12,8)	68,1 (17,1)*	65,2 (28,7)*,**	**0,018**
AF◦	4,7 (1,1)	5,4 (1,5)*	4,6 (1,3)	**0,001**
% MCC	38,3 (5,5)	39,4 (7,1)	38,3 (5,8)	0,130
% ME	41,5 (5)	39,5 (6,7)*	41,3 (4,8)	**0,040**
% MM	79,8 (10)	79,7 (1,1)	79,6 (9,9)	0,198
% MG	20,2 (10)	20,1 (11)	20,4 (9,9)	0,193
% AI	69,3 (8,6)	70,8 (9,8)*	68,7 (8,8)	**0,014**
% AE	31,4 (9,1)	30,2 (11,8)	31,3 (8,8)	0,433
% ACTmm	78,2 (6)	77,9 (6)	78,2 (5,5)	0,079
% ACTpeso	62,9 (12)	63,2 (12,9)	62,7 (11,4)	0,900

Comparações ao longo do tempo avaliadas pela técnica de Equações de Estimação Generalizadas (GEE) As variáveis Z E/I e Z IMC/I foram ajustadas pela dosagem total de drogas antiepilépticas. Para as demais variáveis o ajuste foi por sexo, idade e dosagem total de drogas antiepilépticas. Valores apresentados em média e desvio padrão. *Diferença significativa em relação ao T0, ** Diferença significativa em relação ao T1 (p<0,05). IMC: índice de massa corporal; ZE/I: escore Z de estatura para idade; Z IMC/I: escore Z de IMC para idade; R: resistência; Xc: reactância; %MCC: percentual de massa corporal celular; %ME: percentual de massa extracelular; %MM: percentual de massa magra; % MG: percentual de massa gorda; % AI: percentual de água intracelular; % AE: percentual de água extracelular; % ACTmm: percentual de água corporal total da massa magra, %ACTpeso: percentual de água corporal total do peso.

Para a classificação do estado nutricional, segundo o Z IMC/I, crianças e adolescentes foram agrupados em 3 categorias: magreza acentuada ou magreza ou eutrofia; risco de sobrepeso ou sobrepeso e obesidade ou obesidade grave. Embora o percentual de crianças e adolescentes com sobrepeso tenha sido maior (26% no T2 versus 19,2% no T0) e de obesidade menor (17,4% T2 versus 27% no T0) essa variação não foi significativa

(p=0,368), assim como o percentual de crianças e adolescentes em eutrofia que também não apresentou variação entre os tempos (T0=53,8%, T1=61,5% e T2=56,4%) (**Figura 7a**).

Resultados semelhantes foram encontrados para a estimativa de gordura corporal avaliada pela soma das dobras cutâneas, ou seja, não houve mudanças significativas após 3 (T1 versus T0: p=0,445) e 6 (T2 versus T0: p=0,372) meses de intervenção (**Figura 7b**). Na classificação relacionada a soma das dobras as crianças e adolescentes também foram agrupados em 3 categorias: desnutrição, risco de desnutrição ou normalidade (<p85) e risco de obesidade (p85-p95), e obesidade (p>95). Portanto, os resultados desta análise acompanharam a mesma tendência observada na classificação do estado nutricional pelo Z IMC/I.

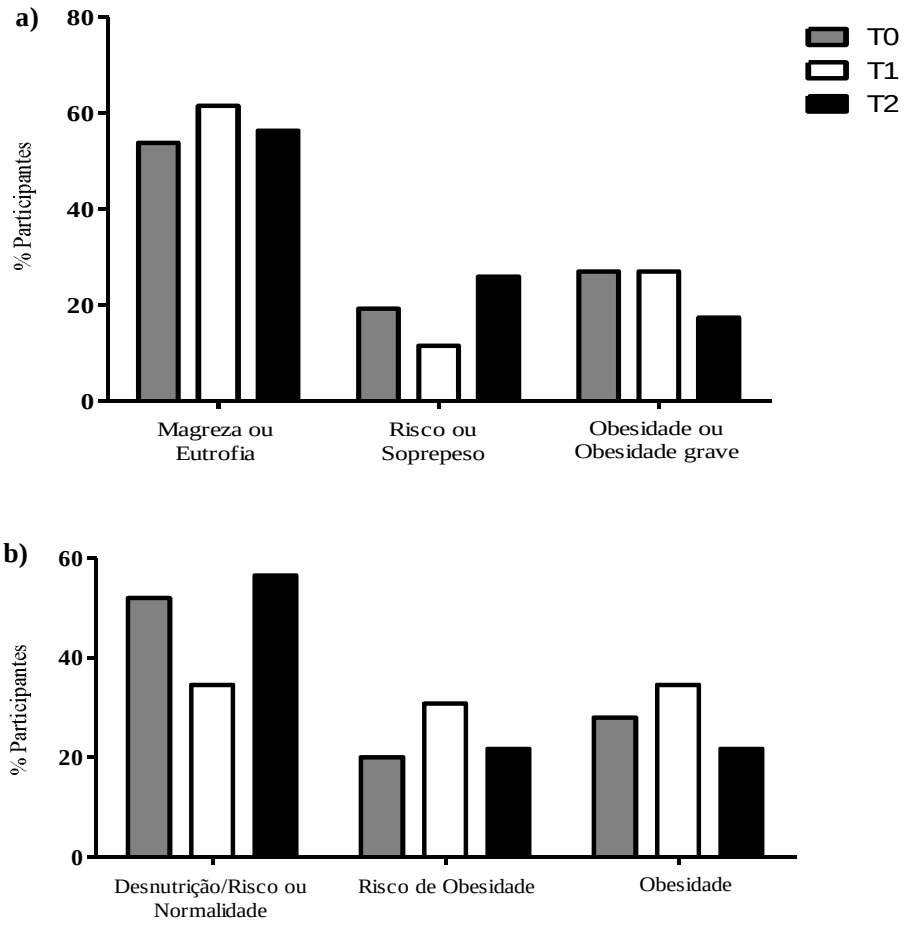


Figura 7: Classificação do estado nutricional, segundo Z IMC/I (WHO, 2006 e 2007) e soma das dobras (DCT e DCS) segundo Frisancho (1990). Instituto da Criança – HC-FMUSP, São Paulo, 2014. Análise comparativa entre as mudanças do estado nutricional e soma das dobras realizada pelo *Teste de McNemar* (p<0,05).

5.4 ADESÃO A DIETA CETOGÊNICA

5.4.1 Dieta Cetogênica

A ingestão energética e de lipídeos foi significativamente menor do que o prescrito, a ingestão de energia foi de 92% em ambos os períodos e de lipídios 89% e 92% no T1 e T2, respectivamente. Entretanto, uma ingestão inferior não desfavoreceu a produção de corpos cetônicos, conforme observado pelo aumento significativo na cetonúria e na concentração plasmática de β-hidroxibutirato (item 5.4.3) (**Figura 8**).

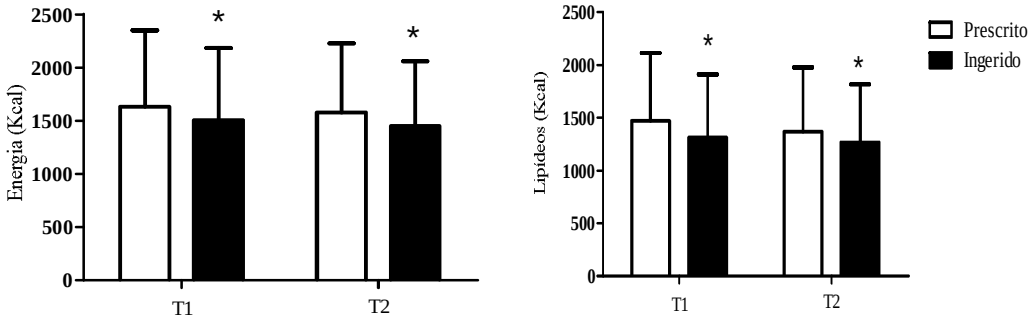


Figura 8: Consumo de energia e lipídeos (Kcal) segundo prescrição, ingestão e tempo de intervenção. *Diferença significativa pela análise comparativa do Teste *t-Student pareado*, com índice de significância de $p<0,05$.

5.4. 2 Cetonúria

Em relação à cetonúria observou-se que todos os pacientes, exceto 1, apresentaram estabilidade da cetose após introdução da DC com maior proporção de gordura (4:1). Portanto, apenas 1 paciente permaneceu na dieta 3:1.

5.4. 3 Detecção de β-hidroxibutirato

O aumento na produção de corpos cetônicos foi confirmado pelo monitoramento da concentração de β-hidroxibutirato, cujos valores aumentaram significativamente com a DC

(p<0,001). Esse aumento representou uma variação de 296% no T1 e 343% no T2 na concentração de β-hidroxibutirato (**Figura 9**).

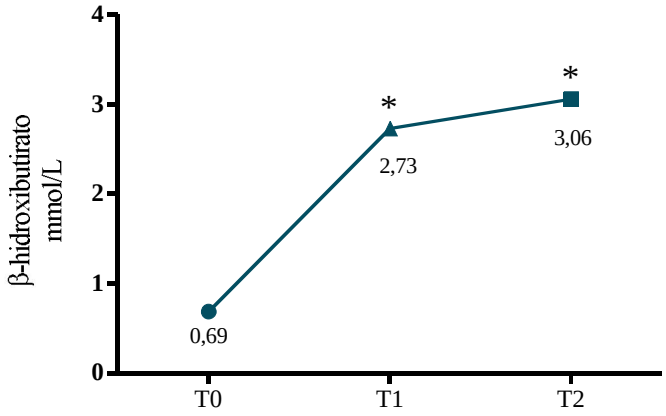


Figura 9: Detecção de β-hidroxibutirato. Comparações ao longo do tempo avaliadas pela técnica de Equações de Estimação Generalizadas (GEE). Valores apresentados em média. *Diferença significativa em relação ao T0 (p<0,05).

5.5 AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR

A média de energia (Kcal) não apresentou diferença significativa entre os tempos e conforme esperado houve redução significativa para o consumo de proteínas, carboidratos e açúcares, além do aumento significativo no consumo de gorduras totais em 209% (T2 vs T0). O consumo de colesterol aumentou em 231% (T2 vs T0), sendo estes resultados coerentes com a prescrição dietética (**Tabela 8**). Proporcionalmente a redução de carboidratos, as fibras também apresentaram redução significativa em 73% (T2 vs T0).

O consumo de ácidos graxos saturados (AGS, 291% e 297%), poli-insaturados (AGP, 156% e 146%) e monoinsaturados (AGM, 188% e 189%) aumentou significativamente após 3 e 6 meses de DC, respectivamente.

Tabela 8 – Caracterização do consumo de energia, macronutrientes, ácidos graxos e fibras, segundo tempo de intervenção. Instituto da Criança – HC-FMUSP, São Paulo, 2014.

Variáveis	**T0** n=26	**T1** n=26	**T2** n=23	**P**
Energia (Kcal)	1319,1 (349,1)	1499,7 (653,4)	1448,2 (596,8)	0,160
Proteínas (g)	53 (15,6)	24,3 (13,6)*	22,1 (10,9)*,**	**<0,001**
Carboidratos (g)	176,3 (50)	22,5 (9,4)*	21,3 (7,9)*,**	**<0,001**
Açúcares (g)	63,5 (31,2)	5,4 (3,1)*	5,0 (2,3)*,**	**<0,001**
Gordura Total (g)	45,6 (11,8)	145,0 (64,6)*	140,9 (59,6)*,**	**<0,001**
Colesterol (mg)	146,1 (54,2)	499,3 (306)*	483,5 (232) *,**	**<0,001**
Fibras (g)	11,8 (4,2)	3,22 (1,2)*	3,14 (1,4)*,**	**<0,001**
Ácidos graxos trans (g)	0,64 (0,71)	0,33 (0,41)	0,38 (0,63)	0,052
AGS (g)	14,6 (6,9)	58 (29,9)*	57,2 (29)*	**<0,001**
16:0 Palmítico (g)	4,1 (2,7)	16,4 (11,1)*	17,2 (12,3)*,**	**<0,001**
18:0 Esteárico (g)	1,6 (1,2)	8,0 (5,8)*	8,4 (6,1)*,**	**<0,001**
AGP (g)	4,8 (4,1)	12,3 (7,4)*	11,8 (6,5)*,**	**<0,001**
18:2 Linoleico (g)	3,6 (2,7)	10,5 (6,6)*	10,2 (5,8)*,**	**<0,001**
18:3 Linolênico (g)	0,4 (0,2)	1,4 (1,0)*	1,2 (0,8)*,**	**<0,001**
20:4 Araquidônico (g)	0,05 (0,04)	0,24 (0,18)*	0,24 (0,14)*	**<0,001**
20:5 EPA (mg)	2,7 (7,1)	12,2 (20)*	7,6 (17,9)	**0,033**
22:6 DHA (mg)	9,7 (11,4)	54 (58)*	38,2 (55,8)*,**	**<0,001**
ômega 3 (g)	0,8 (1,3)	1,2 (0,68)*	1,2 (0,66)*	**<0,001**
ômega 6 (g)	3,9 (2,9)	10,5 (6,6)*	10,1 (5,8)*,**	**<0,001**
ômega 6/ômega 3	4,9 (1,4)	8,7 (2,4)	8,8 (2,4)	0,120
AGM (g)	9,8 (6,4)	38,0 (23,3)*	38,2 (23,8)*	**<0,001**
16:1 Palmitoil (g)	0,5 (0,3)	1,9 (1,6)*	2,0 (1,5)*	**<0,001**
18:1 Oleico (g)	7,3 (5,1)	35,2 (21,7)*	35,3 (22)*	**<0,001**

Comparações ao longo do tempo avaliadas pela técnica de Equações de Estimação Generalizadas (GEE). Valores apresentados em média e desvio padrão referentes ao consumo alimentar ajustados pelo MSM. *Diferença significativa em relação ao T0, ** Diferença significativa em relação ao T1 (p<0,05). AGS: ácidos graxos saturados; AGP: ácidos graxos poli-insaturados; AGM: ácidos graxos monoinsaturados; EPA: ácido graxo eicosapentanoico; DHA: ácido graxo docosaexaenoico

O aumento no consumo de AGS foi associado especialmente ao maior consumo de ácidos graxo palmítico, enquanto que o ácido graxo linoleico e ômega 6 representaram maior contribuição para o aumento dos AGP. Além disso foi observada uma tendência de aumento na relação ômega 6/ômega 3 ao longo do tempo. Para os AGM o ácido graxo oleico apresentou o maior percentual de aumento, aproximadamente 383% em ambos os tempos (T1 e T2 vs T0).

Desta forma, apenas os ácidos graxos trans não apresentaram mudança significativa ao longo da intervenção.

A **Tabela 9** apresenta o conteúdo de micronutrientes: vitaminas, antioxidantes e minerais. Os suplementos de micronutrientes utilizados pelos pacientes foram considerados, ou seja, somados aos micronutrientes consumidos pela dieta alimentar.

As vitaminas lipossolúveis apresentaram aumento significativo para vitamina K (202%) e vitamina E (162%) no T2 vs T0, enquanto o consumo de vitamina D reduziu em 62,5% neste mesmo período. Já as vitaminas do complexo B em geral apresentaram aumento significativo durante a intervenção. Não foi observada diferença para os antioxidantes α e β-caroteno, bem como para vitamina A. Apesar do aumento do licopeno em T2 vs T1, este apresentou redução significativa em comparação ao T0.

O consumo de cálcio e sódio apresentou diminuição significativa ao longo da intervenção, sendo a redução de aproximadamente 56% para o cálcio e 70% para o sódio após 6 meses de DC.

Tabela 9 – Caracterização do consumo de micronutrientes (vitaminas, antioxidantes e minerais) segundo tempo de intervenção. Instituto da Criança – HC-FMUSP, São Paulo, 2014.

Variáveis	**T0** n=26	**T1** n=26	**T2** n=23	**P**
Vitamina A (mg RE)	195,7 (402,9)	138,4 (143,5)	146,5 (180,9)	0,490
Vitamina D (μg)	16,0 (66)	3,1 (3,6)*	6,0 (7,9)*,**	**0,006**
Vitamina E (mg α-toco)	3,4 (2,8)	6,7 (3,8)*	8,9 (4,0)*,**	**0,002**
Vitamina K (μg)	41,1 (46,2)	87,6 (54)*	124,3 (127)*,**	**0,002**
Vitamina B1 (mg)	0,76 (0,38)	1,1 (0,6)*	1,4 (0,7)*,**	**0,020**
Vitamina B2 (mg)	1,0 (0,64)	1,2 (0,7)	1,5 (0,7)*,**	**0,039**
Vitamina B3 (mg)	10,6 (6,1)	12,7 (10,5)	17,7 (10,4)*,**	**0,005**
Vitamina B6 (mg)	0,9 (0,38)	1,2 (0,7)*	1,5 (0,7)*,**	**0,044**
Vitamina B12 (μg)	2,3 (1,7)	3,4 (2,2)*	3,8 (2,1)*,**	**0,039**
Vitamina C (mg)	62,7 (46,2)	50,2 (19,4)	63,2 (30,2)	0,990
Folato (μg)	158,2 (99,1)	144,6 (127)	198,2 (142,6)	0,260
α-caroteno (μg)	560,6 (896)	566,8 (815,3)	526,6 (539,1)	0,831
β-caroteno (μg)	1313,9 (1416)	1602,5 (843,6)	1986,5 (1268,6)	0,140
Licopeno (μg)	1408,8 (458,2)	689,1 (351,6)*	872,7 (648,8)*,**	**0,046**
Cálcio (mg)	844,7 (509,8)	339,8 (329)*	374,9 (276,9)*,**	**<0.001**
Ferro (mg)	13,1 (13,4)	7,4 (4,9)	8,9 (4,4)	0,060
Zinco (mg)	7,2 (5,3)	6,7 (5,3)	8,4 (5)	0,470
Sódio (mg)	1726,7 (631,2)	628,7 (383,7)*	527,1 (289,1)*,**	**<0.001**

Comparações ao longo do tempo avaliadas pela técnica de Equações de Estimação Generalizadas (GEE). Valores apresentados em média e desvio padrão referentes ao consumo alimentar e ingestão de suplementos de vitaminas e minerais. *Diferença significativa em relação ao T0, ** Diferença significativa em relação ao T1 ($p<0,05$).

5.6 PERFIL BIOQUÍMICO

A concentração de CT, TG, LDL-C, HDL-C, APO A-I e APO B aumentou significativamente em ambos os períodos de intervenção (T2 e T1 vs T0). Esse perfil foi semelhante nas relações CT/HDL-C, LDL-C/HDL-C, APO B/APO A-I e na Não-HDL-C, exceto na relação TG/HDL-C que apesar do aumento de 37% no T2, esse não foi significativo **(Tabela 10)**.

A concentração de AGNEs no plasma aumentou significativamente ao longo do tempo. Perfil semelhante foi observado com o marcador de peroxidação lipídica, TBARS, entretanto este aumento não foi significativo comparando-se o T2 vs T1 (**Tabela 10**). Contrário a esse perfil, a concentração de LDL(-) mostrou redução ao longo da intervenção (T1 vs T0 e T2 vs T0, exceto T2 vs T1), enquanto os Auto anticorpos Anti-LDL(-) apresentaram redução significativa apenas no T2.

Tabela 10 – Perfil bioquímico segundo tempo de intervenção. Instituto da Criança – HC-FMUSP, São Paulo, 2014.

Variáveis	T0 n=26	T1 n=26	T2 n=23	p
CT (mg/dL)	156 (28)	242 (85)*	230 (81)*	<**0,001**
TG (mg/dL)	81 (37)	103 (49)*	119 (88)*	**0,003**
LDL-C (mg/dL)	91 (21)	160 (75)*	152 (70)*	<**0,001**
HDL-C (mg/dL)	48 (13)	61 (19)*	58 (17)*	**0,001**
APO A-I (mg/dL)	119 (17)	143 (34)*	140 (30)*	<**0,001**
APO B (mg/dL)	89 (15)	139 (55)*	138 (59)*	<**0,001**
CT/HDL-C	3,5 (1,4)	4,3 (2,0)*	4,4 (2,6)*	**0,012**
LDL-C/HDL-C	2,1 (1,1)	2,9 (1,7)*	2,9 (2)*	**0,026**
Não-HDL-C	107 (24)	181 (86)*	172 (83)*	<**0,001**
TG/HDL-C	1,9 (1,7)	1,9 (1,4)	2,6 (3,2)	0,284
HDL/APO A-I	0,4 (0,1)	0,4 (0,1)	0,4 (0,1)	0,340
LDL/APOB	1,0 (0,2)	1,1 (0,2)	1,1 (0,1)	0,073
APOB/APO A-I	0,8 (0,2)	1 (0,4)*	1 (0,6)*	**0,002**
AGNE (mmol/L)	0,82 (0,9)	1,1 (0,5)*	1,6 (0,5)*,**	<**0,001**
TBARS (µmol/mL)	6,1 (1,7)	7,3 (1,8)*	7,2 (1,6)*	**0,014**
LDL (-) (U/L)	2,2 (1,6)	1,3(1,3)*	1,4(1,6)*	**0,008**
Anti-LDL(-) U/L	0,2 (0,1)	0,2 (0,1)	0,1 (0,1)*	**0,024**
LDLgrande (%)	44 (12,5)	87,5(40,9)*	71,9(27,2)*,**	<**0,001**
LDLpequena (%)	1 (1,2)	9,2(10,2)*	17,3(22,8)*,**	<**0,001**
LDL (nm)	27,3(1,8)	27(3,3)*	26,7(5,8)*,**	<**0,001**
HDLgrande (%)	27,3(7,7)	29,4(9)	30,4(10)	0,530
HDLintermediária (%)	51,9(6,5)	47,3(6,9)	50,8(7,5)	0,050
HDLpequena (%)	20,7(6,6)	23,3(8,4)	18,8 (8,4)**	**0,033**

Comparações ao longo do tempo avaliadas pela técnica de Equações de Estimação Generalizadas (GEE) ajustados por sexo, idade e dosagem total de drogas antiepilépticas. Valores apresentados em média e desvio padrão. *Diferença significativa em relação ao T0, ** Diferença significativa em relação ao T1 (p<0,05).

Considerando o ponto de corte para o CT ≤ 200mg/dL, proposto pela Academia Americana de Pediatria (2011), observamos que 12% das crianças e adolescentes apresentavam dislipidemia no início da intervenção. Após 3 meses de DC esse percentual aumentou para 50% e após 6 meses de DC para 52%.

Em relação aos TG (TG ≤ 100 mg/dL para crianças de 0 a 9 anos; TG ≤ 130 mg/dL para crianças de 10 a 19 anos), observamos que 19% dos pacientes no T0 apresentaram hipertrigliceridemia. Essa frequência aumentou para 31% no T1 e 48% no T2 (AAP, 2011).

Se considerarmos a LDL-C (LDL ≤ 130mg/dL), apenas 3,8% dos pacientes no T0 apresentavam concentração de LDL elevada, enquanto no T1 verificamos que 62% eram dislipidêmicos e no T2 esta prevalência foi de 44% (AAP, 2011).

Avaliando-se a não-HDL-C (ponto de corte ≤ 145 mg/dL), 3,8% dos pacientes tinham valores elevados no T0, já no T1 e T2, 62% e 52% apresentaram valores acima do ponto de corte, respectivamente.

Em relação à APO B (≤ 110mg/dL), observamos relação semelhante a não-HDL, onde 3,8% dos pacientes no T0 apresentaram concentração aumentada; enquanto 70% dos pacientes no T1 e 57% dos pacientes no T2 apresentavam valores acima da recomendação (AAP, 2011). Enquanto a APO A-I apresentou valores baixos em 42,3% dos pacientes no T0 (< 115 mg/dL), esse percentual foi reduzido para 23,1% no T1 e 26,1% no T2.

Na **Figura 10** observamos as diferenças significativas nas concentrações dos principais marcadores do perfil lipídico clássico. Nessa figura verificamos tendência progressiva e significativa no aumento desses marcadores no T1. Entretanto, embora o tempo T2 tenha apresentado aumento superior em relação ao T0 podemos observar que nesse período não houve mudança significativa quando comparado ao T1, sendo os valores absolutos dos deltas (ΔT2-T0) inferiores ou iguais (ΔT1-T0), exceto para o TG que numericamente foi superior (**Figura 10b**).

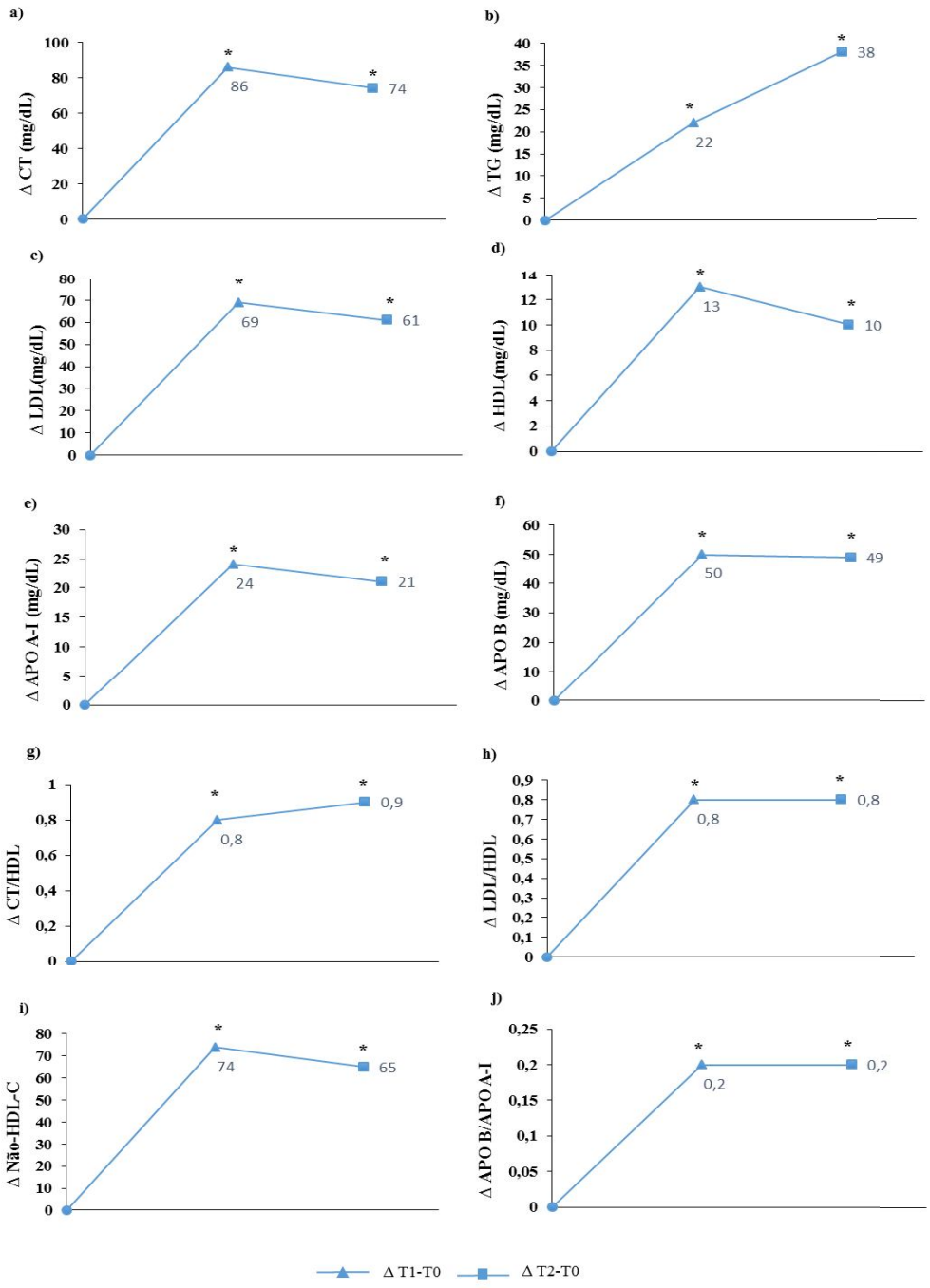


Figura 10: Mudanças no perfil lipídico clássico e suas relações segundo tempo de intervenção. Comparações ao longo do tempo avaliadas pela técnica de Equações de Estimação Generalizadas (GEE) ajustados por sexo, idade e dosagem total de drogas antiepilépticas. *Diferença significativa em relação ao T0 ($p<0,05$).

Os resultados encontrados para os principais marcadores de estresse oxidativo demonstraram mudança progressiva na concentração de AGNE no T1 vs T0 e T2 vs T1, diferentemente do observado para TBARS que parece demonstrar tendência de estabilidade (T2 vs T1) (**Figura 11a e Figura 11b**). Além disso, a LDL(-) também não apresentou mudança significativa no período T2 – T1 (**Figura 11c**).

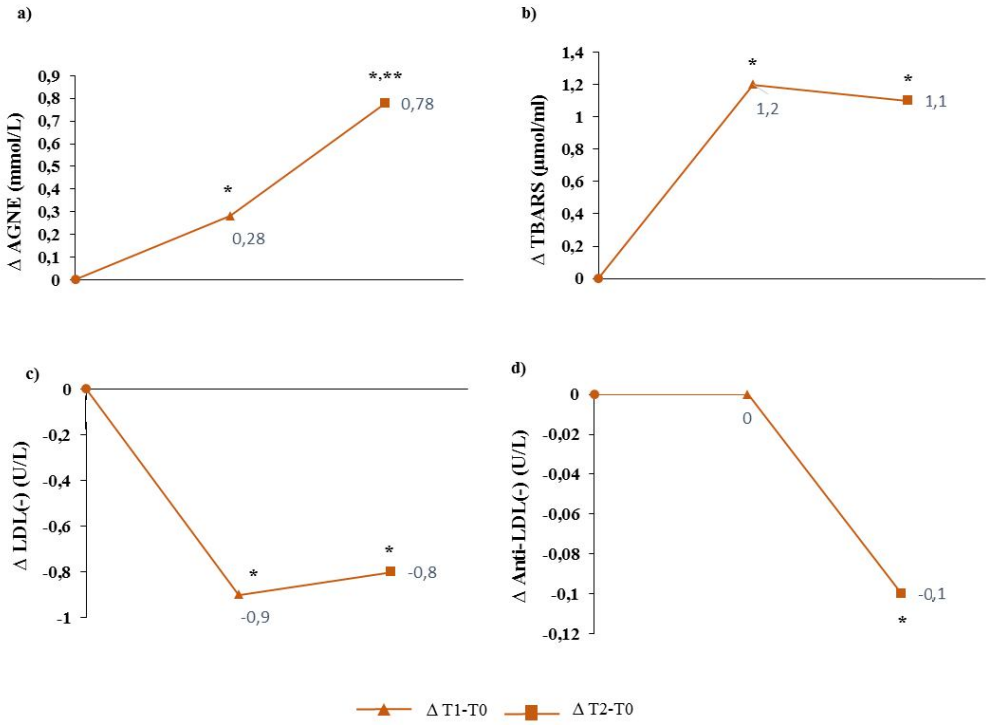


Figura 11: Mudanças nos principais marcadores associados ao estresse oxidativo e concentração de AGNEs, segundo tempo de intervenção. Comparações ao longo do tempo avaliadas pela técnica de Equações de Estimação Generalizadas (GEE) ajustados por sexo, idade e dosagem total de drogas antiepilépticas. *Diferença significativa em relação ao T0 ($p<0,05$).

Diferentemente da tendência observada na concentração de LDL (**Figura 10c**) as subfrações desta partícula sofreram constantemente alterações durante o período de intervenção. As partículas grandes de LDL (LDL-1 + LDL-2) inicialmente (T1 vs T0 apresentaram aumento significativo, enquanto que no período posterior (T2 vs T1) o percentual dessas partículas foi reduzido (**Figura 12a**).

De modo contrário, as subfrações pequenas de LDL (LDL-3 a LDL-7) apresentaram aumento progressivo ao longo do tempo, sendo o percentual aproximadamente duas vezes superior no T2 em relação ao T1. Em consequência a essa mudança no perfil da qualidade das subfrações, o tamanho médio da LDL reduziu significativamente ao longo do tempo (**Figura 12c**).

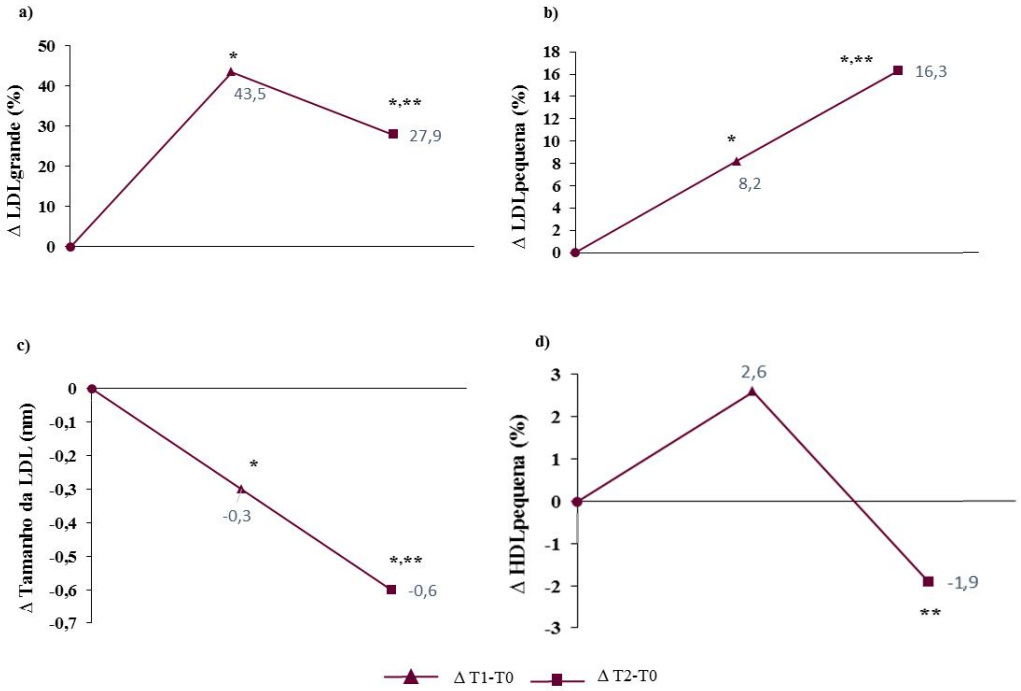


Figura 12: Mudanças nas subfrações e no tamanho médio de LDL segundo tempo de intervenção. Comparações ao longo do tempo avaliadas pela técnica de Equações de Estimação Generalizadas (GEE) ajustados por sexo, idade e dosagem total de drogas antiepilépticas. *Diferença significativa em relação ao T0, ** Diferença significativa em relação ao T1 ($p<0,05$).

Além desses resultados associados a variáveis contínuas, observamos também mudança na variável categórica relacionada a qualidade da partícula de LDL: 100% dos participantes apresentavam fenótipo A no T0, 30,7% dos participantes migraram para fenótipo não-A no T1 e 52,1% dos participantes apresentavam fenótipo não-A no T2.

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou os benefícios da DC no tratamento da epilepsia refratária com redução de pelo menos 50% das crises em 64% dos pacientes no T1 e 68,2% no T2. Apesar dos benefícios clínicos terem sido inquestionáveis, nossos resultados demonstraram que a administração de DC promoveu diversas alterações bioquímicas contribuindo para o aumento do risco cardiometabólico das crianças e adolescentes participantes.

As principais complicações clínicas da aterosclerose como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral geralmente ocorrem em adultos, entretanto o desenvolvimento da aterosclerose se inicia nos primeiros anos de vida e seu progresso está diretamente associado a concentração plasmática das lipoproteínas (AHA, 2005; AAP, 2011).

As lipoproteínas são compostas de colesterol esterificado, colesterol não esterificado ou colesterol livre, TG, fosfolípides, e apolipoproteínas, sendo mais leves as lipoproteínas com maior concentração de lipídios e mais pesadas as que apresentam maior proporção de proteínas (SBC, 2013). Dentre os fatores de risco para doenças cardiovasculares o aumento na concentração da LDL e TG são os principais riscos metabólicos associados (WHO, 2011).

As alterações observadas neste estudo indicam que múltiplas modificações ocorreram no metabolismo lipídico após início da DC. Observamos aumento de 38% e 40% de crianças e adolescentes hipercolesterolêmicos (CT $\geq$ 200 mg/dL) e hipertrigliceridemia progressiva ao longo do tempo, 38% e 48% dos pacientes no T1 e T2, respectivamente.

De acordo com os estudos de RODRIGUES et al., (2009) e CONCEIÇÃO-MACHADO et al., (2013) em adolescentes, a concentração de TG está associada ao acúmulo de lipoproteínas de baixa densidade e, consequentemente, ao desenvolvimento da aterosclerose.

As associações entre a concentração de lipoproteínas e o desenvolvimento da aterosclerose em crianças e adolescentes foram retratadas previamente pelo “Bogalusa Heart Study” (BERENSON et al., 1998). Este estudo avaliou a autopsia de 204 indivíduos de 2 a 39 anos e verificou a ocorrência de estrias gordurosas e placas fibrosas nas artérias coronárias e aorta em 28% das crianças e adolescentes de 2 a 15 anos. Essas lesões arteriais foram correlacionadas significativamente com a concentração de CT, LDL e TG.

As apolipoproteínas também estão associadas ao risco cardiometabólico e as doenças cardiovasculares. A APO B, principal componente proteico da LDL, representa um forte indicador do número de partículas aterogênicas circulantes (OTOKOZAWA et al., 2009).

Enquanto que a APO A-I, principal componente proteico da HDL, é considerada um marcador anti-aterogênico (ROHRER et al., 2004, NGUYEN et al., 2013).

Nossos resultados mostraram que houve aumento significativo da LDL, paralelo a elevação em torno de 55% no conteúdo total de APOB nos dois períodos de DC. Já a APO A-I apresentou aumento significativo de 20% e 18% ao longo do tempo. Portanto, o aumento da APOB foi superior em aproximadamente 35% ao aumento de APO A-I, e a relação APOB/APO A-I confirmou esta tendência, embora não foi observado aumento quando se comparou T2 vs T1.

Desta forma, os resultados obtidos em relação à concentração de lipoproteínas pelo aumento de 76% e 67% na LDL ao longo do tempo e o aumento da APOB indicam um efeito pro-aterogênico da DC. Entretanto essas variáveis parecem apresentar uma tendência de estabilidade ou redução quando observamos o valor médio absoluto ao longo da intervenção do T2 vs T1 (**Figura 10**).

O aumento de colesterol na HDL, lipoproteína cardioprotetora por suas propriedades antioxidantes, ação anti-inflamatória e inibitória das moléculas de adesão (BACHORIK e ROSS, 1995), foi proporcionalmente inferior ao aumento observado nas partículas pró-aterogênicas, e apesar de não ter sido significativo os valores médios de HDL também apresentaram tendência semelhante de manutenção ou redução observada na concentração de CT e LDL-C.

Se considerarmos o tempo de uso da DC de 3 a 4 meses e sua relação com a concentração de lipoproteínas em crianças e/ou adolescentes com epilepsia refratária, dois estudos são descritos na literatura (LIU et al., 2003; LIU et al., 2013). Para um período de acompanhamento maior (≥ 6 meses), a literatura apresenta quatro estudos do impacto da DC sobre o perfil lipídico (KWITEROVICH et al., 2003; NIZAMUDDIN et al., 2008; TUMAS et al., 2010; LIU et al., 2013).

O estudo de LIU et al., 2003 encontrou resultados semelhantes ao nosso, com aumento significativo na concentração de CT e LDL (24% e 35%, respectivamente) nas crianças submetidas a DC clássica (n=14) por 4 meses.

Esses mesmo autores (LIU et al., 2003) descreveram também aumento significativo de TG (33%) nas crianças que receberam a DC contendo TCM (n=11), enquanto as crianças que receberam a DC clássica não apresentaram aumento significativo de TG, indicando que as diferenças na composição da DC induzem respostas distintas no metabolismo lipídico.

Diferentemente do estudo de LIU et al., (2003) nossos pacientes que receberam a DC clássica apresentaram aumento contínuo na concentração de TG ao longo da intervenção.

Kang et al., (2004) avaliando 129 crianças submetidas a DC em um período menor (4 semanas), observaram que 4,7% apresentaram hipercolesterolemia e 6,9% apresentavam hipertrigliceridemia após a intervenção, evidenciando que o impacto negativo da DC sobre o o metabolismo lipídico ocorre precocemente.

Perfil semelhante ao nosso foi observado no estudo de KWITEROVICH et al (2003) que descreveu aumento na concentração de TG (+60,4%) e demais frações lipídicas e apoprotéicas: CT (+33,3%), LDL (+48%), e APO B (57,3%) após 6 meses de intervenção.

O estudo brasileiro de TUMAS et al., (2010) que avaliou o efeito da DC no perfil lipídico, também mostrou elevação na concentração de CT (14,2%) e LDL (10,24%) em um período de 6 a 12 meses de dieta, que se manteve crescente ao longo do tempo (após 18 a 24 meses). De modo contrário aos nossos resultados, a concentração de TG apresentou tendência de redução após o primeiro período avaliado (6 a 12 meses).

Similarmente ao nosso estudo, NIZAMUDDIN et al., (2008), após 6 meses de intervenção, crianças submetidas a DC mostraram aumento na frequência de hipercolesterolemia (35%, CT ≤ 200mg/dL), aumento na LDL (19%, LDL ≤ 130mg/dL), na HDL (17%, HDL > 35mg/dL), e aumento para TG (27%, TG ≤ 130mg/dL e TG ≤ 200mg/dL, conforme idade).

De maneira geral, observamos que a principal diferença encontrada nos estudos da literatura em comparação aos nossos resultados está relacionada especialmente à concentração de TG. Essas diferenças provavelmente estão associadas à composição da DC que mesmo sendo uma dieta clássica provavelmente apresentam fontes distintas de gordura. Essa possibilidade não pode ser confirmada, pois a maioria dos estudos não descreve a composição de alimentos presentes na DC, seja ela clássica ou não.

Verificamos também em nosso estudo aumento de colesterol não-HDL após 3 meses de intervenção. Entretanto esse aumento não foi progressivo ao longo dos 3 meses seguintes de seguimento. Segundo a Academia Americana de Pediatria (2011), a não-HDL vem sendo identificada como preditor da presença de aterosclerose tanto em adultos como em crianças, sendo considerada fator mais preditivo para dislipidemia persistente que o CT, LDL ou concentração isolada de HDL.

Adicionalmente ao impacto negativo da não-HDL, a razão TG/HDL também vem sendo considerada como índice de aterogenicidade e está associada não apenas com fatores de risco clássicos, mas também com fatores de risco emergentes sendo indicativo de maior risco cardiometabólico em crianças (QUIJADA et al., 2008; BAILEY et al., 2014).

Entretanto, apesar de observarmos uma tendência de aumento nossos resultados não mostraram variação significativa na razão TG/HDL ao longo do estudo.

Recentemente, LIU et al., (2013) mostraram que crianças dislipidêmicas podem receber a DC, otimizando a oferta de gorduras poli-insaturadas e reduzindo a quantidade de gorduras saturadas. A mudança na qualidade da gordura nesse estudo refletiu na redução significativa do CT e LDL normalizando o perfil lipídico dessas crianças nos períodos avaliados (3, 6 e 12 meses de tratamento). Em nosso estudo, verificamos o aumento no consumo de ácidos graxos poli-insaturados. Entretanto, o aumento de ácidos graxos saturados foi 2 vezes maior que o aumento de ácidos graxos poli-insaturados, influenciando negativamente a concentração das lipoproteínas.

Os ácidos graxos saturados, além dos ácidos graxos trans, são os que mais contribuem para o aumento da LDL. O consumo de 1% do valor calórico total de ácidos graxos saturados está associado ao aumento de 1,3 a 1,7 mg/dL na concentração de LDL e 0,4 a 0,5 mg/dL de HDL-C, sendo o ácido graxo palmítico um dos principais responsáveis pelo aumento da LDL e da HDL (MENSINK et al., 2003; VAN HORN et al., 2008).

A concentração plasmática das lipoproteínas não são completamente preditoras do risco cardiometabólico ou cardiovascular, pois as lipoproteínas são estruturas heterogêneas compostas por múltiplas frações, variando quanto ao tamanho de partícula, densidade e composição química. Essas características contribuem para a geração de partículas pequenas e mais densas de LDL que estão mais associadas com o aumento do risco cardiovascular (HIRAYAMA e MIIDA, 2012, DIFFENDERFER et al., 2014).

Na literatura não foi encontrada descrição do perfil estrutural das lipoproteínas em crianças ou adolescentes submetidos a DC. Portanto, o presente estudo representa o primeiro estudo na literatura a descrever o impacto da DC na concentração e tamanho de partículas lipoproteicas em crianças e adolescentes com epilepsia refratária submetidas ao tratamento com DC.

Em estudos com crianças e adolescentes, mas não no contexto da DC, as partículas pequenas de LDL são associadas ao maior percentual de gordura corporal, maior circunferência da cintura, concentração de TG e APO B elevadas e baixa concentração de colesterol associado à HDL (ARISAKA et al., 1997; MIYASHITA et al., 2006; BURNS e ARSLANIAN 2009).

Os resultados obtidos em nosso estudo mostraram impacto negativo da DC sobre as características físicas da LDL. Essa relação foi reforçada pelo estudo de VERHOYE et al.,

(2009), pois as partículas menores além de penetrarem mais facilmente na camada subendotelial também são mais susceptíveis a oxidação.

Ao longo do tempo o aumento do percentual de partículas pequenas de LDL, bem como a redução média do tamanho dessas partículas foram significativos. Portanto, apesar da elevação da concentração de LDL apresentar maior impacto na fase "inicial" da DC (T1), a dieta permaneceu influenciando negativamente a qualidade dessas partículas ao longo de todo o estudo. Essa resposta pode estar associada especialmente ao aumento de TG, pois altas concentrações de TG estão fortemente associadas a formação de partículas pequenas de LDL (SBC, 2013; HIRAYAMA et al., 2012, DIFFENDERFER et al., 2014).

A qualidade da LDL também está associada a classificação do fenótipo, onde o tamanho da LDL determina um perfil mais ou menos aterogênico. Conforme demostrado no trabalho de SNISKY et al., (2013), até o momento, a literatura não estabeleceu um consenso de ponto de corte para essa classificação, mas diversos estudos associaram o fenótipo B ou fenótipo não-A a um perfil mais aterogênico e um menor tamanho de LDL (AUSTIN et al., 1990, CROMWELL et al., 2004; SNINSKY et al., 2013).

O estudo de AUSTIN et al., (1990) que avaliou as subfrações da LDL por técnica de eletroforese em gel atribuiu o fenótipo B a um ponto de corte < 25,5 nm e fenótipo A ≥ 25,5 nm. Enquanto que a determinação por ressonância magnética utilizada em diversos estudos (WESTMAN et al., 2006; OTVOS et al., 2011) atribuiu fenótipo B para um diâmetro < 20,6 nm e fenótipo A ≥ 20,6 nm.

A técnica de eletroforese em gel utilizada no presente estudo atribuiu fenótipo não-A para partículas de LDL < 26,8 nm e os resultados encontrados permitiram confirmar a contribuição da DC no fenótipo mais aterogênico: 30,7% dos participantes passaram a ter fenótipo não-A no T1 e 52,1% no T2.

As subfrações de HDL foram menos modificadas pela DC que as subfrações de LDL. O percentual das partículas grandes de HDL não sofreu mudanças significativas e as partículas pequenas de HDL apresentaram redução somente após 6 meses de intervenção.

A relação do tamanho da HDL e o risco cardiovascular ainda apresentam controvérsias na literatura. No estudo de FREEDMAN et al., (2001), o peso, a concentração plasmática de TG e LDL foram inversamente associadas à concentração de partículas grandes de HDL em crianças e adolescentes, enquanto que em outro estudo com adolescentes obesos, a adiposidade visceral foi preditora de partículas grandes de HDL (D´ADAMO et al., 2010).

Segundo BARTER et al., (2003) e PIRILLO et al., (2013) as partículas grandes de HDL são mais competentes no transporte reverso de colesterol, entretanto as partículas pequenas de HDL apresentam maior propriedade antioxidante e anti-inflamatória protegendo a oxidação da LDL na camada subendotelial por meio da ação das espécies reativas de oxigênio (ROS) (KONTUSH e CHAPMAN, 2010; CAMONT et al., 2011).

As alterações no perfil lipídico proveniente da DC também podem favorecer a geração de ácidos graxos não esterificados contribuindo para ativação de diversas vias pró-inflamatórias e desenvolvimento da aterosclerose. De acordo com GRUZDEVA et al., (2013), o aumento de AGNEs pode favorecer a ativação das moléculas de adesão do endotélio, elevar a produção de ROS e a oxidação da LDL, além de desencadear a disfunção endotelial, potencializando a ativação de mecanismos aterogênicos. No presente estudo observamos aumento progressivo significativo de AGNEs tanto na fase "inicial" e "final" como entre ambas as fases de intervenção.

As modificações oxidativas das lipoproteínas também estão relacionadas com a progressão da aterosclerose, sendo o aumento dos produtos de oxidação mantido em detrimento à depleção de antioxidantes a favor do estresse oxidativo (STEINBERG 2009; KETELHUTH et al., 2011).

Embora estudos prévios mostrem que a LDL(-) está associada a um perfil mais aterogênico (BENÍTEZ et al, 2004; OLIVEIRA et al., 2006), nossos resultados mostraram redução de LDL(-) ao longo do período de intervenção. Esse perfil foi oposto ao aumento na concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Essa aparente contradição entre marcadores de estresse oxidativo pode estar associada aos seguintes mecanismos: I – as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico reagem com o malonaldeído (MDA), sendo portanto um produto da peroxidação lipídica avançada (SCHUH et al., 1978), II – a LDL(-) tem mínimas características oxidativas, indicando ser um marcador precoce de oxidação (DAMASCENO et al., 2006) e III – a LDL(-) tem múltiplas vias de origem, além da oxidativa (SANCHEZ-QUESADA et al., 2004). Portanto, é plausível propor que a DC esteja estimulando a oxidação da LDL e, portanto, a LDL(-) estaria diminuindo, enquanto a concentração de TBARS aumentaria.

Outro ponto importante são os nutrientes com potencial antioxidante, destacando-se o α-tocoferol que representa o principal antioxidante da LDL, atuando na proteção das lipoproteínas frente aos radicais de livres com consequente inibição de receptores *scanvergers*, e inibição na geração de LDL oxidada (TUCKER 2005).

O estudo de MAFRA et al., (2009) mostrou redução na concentração de LDL(-) de pacientes em hemodiálise após a suplementação com α-tocoferol. Contraria a essa hipótese, PEREIRA et al., (2004) mostraram que a suplementação com α-tocoferol não conferiu proteção adicional a indivíduos dislipidêmicos sob uso de estatinas na redução de LDL(-).

Considerando ainda os marcadores relacionados ao perfil oxidativo, a concentração de anticorpo anti-LDL(-) apresentou redução após 6 meses de DC sugerindo que a maior concentração de anticorpos no T1 aliada a redução na concentração de LDL(-) pode estar associada a uma resposta aguda protetora frente a alta ingestão de gorduras.

O estudo de LOBO et al., (2011) mostrou associação negativa dos anticorpos anti-LDL(-) com citocinas inflamatórias e moléculas de adesão em pacientes submetidos a hemodiálise, além de menores concentrações desses anticorpos em comparação a indivíduos saudáveis. Anteriormente, BARROS et al., (2006) também documentaram menor concentração de anticorpos anti-LDL(-) em adultos com maior risco cardiovascular.

Outro aspecto importante monitorado no presente estudo se refere ao impacto da DC no estado nutricional. Nossos resultados demonstraram que não houve comprometimento significativo na estatura e no estado nutricional avaliado pelo Z E/I e Z IMC/I dos pacientes ao longo do tempo.

De modo contrário, LIU et al., 2003, mostraram que 14 crianças recebendo DC clássica e 11 recebendo dieta suplementada com TCM apresentaram ganho significativo no percentil de estatura para idade (pE/I) e redução em 10 percentis no percentil de peso para idade (pP/I) após 4 meses de DC. Já, VINING et al., em 2002 observaram redução do ZP/I após 3 meses de dieta e uma discreta redução no ZE/I após 6 meses de DC, especialmente para crianças de 7 a 10 anos.

Posteriormente, NEAL et al., (2008) monitorando 75 crianças submetida a DC (3 meses) mostraram redução no Z IMC/I, mas não identificaram alterações no ZE/I. Em ambos os estudos que compararam o estado nutricional de crianças recebendo DC clássica e DC suplementada com TCM não foi observado diferenças entre os grupos (LIU et al., 2003; NEAL et al., 2008).

A provável explicação para as discrepâncias encontradas entre os estudos que avaliam o crescimento de crianças e adolescentes submetidos a DC pode estar relacionada à condução de ajuste calórico da dieta, pois em nosso estudo apesar da coleta de dados ser realizada após 3 e 6 meses de DC o estado nutricional (Z IMC/I) foi monitorado mensalmente após o terceiro mês e o valor calórico da dieta ajustado ambulatoriamente de acordo com a necessidade do paciente.

Apesar deste rigoroso segmento nutricional e não termos encontrado mudança significativa para o Z IMC/I e ZE/I, devemos considerar que os pacientes apresentaram um declínio na velocidade de crescimento, já que esses escores apresentaram redução numérica ao longo do tempo (-47% e -152% no T1 e T2, e -35% e -58% no T1 e T2, respectivamente) o que provavelmente pode estar associado a quantidade de macronutrientes da DC, especialmente a oferta de proteínas e carboidratos que é inferior ao recomendado em uma dieta saudável.

Assim como o estado nutricional avaliado pelo Z IMC/I, a composição corporal avaliada por bioimpedância elétrica não apresentou mudanças nos percentuais de massa magra e massa gorda em nenhum dos períodos avaliados. Esse perfil foi reforçado pela avaliação da soma de dobras cutâneas que também não apresentou alterações.

Em 2012, TABLIABUE et al., não encontraram mudanças significativas no percentual de massa magra e massa gorda avaliado por DEXA em crianças e adolescentes submetidos a DC. Anteriormente LIU et al., em 2003, também não verificaram alterações na circunferência muscular do braço e na área muscular do braço após 4 meses de dieta.

De modo contrário, GROLEAU et al., (2014) verificaram aumento significativo no percentual de gordura e massa magra avaliado pela soma de dobras cutâneas após um período de 3 e 15 meses em crianças com epilepsia refratária tratadas com DC. Esses mesmos autores observaram declínio do crescimento linear dessas crianças.

A literatura é bastante escassa sobre informações de composição corporal de pacientes submetidos à DC e embora alguns estudos tenham sido encontrados na literatura, até a presente data nosso estudo parece ser o primeiro a avaliar a composição corporal por bioimpedância elétrica no contexto clínico da DC e da epilepsia refratária.

A partir desta avaliação também foi possível determinar o ângulo de fase nesses pacientes. Nossos resultados mostraram aumento no AF°, no percentual de AI e na reactância no T1 o que poderia ser considerado indicativo de melhora de prognóstico clínico (KYLE et al.,2004; BOSY-WESTPHAL et al., 2006). Entretanto no T2 observamos o efeito negativo da DC pela redução significativa da reactância em comparação ao T1, tendência de redução do ângulo de fase e aumento significativo da resistência.

Paralelo aos efeitos adversos observados nas crianças e adolescentes submetidos a DC no espectro do metabolismo lipídico e oxidativo, o impacto positivo desta intervenção no controle das crises é inquestionável, pois essa promoveu redução no número de crises, assim diminuição no número e dose das DAEs administradas.

O efeito positivo da DC na quantidade total de DAEs apresentou redução de aproximadamente 26%, sendo a vigabatrina e o nitrazepam, as principais drogas contribuintes desta redução após 6 meses de intervenção. Essas drogas atuam facilitando a ação ou inibindo o catabolismo do GABA (neurotransmissor inibitório) no sistema nervoso central. Assim uma possível explicação para a redução dessas drogas pode estar associada à eficácia da DC na modulação do GABA, conforme demonstrado em diversos estudos (CHENG et al., 2004; DAHLIN et al., 2005; MCNALLY et al., 2012).

Este estudo tem limitações. Em primeiro lugar, as diferentes etiologias da epilepsia encontradas nas crianças e adolescentes participantes reforçam a natureza heterogênea da epilepsia e o desconhecimento desta pela maioria dos participantes (34,6%), o que dificulta um melhor conhecimento dos mecanismos envolvidos. Apesar disso, estudos prévios e atuais referem a dificuldade da identificação etiológica da epilepsia especialmente quando relacionada a identificação genética (FISHER et al., 2005; GITAÍ et al., 2008; LOWENSTEIN e HELBIG, 2013).

Outra limitação poderia estar relacionada ao tamanho da amostra, pois o reduzido número de pacientes inclusos que poderia reduzir o poder estatístico de algumas analises. Entretanto, essa dificuldade também é observada nos estudos da literatura já que a prevalência da epilepsia é baixa (0,5 a 1 %) e a prevalência da epilepsia refratária ainda menor (20 a 30%). Apesar dessa possibilidade, os resultados encontrados têm grande relevância clínica, pois representaram o perfil lipídico e oxidativo de 100% das crianças atendidas no hospital de referência elegíveis para o estudo.

A terceira limitação pode ser atribuída a avaliação ao longo do tempo da dosagem e tipos de DAEs antes do período da intervenção. Crianças e adolescentes indicados para a DC tomam múltiplas drogas ao longo da vida e não podem passar por um período de “washout” antes da inclusão na pesquisa. Portanto, de forma a minimizar essa limitação todas as drogas administradas e respectivas posologias foram controladas durante a intervenção e consideradas como variáveis de controle nas análises estatísticas.

De acordo com os resultados encontrados, nossa recomendação é que estes seriam melhor compreendidos se o acompanhamento fosse por mais 1 período de monitoramento e, preferencialmente, após a descontinuidade da DC. Recomendamos também a ampliação das análises bioquímicas, pois a análise de antioxidantes no plasma, as outras vias de geração de LDL(-) e outros marcadores de oxidação poderão contribuir futuramente com o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos.

7. CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

A DC foi efetiva no tratamento da epilepsia refratária reduzindo o número de crises e o uso de drogas antiepiléticas. As mudanças promovidas no metabolismo lipídico, entretanto, apresentaram impacto negativo associadas ao aumento do risco cardiometabólico.

As principais alterações no metabolismo lipídico clássico e oxidativo associadas ao desenvolvimento da aterosclerose foram o aumento da concentração de TG, LDL e TBARS. As mudanças nas características físicas foram significativas não apenas na fase "inicial" e "final" da DC, mas progressiva ao longo do tratamento. A DC contribuiu para o aumento progressivo das partículas pequenas de LDL e um fenótipo mais aterogênico.

Em relação ao monitoramento do crescimento e desenvolvimento, a DC não interferiu significativamente no estado nutricional e na composição de massa gorda e massa magra dos pacientes, entretanto os resultados observados são sugestivos de desaceleração da velocidade do crescimento.

O efeito da DC nas outras variáveis avaliadas por bioimpedância necessitam de maior acompanhamento, visto que o aumento no ângulo de fase foi observado apenas no primeiro momento enquanto que posteriormente observamos aumento de resistência.

Concluímos que os resultados encontrados mostram impacto negativo da DC no metabolismo lipídico e oxidativo de crianças e adolescentes, e embora muitas dessas variáveis lipídicas não tenham demostrado aumento progressivo e necessitem de um maior período de acompanhamento, estratégias voltadas para melhora da qualidade da DC devem ser priorizadas e implantadas no tratamento destes pacientes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVES, M.I.B.; PLAZA, F.A.; MARTÍNEZ-TOMÁS R.; SÁNCHEZ-CAMPILLO M, LARQUÉ, E.; PÉREZ-LLAMAS, F.; MARTÍNEZ HERNÁNDEZ, P.; PARRA PALLARÉS, S. Oxidized LDL and its correlation with lipid profile and oxidative stress biomarkers in young healthy Spanish subjects. **J Physiol Biochem**, v.66, n.3, p.221-227, set. 2010.

2. AL-ZAID, N.S.; DASHTI, H.M.; MATHEW, T.C.; JASPIR, S.J. Low carbohydrate ketogenic diet enhances cardiac tolerance to global ischaemia. **Acta Cardiol**, v. 62, n.4, p.381-389, aug. 2007.

3. AMERICAN ACADEMY of PEDIATRICS. Expert panel on integrated guidelines for cardiovascular health and risk reduction in children and adolescents: summary report. **Pediatrics**, v.128, p.213-256, 2011, Supplement 5.

4. AOYAMA, T.; NOSAKA, N.; KASAI, M. Research on the nutritional characteristics of médium-chain fatty acids. **J Med Invest**, v.54, n.3-4, p. 385-388, aug. 2007.

5. APPLETON, R.E. Mortality in paediatric epilepsy. **Arch Dis Child**, v. 88, n. 12, p. 1091-4, dez. 2003.

6. ARISAKA, O.; FUJIWARA, S.; YABUTA, K.; MOKUNO, H.; MITUGI, Y.; MIYAKE, N. Characterization of low-density lipoprotein subclasses in children. **Metabolism**, v.46, n.2, p.146-148, fev. 1997.

7. AUSTIN, M.A.; KING, M.C.; VRANIZAN, K.M.; KRAUSS, R.M. Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. **Circulation**, v. 82, n. 2, p.495-506, aug. 1990.

8. AVOGARO, P.; BON, G.B..; CAZZOLATO, G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans. **Atherosclerosis**, v.8, n.1, p.79-87, jan./fev. 1988.

9. AVOGARO, P.; CAZZOLATO, G.; BITTOLO-BON, G. Some questions concerning a small, more electronegative LDL circulating in human plasma. **Atherosclerosis**, v. 91, n. 1-2, p.163-171, nov. 1991.

10. AZAMBUJA, M.I.R.; FOPPA, M.; MARANHÃO, M.F.C; ACHUTTI, A.C. Impacto econômico dos casos de doença cardiovascular grave no Brasil: uma estimativa baseada em dados secundários. **Arq Bras Cardiol**, v. 91, n. 3, p.163-171, set. 2008.

11. BACH, A.C.; BABYAN, V.K. Medium-chain triglycerides: an update. **Am J Clin Nutr**, v. 36, n.5, p. 950-962, 1982.

12. BACHORIK, O.S.; ROSS, J.W. National Cholesterol Education Program Recomendations for measurement of low-density lipoprotein cholesterol: executive summary. **Clin Chem**, v. 41, n.10, p.1414-1420, out. 1995.

13. BAILEY, D.P.; SAVORY, L.A.; DENTON, S.J. DAVIES, B.R. KERR, C.J. The triglyceride to high-density lipoprotein ratio identifies children who may be at risk of developing cardiometabolic disease. **Acta Paediatr**, v. 6, p.1-5, mai. 2014.

14. BARROS, M.R.; BERTOLAMI, M.C.; AGDALLA, D.S.; FERREIRA, W.P. Identification of mildly oxidized low-density lipoprotein (electronegative LDL) and its auto-antibodies IgG in children and adolescents hypercholesterolemic offsprings. **Atherosclerosis**, v. 184, n.1, p.103-107, jan. 2006.

15. BARTER, P.; KASTELEIN, J.; NUNN, A.; HOBBS, R. High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis; the unanswered questions. **Atherosclerosis**, v.168, n.2, p.195-211, jun. 2003.

16. BEERMANN, C.; JELINEK, J.; REINECKER, T.; HAUENSCHILD, A.; BOEHM, G.; KLÖR H.U. Short term effects of dietary medium-chain fatty acids and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids on the fat metabolism of healthy volunteers. **Lipids Health Dis**, v.2, p.1-10, nov. 2003.

17. BENÍTEZ, S.; SÁNCHEZ-QUESADA, J.L.; ORDÓÑEZ-LlANOS, J. LDL electronegativa: una LDL modificada presente en la circulación com características aterogênicas. **Clin Invest Arterioscl**, v.16, n.4, p.154-9, 2004.

18. BERENSON, G.S.; SRINIVASAN, S.R.; BAO, W.; NEWMAN, W.P.; TRACY, R.E.; WATTIGNEY, W.A. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study. **N Engl J Med**, v. 338, n.23, p.1650-1656, jun. 1998.

19. BERG, A.T.; BERKOVIC, S.F.; BRODIE, M.J.; BUCHHALTER, J.; CROSS, J.H.; BOAS, W.V.E.; ENGEL, J.; FRENCH, J.; GLAUSER, T.A.; MATHERN, G.W.; MOSHÉ, S.L.; NORDLI, D.; PLOUIN, P.; SCHEFFER, I.E. Revised terminology and concepts for organization of seizure sport and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. **Epilepsia**, v.51, n.4, p.676-685, fev. 2010.

20. BERNEIS, K.K.; KRAUSS, R.M. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. **J Lipid Res**, v.43, n.9, p.1363-1379, set. 2002.

21. BÍGLIA SAGRADA. **São Mateus: o menino epiléptico**. Tradução de Frei João José Pedreira de Castro. São Paulo, Editora Ave Maria, p.1304-1305, 1979.

22. BOSY-WESTPHAL, A.; DANIELZIK, S.; DORHOFER, R.P.; LATER, W.; WIESE, S.; MULLER, M.J. Phase angle from bioelectrical impedance analysis: population reference values by age, sex, and body mass index. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v.30, n.4, p.309-316, jul./aug. 2006.

23. BOUGH, K.J.; WETHERINGTON, J.; HASSEL, B.; PARE, J.F.; GAWRYLUK, J.W. GREENE, J.G.; SHAW, R.; SMITH, Y.; GEIGER, JD.; DINGLEDINE, R.J.

Mitochondrial biogenesis in the anticonvulsant mechanism of the ketogenic diet. **Annals of Neurology**, v.60, n.2, p.223-235, aug. 2006.

24. BRASIL. **Resolução n. 196, de 10 de outubro de 1996**. Dispõe sobre as normas nacionais de ética em pesquisa com humanos. Brasília: Conselho Nacional de Saúde. Brasil, 1996.

25. BURNS, S.F.; ARSLANIAN, S.A. Waist circumference, atherogenic lipoproteins, and vascular smooth muscle biomarkers in children. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 94, n.12, p. 4914-4922, dez. 2009.

26. CALLENBACH, P.M.; WESTENDORP, R.G.; GEERTS, A.T.; ARTS, W.F.; PEETERS, E.A; VAN DONSELAAR, C.A.; PETERS, A.C.; STROINK, H.; BROUWER, O.F. Mortality risk in children with epilepsy: the Dutch study of epilepsy in childhoood. **Pediatrics**, v.107, n.6, p.1259-1263, Jun. 2001.

27. CAMONT, L.; CHAPMAN, M.J.; KONTUSH, A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. **Trends Mol Med**, v. 17, n.10, p. 594-603, out. 2011.

28. CAREY, M.C.; SMALL, D.M.; BLISS, C.M. Lipid digestion and absorption. **Ann Rev Physiol**, v.45, p. 651-77, 1983.

29. CAZZOLATO, G.; AVOGARO, P.; BITTOLO-BOM, G. Characterization of a more electronegatively charged LDL subfraction by íon exchange HPLC. **Free Rad Biol Med**, v.11, n.3, p.247-53, 1991.

30. CHENG, C.M.; HICKS, K.; WANG, J.; EAGLES, D.A.; BONDY, C.A. Caloric restriction augments brain glutamic acid decarboxylase-65 and -67 expression. **J Neurosci Res**, v.77, n.2, p.270-276, jul. 2004.

31. CHESNEY, D.; BROUHARD, B.H.; WHILE, E.; POWASKI, K. Biochemical abnormalities of the ketogenic diet in children. **Clin Pediatr**, v.38, n.2, p.107-109, fev. 1999.

32. CHUANG, Y.C.; CHUANG, H.Y.; LIN, T.K.; CHANG, C.C.; LU, C.H.; CHANG, W.N.; CHEN, S.D.; TAN, T.Y.; HUANG, C.R.; CHAN, S.H. Effects of long-term antiepileptic drug monotherapy on vascular risk factors and atherosclerosis. **Epilepsia**, v.53, n.1, p.120-128, jan. 2012.

33. CHUKWU, J.; DELANTY, N.; WEBB, D.; CAVALLERI, G.L. Weight change, genetics and antiepileptic drugs. **Expert Rev Clin Pharmacol**, v.7, n.1, p.43-51, jan. 2014.

34. CHUMLEA, W.C; GUO, S.S.; STEINBAUGH, M.L. Prediction of stature knee height for black and white adults and children with application to mobility-impaired or handicapped persons. **J Am Diet Assoc**, v. 94, n.12, p.1385-1391, dez. 1994.

35. CONCEIÇÃO-MACHADO, M.E.P.; SILVA, L.R.; SANTANA, M.L.P.; PINTO, E.J.; SILVA, R.C.R.; MORAES, L.T.L.P.; COUTO, R.D.; ASSIS, A.M. Hypertriglyceridemic waist phenotype: association with metabolic abnormalities in adolescents. **J Pediatr**, v.89, n.1, p.56-63, jan./fev. 2013.

36. CROMWELL, W.C.; OTVOS, J.D. Low-density lipoprotein particle number and risk for cardiovascular disease. **Curr Ahteroscler Rep**, v.6, n.5, p.381-387, set. 2004.

37. D´ADAMO, E.; NORTHRUP, V.; WEISS, R.; SANTORO, N.; PIERPONT, B.; SAVOYE, M.; O´MALLEY, G.; CAPRIO, S. Ethnic diferences in lipoprotein subclasses in obese adolescents: importance of liver and intra-abdominal fat accretion. **Am J Clin Nutr**, v.92, n.3, p.500-508, set. 2010.

38. DAHLIN, M.; ELFVING, A.; UNGERSTEDT, U.; AMARK, P. The ketogenic diet influences the levels of excitatory and inhibitory amino acids in the CSF in children with refractory epilepsy. **Epilepsy Res**, v.64, n.3, p. 115-125, mai. 2005.

39. DAHLIN, M.; MÅNSSON, J-E.; ÅMARK, P. CSF levels of dopamine and serotonin, but not norepinephrine, metabolites are influenced by the ketogenic diet in children with epilepsy. **Epilepsy Research**, v. 99, n.1-2, p.132-138, mar. 2012.

40. DAMASCENO, N.R.; SEVANIAN, A.; APOLINÁRIO, E.; OLIVEIRA, J.M.; FERNANDES, I.; ABDALLA, D.S. Detection of electronegative low density lipoprotein (LDL-) in plasma and atherosclerotic lesions by monoclonal antibody-based immunoassays. **Clin Biochem**, v.39, n.1, p.28-38, jan. 2006.

41. DE ONIS, M.; ONYANGO, A.W.; BORGHI, E.; SIYAM, A.; NISHIDA, C.; SIEKMANN, J. Bull Word Health Organ, v.85, n.9, p.660-667, 2007.

42. DEJAGER, S.; BRUCKERT, E.; CHAPMAN, M.J. Dense low density lipoprotein subspecies with diminished oxidative resistance predominance in combined hyperlipidemia. **J Lipid Res**, v.34, n.2, p.295-308, fev. 1993.

43. DIFFENDERFER, M.R.; SCHAEFER, E.J. The composition and metabolism of large and small LDL. **Curr Opin Lipidol**, v.25, n.3, p.221-226, jun. 2014.

44. EpiData Software, version 3.1. Odense: The EpiData Association, 2008. Disponível em: <www.epidata.dk>. Acesso em: 02 mar. 2012.

45. ERCEG, D.N.; DIELI-CONWRIGHT, C.M.; ROSSUELLO, A.E.; JENSKY, N.E.; SUN, S.; SCHROEDER, E.T. The Stayhealthy bioelectrical impedance analyzer predicts body fat in children and adults. **Nutr Res**, v.30, n.5, p.297-304, mai, 2010.

46. ERECIŃSKA, M.; NELSON, D.; DAIKHIN, Y.; YUDKOFF, M. Regulation of GABA level in rat brain synaptosomes: fluxes through enzymes of the GABA shunt and effects of glutamate, calcium, and ketone bodies. **J Neurochem**, v.67, n. 6, p. 2325-2334, dez. 1996.

47. FAULIN, T.E.; DE SENA-EVANGELISTA K.C.; PACHECO, D.B.; AUGUSTO, E.M.; ABDALLA D.S. Development of immunoassays for anti-electronegative LDL autoantibodies and imune complexes. **Clin Chim Acta**, v.413, n.1-2, p.291-297, jan. 2012.

48. FEDELE, D.E.; GOUDER, N.; GÜTTINGER, M.; GABERNET, L.; SCHEURER, L.; RÜLICKE, T.; CRESTANI, F.; BOISON, D. Astrogliosis in epilepsy leads to overexpression of adenosine kinase, resulting in seizure aggravation. **Brain**, v. 128, pt. 10, p.2383-2395, out. 2005.

49. FERREIRA, I.L.M.; SILVA, T.P.T. Mortalidade por epilepsia no Brasil,1980-2003. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 14, n.1, p. 89-94, jan./fev. 2009.

50. FISHER, R.S.; ACEVEDO, C.; ARZIMANOGLOU, A.; BOGACZ, A.; CROSS, J.H.; ELGER, C.E.; ENGEL J. Jr.; FORSGREN, L.; FRENCH, J.A.; GLYNN, M.; HESDORFFER, D.C.; LEE, B.I.; MATHERN, G.W.; MOSHÉ, S.L.; PERUCCA, E.; SCHEFFER, I.E.; TOMSON, T.; WATANABE, M.; WIEBE, S. ILAE oficial report: a practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, v.55, n.4, p.475-472, abr. 2014.

51. FISHER, R.S.; VAN EMDE BOAS, W.; BLUME, W.; ELGER, C.; GENTON, P.; LEE, P.; ENGEL, J. Jr. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy. **Epilepsia**, v. 46, n.4, p. 470-472, abr. 2005.

52. FREEDMAN, D.S.; BOWMAN, B.A.; SRINIVASAN, S.R.; BERENSON, G.S.; OTVOS, J.D. Distribution and correlates of high-density lipoprotein subclasses among children and adolescents. **Metabolism**, v.50, n.3, p.370-376, mar. 2001.

53. FREEMAN, J.M.; KELLY, M.T.; FREEMAN, J.B. **The epilepsy diet treatment**. New York: Demos, 1994.

54. FREEMAN, J.M.; KOSSOFFF, E.H.; HARTMAN, A.L. The Ketogenic Diet: one decade later. **Pediatrics**, v.119, n. 3, p. 535-544, mar. 2007.

55. FREITAS, A.; PAZ, J.A.; CASELLA, E.B.; MARQUES-DIAS, M.J. Ketogenic diet for the treatment of refractory epilepsy: a 10 year experience in children. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 65, n. 2-B, p. 381-384, 2007.

56. FRIEDEWALD, W.T.; LEVY, R.I; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem**, v. 18, n.6, p. 499-502, jun. 1972.

57. FRISANCHO, A.R. **Anthropometric standards for the assessments of growth and nutritional status**. University of Michigan, 1990.

58. GIDDING, S.; DENNISON, B.A.; BIRCH, L.L.; DANIELS, S.R.; GILLMAN, M.W.; LICHTENSTEIN, A.H.; RATTAY, K.T.; STEINBERGER, J.; STETTLER, N.; VAN HORN, L.; AMERICAN HEART ASSOCIATION; AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Dietary recommendations for children and adolescents: a guide for practitioners: consensus statement from the American Heart Association. **Circulation**, v.112, n.13, p.2061-2075, set. 2005.

59. GITAI, D.L.G.; ROMCY-PEREIRA, R.N.; GITAÍ, L.V.; LEITE, J.P.; GARCIA-CAIRASCO, N.; PAÇÓ-LARSON, M.L. Genes e Epilepsia I: Epilepsia e alterações genéticas. **Rev Assoc Med Bras**, v. 54, n. 3, p. 272-278, set./out. 2008.

60. GRADY, D.; CUMMINGS, S.R.; HULLEY, S.B. Delineando um experimento: ensaios clínicos II. In: HULLEY, S.B.; CUMMINGS, S.R. **Delineando a pesquisa clínica**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2003, p. 181-201.

61. GROLEAU, V.; SCHALL, J.; STALLINGS, V.A.; BERGQVIST, C.A. Long-term impact of the ketogenic diet on growth and resting energy expenditure in children with intractable epilepsy. **Dev Med Child Neurol**, abr. 2014.

62. GRUZDEVA, O.; UCHASOVA, E.; DYLEVA, Y.; BELIK, E.; KASHTALAP, V.; BARBARASH, O. Relationship between free fatty acids, insulin resistance markers, and oxidized lipoproteins in myocardial infarction and acute left ventricular failure. **Diabetes Metab Syndr Obes**, v. 6, p. 103-111, fev. 2013.

63. HAGIHARA, M.; NISHAGAKI, I.; MASEKI, M.; YAGI, K. Age-dependent changes in lipid peroxide levels in the lipoprotein fractions of human sérum. **J Gerontol**, v.39, n. 3, p.269-272, mai. 1984.

64. HAUSER, W.A.; HESDORFFER, D.C. **Epidemiology of intractable epilepsy**. In: Epilepsy surgery, 2º ed Lippincott Willians & Wilkins, 2001.

65. HIRAYAMA, S.; MIIDA, T. Small dense LDL: An emerging risk factor for cardiovascular disease. **Clin Chim Acta**, v.34, n.414, p.215-224, dez. 2012.

66. HODIS, H.N.; KRAMSCH, D.M.; AVOGARO, P.; BITTOLO-BOM, G.; CAZZOLATO, G.; HWANG, J.; PETERSON, H.; SEVANIAN, A. Biochemical and citotoxic characteristic of an in vivo circulating oxidized low density lipoprotein(LDL-). **J Lipid Res**, v. 35, n.4, p.669-77, abr. 1994.

67. HULTHE, J.; FAGERBERG, B. Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflamatory cytokines (AIR Study). **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.22, n.7, p.1162-1167, jul. 2002.

68. IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo demográfico 2010: Características da população e dos domicílios**. Ministério do planejamento, orçamento e gestão, 2011.

69. IBM SPSS Statistics. Version 20. Armonk (NY): IBM Corporation, 2011. Programa de Computador. 1 CD-ROM.

70. INUZUKA-NAKAHARADA, L.M. Dieta cetogênica e dieta de Atkins modificada no tratamento da epilepsia refratária em crianças e adultos. **J Epilepsy Clin Neurophysiol**, v. 14, n. 2, p.65-69, Jun. 2008.

71. JUGE, N.; GRAY, J.A.; OMOTE, H.; MIYAJI, T.; INOUE, T.; HARA, C.; UNEYAMA, H.; EDWARDS, R.H.; NICOLL, R.A.; MORIYAMA, Y. Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. **Neuron**, v.68, n.1, p. 99-112, out. 2010.

72. KANG, H.C.; CHUNG, D.E.; KIM, D.W.; KIM, H.D. Early- and late-onset complications of the ketogenic diet for intractable epilepsy. **Epilepsia**, v. 45, n. 9, p. 1116-1123, set. 2004.

73. KELISHADI, R.; HASHEMI, M.; MOHAMMADIFARD, N.; ASGARY, S.; KHAVARIAN, N. Association of changes in oxidative and proinflamatory states with changes in vascular function after a lifestyle modification trial among obese children. **Clin Chem**, v.54, n.1, p.147-153, jan. 2008.

74. KELLY, A.S.; JACOBS, D.R.; SINAIKO, A.R.; MORAN, A.; STEFFEN, L.M.; STEINBERGER, J. Relation of circulating oxidized LDL to obesity and insulin resistance in children. **Pediatr Diabetes**, v.11, n.8, p.552-5, dez. 2010.

75. KETELHUTH, D.F.; HANSSON, G.K. Cellular immunity, low-density lipoprotein and atherosclerosis: break of tolerance in the artery wall. **Thromb Haemost**, v.106, n.5, p.779-86, nov. 2011.

76. KIM, D.W.; KANG, H.C.; PARK, J.C.; KIM, H.D. Benefits of the nonfasting ketogenic diet compared with the initial fasting ketogenic diet. **Pediatrics**, v. 114, n. 6, p.1627-1630, dez. 2004.

77. KIM, D.W.; LEE, S.Y.; SHON, Y.M.; KIM, J.H. Effects of new antiepileptic drugs on circulatory markers for vascular risk in patients with newly diagnosed epilepsy. **Epilepsia**, v.54, n.10, p.146-149, out. 2013.

78. KINDEREN, R.J.A.; LAMBRECHTS, D.A.J.E.; POSTULART, D.; KESSELS, A.G.H.; HENDRIKSEN, J.G.M.; ALDENKAMP, A.P.; EVERS, S.M.A.A.; MAJOIE, M.H.J.M. Research into the (Cost-) effectiveness of the ketogenic diet among children and adolescents with intractable epilepsy: design of a randomized controlled Trial. **BMC Neurology**, v. 25, n.11, p. 1-10, jan. 2011.

79. KONTUSH, A.; CHAPMAN, M.J. Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: focus on antioxidative activies. **Curr Opin Lipidol**, v.21, n.4, p.312-318, aug. 2010.

80. KOSSOFF, E.H.; ZUPEC-KANIA, B.A.; AMARK, P.E.; BALLABAN-GIL, K.R.; BERGQVIST, A.G.C.; BLACKFORD, R.; BUCHHALTER, J.R.; CARABALLO, R.H.; CROSS, J.H.; DAHLIN, M.G.; DONNER, E.J.; KLEPPER, J.; JEHLE, R.S.; KIM, D.H.; LIU, Y.M.C.; NATION, J.; NORDLI, D.R.J.; PFEIFER, H.H.; RHO, J.M.; STAFSTROM, C.E.; THIELE, E.A.; TURNER, Z.; WIRREL, E.C.; WHELESS, J.W.; VEGGIOTTI, P.; VINING, E.P.G.; CHARLIE FOUNDATION; PRACTICE COMMITTEE OF THE CHILD NEUROLOGY SOCIETY; INTERNATIONAL KETOGENIC DIET STUDY GROUP. Optimal clinical management of children receiving the ketogenic: recommendations of the International of the International Ketogenic Diet Study Group. **Epilepsia**, v. 50, n. 2, p.304-317, Set. 2009.

81. KWITEROVICH, P.O.Jr.; VINING, E.P.G.; PYZIK, P.; SKOLASKY, R.; FREEMAN, J.M. Effect of a high-fat ketogenic diet of plasma levels of lipids, lipoproteins, and apolipoproteins in children. **JAMA**, v.290, n. 7, p.912-920, aug. 2003.

82. KYLE, U.G.; BOSAEUS, I.; LORENZO, A.D.D.; DEURENBERG, P.; ELIA, M.; GOMEZ, J.M.; HEITMANN, B.L.; KENT-SMITH, L.; MELCHIOR, J.C.; PIRLICH, M.; SCHARFETTER, H.; SCHOLS, A.M.W.; PICHARD, C. Bioelectrical impedance analysis – part II: utilization in clinical practice. **Clinical Nutrition**, v.23, n. 6, p.1430-53, dez. 2004.

83. LEE, P.; KOSSOFF, E.H. Dietary treatments for epilepsy: management guidelines for the general practitioner. **Epilepsy Beh**, v. 21, n.2, p.115-21, abr. 2011.

84. LEONARDI, M.; USTUN, T.B. The global burden of epilepsy. **Epilepsia**, v. 43, p.21-25, 2002, Supplement 6.

85. LIU, Y.C.; WILLIAMS, S.; BASUALDO-HAMMOND, C.; STEPHENS, D.; CURTIS, R. A prospective study: growth and nutritional status of children treated with the ketogenic diet. **J Am Diet Assoc**, v.103, n.6, p.707-712, jun. 2003.

86. LIU, Y.M.; LOWE, H.; ZAK, M.M.; KOBAYASHI, J.; CHAN, V.W.; DONNER, E.J. Can children with hyperlipidemia receive ketogenic diet for medication-resistant epilepsy? **J Child Neurol**, v. 28, n. 4, p.479-483, 2013.

87. LOBO, J.C.; MAFRA, D.; FARAGE, N.E.; FAULIN, T.E.S.; ABDALLA, D.S.P.; NÓBREGA, A.C.L.; TORRES, J.P.M. Increased electronegative LDL and decreased antibodies against electronegative LDL levels correlate with inflammatory markers and adhesion molecules in hemodialysed patients. **Clin Chim Acta**, v.412, n.19-20, p.1788-92, set. 2011.

88. LOWENSTEIN, D.H.; HELBIG, I. Genetics of the epilepsies: where are we and where are we going? **Curr Opin Neurol**, v.26, n.2, p.179-185, abr. 2013.

89. MAALOUF, M.; RHO, J.M.; MATTSON, M.P. The neuroprotective properties of calorie restriction, the ketogenic diet, and ketone bodies. **Brain Res Rev**, v. 59, n.2, p.293-315, mar, 2009.

90. MAALOUF, M.; SULLIVAN, P.G.; DAVIS, L.; KIM, D.Y.; RHO, J.M. Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation. **Neuroscience**, v. 145, n. 1, p.256-264, mar. 2007.

91. MAFRA, D.; SANTOS, F.R.; LOBO, J.C.; DE MATTOS GROSSO, D.; BARREIRA, A.L.; VELARDE, L.G.; ABDALLA, D.S.; LEITE, M.Jr. Alpha-tocopherol supplementation decreases electronegative low-density lipoprotein concentration [LDL(-)]in haemodialysis patients. **Nephrol Dial Transpl**, v.24, n.5, p.1587-1592, mai. 2009.

92. MARTILLOTTI, J.; WEINSHENKER, D.; LILES, L.C.; EAGLES, D.A. A ketogenic diet and knockout of the norepinephrine transporter both reduce seizure severity in mice. **Epilepsy Res**, v.68, n.3, p. 207-211, mar. 2006.

93. MASEKI, M.; NISHIGAKI, I.; HAGIHARA, M.; TOMODA, Y.; YAGI, K. Lipid peroxide levels and lipid content of sérum lipoproteins fractions of pregnant subjects with or without pre-eclampsia. **Clin Chim Acta**, v. 115, n. 2, p.155-161, set. 1981.

94. MASINO, S.A.; KAWAMURA, M.; WASSER, C.D.; POMEROY, L.T.; RUSKIN, DN. Adenosine, ketogenic diet and epilepsy: the emerging therapeutic relationship between metabolism and brain activity. **Curr Neuropharmacol**, v.7, n.3, p.257-68, set. 2009.

95. MASINO, S.A.; RHO, J.M. Mechanisms of ketogenic diet action. In: NOEBLS, J.L.; AVOLI, M.; ROGAWSKI, M.A.; OLSEN, R.W.; DELGADO-ESCUETA, A.V. **Jasper´s Basic Mechanisms of the Epilepsies**. 4 ed. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), 2012.

96. MCNALLY, M.A.; HARTMAN, A.L. Ketone bodies in epilepsy. **Journal of Neurochemistry**, v.121, n.1, p.28-35, fev. 2012.

97. MELLO, A.P.Q.; SILVA, I.T.; ABDALLA, D.S.P.; DAMASCENO, N.R. Electronegative low-density lipoprotein: origin and impact on health and disease. **Atherosclerosis**, v. 215, n.2, p. 257-65, abr. 2011.

98. MELLO, A.P.Q.; SILVA, I.T.; OLIVEIRA, A.S.; NUNES, V.S.; ABDALLA, D.S.; GIDLUND, M.; DAMASCENO, N.R. Electronegative low-density lipoprotein is associated with dense low-density lipoprotein in subjects with different levels of cardiovascular risk. **Lipids**, v. 45, n.7, p.619-625, jul. 2010.

99. MELLO, E.D. O que significa a avaliação do estado nutricional. **Jornal de Pediatria**, v.78, n.5, p.357-358, set./out. 2002.

100. MENSINK, R.P.; ZOCK, P.L.; KESTER, A.D.; KATAN, M.B. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. **Am J Clin Nutr**, v.77, n.5, p.1146-1155, mai. 2003.

101. MILDER, J.; PATEL, M. Modulation of oxidative stress and mitochondrial function by the ketogenic diet. **Epilepsy Research**, v.100, n.3, p.295-303, jul. 2012.

102. MIYASHITA, M.; OKADA, T.; KUROMORI, Y.; HARADA, K. LDL particle size, fat distribuition and insulin resistance in obese children. **Eur J Clin Nutr**, v. 60, n.3, p.416-420, mar. 2006.

103. NEAL, E.G.; CHAFFE, H.M.; EDWARDS, N.; LAWSON, M.S.; SCHWARTZ, R.H.; CROSS, J.H. Growth of children on classical and medium-chain triglyceride ketogenic diets. **Pediatrics**, v.122, n.2, p.333-340, aug. 2008.

104. NEAL, E.G.; CROSS, J.H. Efficacy of dietary treatments for epilepsy. **J Human Nutr Diet**, v.23, n.2, p.113-119, abr. 2010.

105. NEPA/UNICAMP. **Tabela brasileira de composição de alimentos - TACO**. 4º ed. Campinas, SP, 2011.

106. NETO, J.G.; MARCHETTI, R.L. Aspectos epidemiológicos e relevância dos transtornos mentais associados à epilepsia. **Rev Bras Psiquiatr**, v.27, n.4, p.323-328, dez. 2005.

107. NGUYEN, D.; NICKEL, M.; MIZUGUCHI, C.; SAITO, H.; LUND-KATZ, S.; PHILLIPS, M.C. Interactions of apolipoprotein A-I with high-density lipoprotein particles. **Biochemistry**, v.52, n.11, p.1963-1972, mar. 2013.

108. NGUYEN, Q.D.; FUSH, G.; ARMBRUST, S.; JOCHUM, F.; FUSH, C. Impedance index or standard anthropometric measurements, which is the better variable for predicting fat-free mass in sick children? **Acta Paediatr**, v. 96, n. 6, p. 869-873, jun. 2007.

109. NISHIGAKI, I.; HAGIHARA, M.; TSUNEKAWA, H.; MASEKI, M.; YAGI K. Lipid peroxide levels of serum lipoprotein fractions of diabetic patients. **Biochem Med**, v.25, n.3, p.373-378, jun. 1981.

110. NIZAMUDDIN, J.; TURNER, Z.; RUBENSTEIN, J.E.; PYZIK, P.L.; KOSSOFFF, E.H. Management and risk factors for dyslipidemia with the ketogenic diet. **J Child Neurol**, v. 23, n.7, p.758-761, jul. 2008.

111. NUNES, M.L.; GEIB, L.T.C.; APEGO, G. Incidência de epilepsia e distúrbios convulsivos na infância e sua associação com determinantes sociais: um estudo de coorte de nascimento. **Jornal de Pediatria**, v.87, n.1, p.50-56, jan./fev. 2011.

112. OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**, v.95, n.2, p.351-358, jun. 1979.

113. OKASORA, K.; TAKAYA, R.; TOKUDA, M.; FUKUNAGA, Y.; OGUNI, T.; TANAKA, H.; Comparison of bioelectrical impedance analysis and dual energy X-ray absorptiometry for assessment of body composition in children. **Pediatr Int**, v.41, n.2, p.121-5, abr. 1999.

114. OLIVEIRA, J.A.; SEVANIAN, A.; RODRIGUES, R.J.; APOLINÁRIO, E.; ABDALLA, D.S. Minimally modified electronegative LDL and its autoantibodies in acute and chronic coronary syndromes. **Clin Biochem**, v.39, n.7, p.708-14, jul. 2006.

115. OTOKOZAWA, S.; AI, M.; DIFFENDERFER, M.R.; ASZTALOS, B.F.; TANAKA, A.; LAMON-FAVA, S.; SCHAEFER, E.J. Fasting and postprandial apolipoprotein B-48 levels in healthy, obese, and hyperlipidemic subjects. **Metabolism**, v.58, n.11, p.1536-42, nov. 2009.

116. OTVOS, J.; MORA.; SHALAUROVA, I.; GREENLAND, P.; MACKEY, R.H; GOFF, DC Jr. Clinical implications of discordance between low-density lipoprotein cholesterol and particle number. **J Clin Lipidol**, v. 52, n.2, p.105-113, mar./abr. 2011.

117. PACKARD, C.; CASLAKE, M.; SHEPHERD, J. The role of small, dense low-density lipoprotein (LDL): a new look. **Int J Cardiol**, v.74, p.17-22, 2000, Supplement 1.

118. PEREIRA, E.C.; BERTOLAMI, M.C.; FALUDI, A.A.; SEVANIAN, A.; ABDALLA, D.S. Antioxidant effect of simvastatin is not enhanced by its association with alpha-tocopherol in hypercholesterolemic patients. **Free Radic Biol Med**, v. 37, n.9, p.1440-1448, 2004.

119. PHILLIPI, S.T. **Tabela de composição de alimentos: suporte para decisão nutricional**. 2º ed. São Paulo: Coronário, 2002.

120. PICKRELL, W.O.; LACEY, A.S.; THOMAS, R.H.; SMITH, P.E.; REES, M.I. Weight change associated with antiepileptic drugs. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v.84, n.7, p.796-799, jul. 2014.

121. PINHEIRO, A.B.V.; LACERDA, E.M.A.; BENZECRY, E.H. **Tabela para avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras**. 4º ed. Rio de Janeiro, São Paulo, Belo Horizonte: Atheneu, 2001.

122. PIRILLO, A.; NORATA, G.D.; CATAPANO, A.L. High-density lipoprotein subfractions – what the clinicians need to know. **Cardiology**, v.124, n.2, p.116-125, mar. 2013.

123. PORTA, N.; VALLÉE, L.; BOUTRY, E.; FONTAINE, M.; DESSEIN, A.; JORIOT, S.; CUISSET, J.; CUVELLIER, J.; AUVIN, S. Comparison of seizure reduction and serum fatty acid levels after receiving the ketogenic and modified Atkins diet. **Seizure,** v.18, n.5, p.359-364, fev. 2009.

124. QUIJADA, Z.; PAOLI, M.; ZERPA, Y.; CAMACHO, N.; CICHETTI, R.; VILLARROEL, V.; ARATA-BELLABARBA, G.; LANES, R. The triglyceride/HDL-cholesterol ratio as a marker of cardiovascular risk in obese children; association with traditional and emergent risk factors. **Pediatr Diabetes**, v.9, n.5, p.464-471, out. 2008.

125. RODRIGUES, A.N.; PEREZ, A.J.; PIRES, J.G.P.; CARLETTI, L.; ARAÚJO, M.T.M.; MOYSES, M.R.; BISSOLI, N.S.; ABREU, G.R. Cardiovascular risk factors, their associations and presence of metabolic syndrome in adolescents. **J Pediatr**, v.85, n.1, p.55-60, jan./fev. 2009.

126. ROHRER, L.; HERSBERGER, M.; VON ECKARDSTEIN, A. High density lipoproteins in the intersection of diabetes mellitus, inflammation and cardiovascular disease. **Curr Opin Lipidol**, v.15, n.3, p.269-278, jun. 2004.

127. RUSKIN, D.N.; MASINO, S.A. The nervous system and metabolic dysregulation: emerging evidence converges on ketogenic diet therapy. **Front Neurosci**, v. 6, n.33, p.1-12, mar. 2012.

128. SAMPAIO, L.P.B. **Estudo da prevalência de epilepsia em crianças e adolescentes da comunidade de Paraisópolis**. 2009. 144p. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.

129. SÁNCHEZ-QUESADA, J.L.; BENÍTEZ, S.; ORDÓÑEZ-LLANOS, J. Eletronegative low-density lipoprotein. **Curr Opin Lipidol**, v.15, n. 3, p.329-35, jun. 2004.

130. SANTOS, R.D.; GAGLIARDI, A.C.M.; XAVIER, H.T.; MAGNONI, C.D.; CASSANI, R.; LOTTENBERG, A.M.P. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. **Arq Bras Cardiol**, v.100, p.1-40, 2013, Supplement 3.

131. SCHUH, J.; FAIRCLOUGH, G.F.; HASHEMEYER, R.H. Oxygen-mediated heterogenicity of apo-low-density lipoprotein. **Proc Nat Acad Sci USA**, v.75, n.7, p.3173-3177, jul. 1978.

132. SEVANIAN, A.; ASATRYAN, L.; ZIOUZENKOVA, O. Low density lipoprotein (LDL) modification: basic concepts and relationship to atherosclerosis. **Blood Purif**, v.17, n.2-3, p.66-78, 1999.

133. SEVANIAN, A.; BITTOLO-BON, G.; CAZZOLATO, G.; HODIS, H.; HWANG, J.; ZAMBURLINI, A.; MAIORINO, M.; URSINI, F. LDL- is a lipid hydroperoxide-enriched circulating lipoprotein. **J Lipid Res**, v.38, n.3, p.419-428, mar. 1997.

134. SHARMAN, M.J.; KRAEMER, W.J.; LOVE, D.M.; AVERY, N.G.; GÓMEZ, A.L.; SCHEETT, T.P.; VOLEK, J.S. A ketogenic diet favorably affects serum biomarkers for cardiovascular disease in normal-weight men. **J Nutr**, v.132, n.7, p.1879-1885, jul. 2002.

135. SHINOHARA, H.; OGAWA, A.; KASAI, M.; AYOAMA, T. Effect of randomly interesterified triacylglycerols containing medium- and long-chain fatty acids on energy expenditure and hepatic fatty acid metabolism in rats. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 69, n. 10, p.1811-1808, out. 2005.

136. SHORVON, S.D. The etiologic classification of epilepsy. **Epilepsia**, v.52, n.6, p.1052-1057, jun. 2011.

137. SIGULEM, D.M.; DEVINCENZI, M.U.; LESSA, A.C. Diagnóstico do estado nutricional da criança e do adolescente. **Jornal de pediatria**, v.76, p. 275-84, 2000, Suplemento 3.

138. SNISKY, J.J.; ROWLAND, C.M.; BACA, A.M. CAULFIELD, M.P.; SUPERKO, H.R. Classification of LDL phenotypes by 4 methods of determining lipoprotein particle size. **J Invest Med**, v. 61, n. 6, p.942-949, aug. 2013.

139. SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA. **Tratado de Pediatria**. Barueri, SP, 2007.

140. STEINBERG, D. The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update**. J Lipid Res**, v.50, 376-381, 2009. Supplement.

141. SULLIVAN PG, RIPPY NA, DORENBOS K, CONCEPCION RC, AGARWAL AK, RHO JM. The ketogenic diet increases mitochondrial uncoupling protein levels and activity. **Ann Neurol**, v.55, n.4, p.576-80, abr. 2004.

142. SZCZEKLIK, A.; GRYGLEWSKI, R.J. Low-density lipoproteins (LDL) are carriers for lipid peroxides and inhibit prostacyclin (PGI2) biosynthesis in arteries. **Artery**, v.7, n.6, p.488-495, 1980.

143. TABLIABUE, A.; BERTOLI, S.; TRENTANI, C.; BORRELLI, P.; VEGGIOTTI, P. Effects of the ketogenic diet on nutritional status, resting energy expenditure, and substrate oxidation in patients with medically refractory epilepsy: A 6-month prospective observational study. **Clinical Nutrition**, v.31, n.2, p.246-249, abr. 2012.

144. TANNER, G.R.; LUTAS, A.; MARTÍNEZ-FRANÇOIS, J.R.; YELLEN, G. Single KATP channel opening in response to action potential firing in mouse dentate granule neurons. **J Neurosci**, v.31, n.23, p.8689-8696, jun. 2011.

145. THE FOOD PROCESSOR SOFTWARE. Version 10.11.0. Salem (OR): ESHA Research, 2012. Programa de computador. 1 CD-ROM.

146. The Multiple Source Method (MSM). Version 1.0.1. Potsdam: Department of Epidemiology of the German Institute of Human Nutrition, 2008-2011. Disponível em <https://msm.dife.de/>. Acesso em: 07 abr. 2013.

147. TOSHIMA, S.; HASEGAWA, A.; KURABAYASHI, M.; ITABE, H.; TAKANO, T.; SUGANO, J, SHIMAMURA, K.; KIMURA, J.; MICHISHITA, I.; SUZUKI, T.; NAGAI, R. Circulation oxidized low density lipoprotein levels. A biochemical risk marker for coronary heart disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.20, n.10, p.2243-2247, out. 2000.

148. TUCKER, J.M.; TOWNSEND, D.M. Alpha-tocopherol: roles in prevention and therapy of human disease. **Biomed Pharmacother**, v.59, n.7, p.380-387, aug. 2005.

149. TUMAS, R. **Avaliação clínica e laboratorial de pacientes submetidos à dieta cetogênica**. 2002. 68p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.

150. TUMAS, R.; CARDOSO, L.A.; MARQUES-DIAS, M.J.; VIEIRA, M.A. Ketogenic diet in epileptic children: clinical and laboratory assessment. **Nutr Hosp**, v.25, n.2, p.317-318, mar./abr. 2010.

151. VAN HORN, L.; MCCOIN, M.; KRIS-ETHERTON, P.M.; BURKE, F.; CARSON, J.A; CHAMPAGNE, C.M. The evidence for dietary prevention and treatment of cardiovascular disease. **J Am Diet Assoc**, v.108, n.2, p.287-331, fev. 2008.

152. VERHOYE, E.; LANGLOIS, M.R.; ASKLEPIOS INVESTIGATORS. Circulating oxidized low density lipoprotein: a biomarker of atherosclerosis and cardiovascular risk? **Clin Chem Lab Med**, v.47, n.2, p. 128-137, 2009.

153. VINING, E.P.G. Long-term health consequences of epilepsy diet treatments. **Epilepsia**, v.49, p.27-29, 2008, Supplement 8.

154. VINING, E.P.G.; PYZIK, P.; MCGROGAN, J.; HLADKY, H.; ANAND, A.; KRIEGLER, S. Growth of children on the ketogenic diet. **Dev Med Child Neurol**, v.44, n.12, p.796-802, dez. 2002.

155. WEINSHENKER, D. The contribution of norepinephrine and orexigenic neuropeptides to the anticonvulsant effect of the ketogenic diet. **Epilepsia**, v.49, p.104-107, 2008, Supplement 8.

156. WESTMAN, E.C.; YANCY, WS JR.; OLSEN, M.K.; DUDLEY, T.; GUYTON, J.R. Effect of a low-carbohydrate, ketogenic diet program compared to a low-fat diet on fasting lipoprotein subclasses. **Int J Cardiol**, v.110, n.2, p.212-216, jun. 2006.

157. WHELESS, J.W. History of the ketogenic diet. **Epilepsia**, v.49, p.3-5, 2008, Supplement 8.

158. WHO Multicentre Growth Reference Study Group. WHO Child Growth Standards based on length/height, weight and age. **Acta Paediatr Suppl,** v.450, p.76-85, 2006.

159. WHO. In: de ONIS, M.; ONYANGO, A.W.; BORGHI, E.; SIYAM, A.; NISHIDA, C.; SIEKMANN, J. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. **Bull World Health Organ**, 2007, v.85, n.9, p.660-667.

160. WHO. Media centre: **Epilepsy**. Fact sheet n. 999, 2012.

161. WHO. WHO maps noncommunicable disease trends in all countries: country profiles on noncommunicable disease trends in 193 countries**. Cent Eur J Public Health,** v. 19, n. 3, set. 2011.

162. WILDER, R.M. The effects of ketonemia on the course of epilepsy. **Mayo Clin Bull**. 2:307, 1921.

163. WRIGHT, C.M.; SHERRIFF, A.; WARD, S.C.G.; MCCOLL, J.H.; REILLY, J.J.; NESS, A.R. Development of bioelectrical impedance-derived indices of fat and fat-free mass for assessment of nutritional status in childhood. **Eur J Clin Nutr**, v. 62, n.2, p.210-217, fev. 2008.

164. WU, Y.T.; NIELSEN, D.H.; CASSADY, S.L.; COOK, J.S.; JANZ, K.F.; HANSEN, J.R. Cross-validation of bioelectrical impedance analysis of body composition in children and adolescents. **Phys Ther**, v. 73, n. 5, p.320-328, mai. 1993.

165. XAVIER, H.T.; IZAR M.C.; FARIA NETO, J.R.; ASSAD, M.H.; ROCHA, V.Z.; SPOSITO, A.C.; FONSECA, F.A.; DOS SANTOS, J.E.; SANTOS, R.D.; BERTOLAMI, M.C.; FALUDI, A.A.; MARTINEZ, T.L.R.; DIAMENT, J.; GUIMARÃES, A.; FORTI, N.A.; MORIGUCHI E.; CHAGAS, A.C.P.; COELHO, O.R.; RAMIRES, J.A.F.; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arq Bras Cardiol**, 2013.

166. YOSHIDA, H.; KISUGI, R. Mechanisms of LDL oxidation. **Clin Chim Acta**, v.14, n.411, p.1875-1882, dez. 2010.

167. YUDKOFF, M.; DAIKHIN, Y.; NISSIM, I.; GRUNSTEIN, R.; NISSIM, I. Effects of ketone bodies on astrocyte amino acid metabolism. **Journal of Neurochemistry**, v.69, n.2, p.682-92, ago. 1997.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

O estudo: **Impacto da dieta cetogênica nas características oxidativas, físicas e lipídicas de lipoproteínas de crianças com epilepsia refratária** tem como objetivo avaliar a influência da dieta cetogênica na composição das lipoproteínas (gorduras presentes no sangue) e no estado nutricional das crianças (crescimento e desenvolvimento). Para a realização do mesmo, será coletada da criança em três períodos uma amostra de sangue 20,0 ml, será aferido o peso, estatura e realizado o exame de impedância elétrica, o qual fornece dados da quantidade de gordura, músculo e água no corpo. Na qualidade de responsável pela criança, o Sr (a) responderá um questionário sobre nível sócio-econômico, e informações clínicas. Todos os resultados obtidos estarão a sua disposição, sendo que sua identidade e da criança será mantida em total sigilo. O Sr(a) tem o direito de retirar a criança deste projeto a qualquer momento. A participação ou não da criança neste estudo não comprometerá de qualquer forma seu atendimento neste Hospital. Se houver algum problema de saúde, decorrente da pesquisa, a criança será atendida nesta Instituição, segundo o critério de assistência da mesma. A participação no estudo não acarretará custos para a criança e sua família e não será oferecida nenhuma compensação financeira adicional.

Este projeto será desenvolvido pelo Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo em associação com este Hospital. A pesquisa tem caráter de diagnóstico e não de intervenção, visto que a dieta cetogência foi indica em função de necessidade clínica da criança e não devido o protocolo de pesquisa. Portanto, o risco é considerado mínimo. O único efeito adverso associado a este estudo por ocorrer durante a coleta de sangue, que eventualmente poderá causar pequeno desconforto e formação de hematomas, apesar de todos os procedimentos serem feitos com enfermeiras e usarem materiais descartáveis e de uso individual. Os benefícios do resultado deste estudo são contribuir com a conduta médica e/ou dietética na condução do tratamento com a dieta cetogênica no controle de crises epilépticas. Todos os resultados serão entregues aos responsáveis dos participantes do estudo, sendo que orientações específicas serão dadas quando estes resultados indicarem risco à saúde destes indivíduos.

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto que a criança abaixo identificada, da qual sou legalmente responsável, possa participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo,_____de_____de 20___

Dados da Criança

Nome:

Data de Nascimento:

Sexo:

Dados do Responsável

_____

Responsável: Sexo:
RG: CPF:
Data de Nascimento:
Endereço: Telefone:

Dados dos Pesquisadores

_____

Pesquisador Responsável: Patricia Azevedo de Lima (Mestranda)
Faculdade de Saúde Pública/Departamento de Nutrição – (11) 3061-7865

_____

Profa. Dra. Nágila Raquel Teixeira Damasceno
Coordenadora-Chefe – Faculdade de Saúde Pública – (11) 3061-7865

Em caso de dúvidas ou notificações de acontecimentos não previstos procurar esclarecimentos com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

Tel. (11) 3061-7779 – Av. Dr. Arnaldo, 715 – Cerqueira César – São Paulo - SP

Anexo 2 – Aprovação do Instituto da Criança do HC-FMUSP

MEDICINA
USP

Instituto da Criança
Hospital das Clínicas - FMUSP

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo está ciente e de acordo com o Projeto de Pesquisa intitulado: "Impacto da dieta cetogênica nas características oxidativas, físicas e lipídicas de lipoproteínas de crianças com epilepsia refratária", dos autor(es): Patrícia Azevedo de Lima, aluna de Mestrado da Faculdade de Saúde Pública da USP (FSP-USP) e Profa. Dra. Nágila Raquel Teixeira Damasceno, Pesquisadora Responsável do Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana aplicada com área de concentração na FSP-USP.

Este projeto tem por objetivo avaliar o impacto da dieta cetogênica clássica nas características oxidativas, físicas e lipídicas das lipoproteínas de crianças com epilepsia refratária. O estudo será uma coorte prospectiva com crianças entre 1 e 9 anos e 11 meses que serão avaliadas em três momentos: T0 – após indicação do tratamento e antes da introdução da dieta cetogênica; T1 – após 6 meses de tratamento com a dieta cetogência e; T2 – após 12 meses de tratamento com a dieta cetogênica.

Este protocolo será submetido ao Comitê de Ética da Faculdade de Saúde Pública da USP e posteriormente à CAPPesq.

São Paulo, 4 de abril de 2012

Dra. Maria Joaquina Marques-Dias
Responsável pela Unidade de Neurologia Pediátrica - ICr

Profa. Dra. Sonia Regina T.S. Ramos
Coordenadora do Corpo de Pareceristas
Departamento de Pediatria FMUSP

Prof. Uenis Tannuri
Presidente CPE
Departamento de Pediatria FMUSP

Prof. Vicente Odone Filho
Chefe do Departamento de Pediatria da FMUSP

Anexo 3 – Aprovação do Comitê de Ética da FSP-USP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – COEP

Faculdade de Saúde Pública
Universidade de São Paulo

OF.COEP/184/12

18 de setembro de 2012.

Prezada pesquisadora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, **analisou**, de acordo com a Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares, o protocolo de pesquisa n.º **CAAE 00608012.1.0000.5421**, intitulado **"IMPACTO DA DIETA CETOGÊNICA NAS CARACTERÍSTICAS OXIDATIVAS, FÍSICAS E LIPÍDICAS DE LIPOPROTEÍNAS DE CRIANÇAS COM EPILEPSIA REFRATÁRIA"**, sob responsabilidade da pesquisadora **Patricia Azevedo de Lima**, considerando-o **APROVADO "AD REFERENDUM"**.

Cabe lembrar que, de acordo com a Res. CNS 196/96, são deveres do(a) pesquisador(a): **1)** Comunicar de imediato qualquer alteração no projeto e aguardar manifestação deste Comitê de Ética em Pesquisa para dar continuidade à pesquisa; **2)** Manter sob sua guarda e em local seguro, pelo prazo de 5 (cinco) anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo COEP, no caso eventual auditoria; **3)** Comunicar formalmente a este Comitê por ocasião do encerramento da pesquisa; **4)** Elaborar e apresentar relatórios parciais e final; **5)** Justificar perante o COEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Atenciosamente,

Prof. Tit. Claudio Leone
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa – FSP/USP

Ilm.ª Sr.ª
Patricia Azevedo de Lima

Av. Dr. Arnaldo, 715 – Cerqueira César – CEP 01246-904 – São Paulo – SP
Contato: (55 11) 3061 7779 | coep@fsp.usp.br | www.fsp.usp.br

Anexo 4 - Questionário de Identificação e Avaliação Socioeconômica e Clínica do Paciente

IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO SÓCIOECONÔMICA E CLÍNICA		
A0 DATA: ____/____/____	A1 RG HC:	
A2 Nome do Paciente:		
Endereço:		
Bairro:	CEP:	
Cidade:	Telefone:	
A3 Sexo: 1( ) M 2( )F	A4 Data Nascimento: ____/____/____	A5 Idade:
A6 Raça: 1 ( ) Branco 2 ( ) Negro 3 ( ) Pardo 4 ( ) Amarelo 5 ( ) Indígena		
A7 Peso ao nascer:	A8 IG: 1 ( ) < 37 semanas 2 ( ) 37 a 42 semanas 3 ( ) > 42 semanas	
DADOS DO RESPONSÁVEL		
A9 Nome do Responsável:		
E-mail:		
A10 Grau de Parentesco:		
A11 Escolaridade: 1 ( ) Analfabeto 2 ( ) Ensino Fundamental Incompleto 3 ( ) Ensino Fundamental Completo 4 ( ) Ensino Médio Incompleto 5 ( ) Ensino Médio Completo 6 ( ) Ensino Superior Incompleto 7 ( ) Ensino Superior Completo 8 ( ) Outros:_____		
A12 Renda Média Mensal: 1 ( ) Até R$ 600,00 2 ( ) Entre R$ 600,00 e 1200,00 3 ( ) Entre R$ 1200,00 e 1800 4 ( ) Entre R$ 1800 e 3000 5 ( ) Entre R$ 3000,00 e 6000,00 6 ( ) > 6000,00		
A13 Quantas pessoas moram na sua casa?	A14 Quantas crianças?	
AVALIAÇÃO CLÍNICA DO PACIENTE		
A15 Possui alguma doença: 1 ( ) Sim 2 ( ) Não		
A16 Qual doença/Restrição alimentar A160 Epilepsia 1S ( ) 2 N ( ) A161 Doença Auto – Imune 1S ( ) 2 N ( ) A162 Hipertensão Arterial 1S ( ) 2 N ( ) A163 Diabetes Melittus 1S ( ) 2 N ( ) A164 Hipotireoidismo 1S ( ) 2 N ( ) Qual?_____ 165 Doença Hepática 1S ( ) 2 N ( ) 166 Alergia a PLV 1S ( ) 2 N ( ) 167 Intolerância a Lactose 1S ( ) 2 N ( ) 168 Insuficiência Renal Crônica 1S ( ) 2 N ( ) 169 Outras 1S ( ) 2 N ( ) A169a		
A17 Já fez alguma cirurgia? ( ) Sim ( ) Não A171 Qual? _____ A172 Quando? _____ A18: Data da Menarca: ____/____/_____		
MOMENTO T0		
B1 Média N° Crises na última semana: (dia)		
TIPOS DE CRISES:		
B2A TCG	1 ( ) S 2 ( ) N	
B2B Ausência Típica	1 ( ) S 2 ( ) N	
B2C Ausência Atípica	1 ( ) S 2 ( ) N	
B2D Ausência Mioclônica	1 ( ) S 2 ( ) N	
B2E Ausência com Mioclonia palpebral	1 ( ) S 2 ( ) N	
B2F Mioclônica	1 ( ) S 2 ( ) N	
B2G Mioclônica Atônica	1 ( ) S 2 ( ) N	
B2H Mioclônica Tônica	1 ( ) S 2 ( ) N	
B2I Clônica	1 ( ) S 2 ( ) N	
B2J Tônica	1 ( ) S 2 ( ) N	
B2L Atônica	1 ( ) S 2 ( ) N	
B2M Crise Focal	1 ( ) S 2 ( ) N	
B2N Espasmos Epilépticos	1 ( ) S 2 ( ) N	
DIETA		

B3 Data de início da dieta cetogênica: ____/____/____

B4 Proporção (G:C+P):
B5 Total Kcal:
B6 Kcal/Kg peso:
B8 N° de refeições:

B9 Uso medicamentos :

B90 Vigabatrina 1S ( ) 2 N ( ) B901 Posologia:_____ B97 Oxcarbazepina 1S ( ) 2 N ( ) B971 Posologia:_____
B91 Carbamazepina 1S ( ) 2 N ( ) B911 Posologia:_____ B98 Fenitoína 1S ( ) 2 N ( ) B981 Posologia:_____
B92 Fenobarbital 1S ( ) 2 N ( ) B921 Posologia:_____ B99 Clobazam 1S ( ) 2 N ( ) B991 Posologia:_____
B93 Valproato 1S ( ) 2 N ( ) B931 Posologia:_____ B10 Clonazepam 1S ( ) 2 N ( ) B101 Posologia:_____
B94 Lamotrigina 1S ( ) 2 N ( ) B941 Posologia:_____ B11 Nitrazepam 1S ( ) 2 N ( ) B112 Posologia:_____
B95 Topiramato 1S ( ) 2 N ( ) B951 Posologia:_____ B12 Primidona 1S ( ) 2 N ( ) B121 Posologia:_____
B96 Levetiracetam 1S ( ) 2 N ( ) B961 Posologia:_____ B13 Etoxussimida 1S ( ) 2 N ( ) B131 Posologia:_____

B14 Suplemento (Vit/Mineral) 1S ( ) 2 N ( ) B15 Posologia:_____
B16 Outro 1S ( ) 2 N ( ) B17 Qual: _____ B18 Posologia:_____

MOMENTO T1

C1 Média N° Crises na última semana:	C2 Cetonúria: 1 ( )+ 2 ( ) +/++ 3 ( ) ++ 4 ( ) ++/+++ 5 ( ) +++

TIPOS DE CRISES:	
C2A TCG	1 ( ) S 2 ( ) N
C2B Ausência Típica	1 ( ) S 2 ( ) N
C2C Ausência Atípica	1 ( ) S 2 ( ) N
C2D Ausência Mioclônica	1 ( ) S 2 ( ) N
C2E Ausência com Mioclonia palpebral	1 ( ) S 2 ( ) N
C2F Mioclônica	1 ( ) S 2 ( ) N
C2G Mioclônica Atônica	1 ( ) S 2 ( ) N
C2H Mioclônica Tônica	1 ( ) S 2 ( ) N
C2I Clônica	1 ( ) S 2 ( ) N
C2J Tônica	1 ( ) S 2 ( ) N
C2L Atônica	1 ( ) S 2 ( ) N
C2M Crise Focal	1 ( ) S 2 ( ) N
C2N Espasmos Epilépticos	1 ( ) S 2 ( ) N

DIETA

C4 Proporção (G:C+P):
C5 Total Kcal:
C6 Kcal/Kg peso:
C8 N° de refeições:

C9 Uso medicamentos:

C90 Vigabatrina 1S ( ) 2 N ( ) C901 Posologia:_____ C97 Oxcarbazepina 1S ( ) 2 N ( ) C971 Posologia:_____
C91 Carbamazepina 1S ( ) 2 N ( ) C911 Posologia:_____ C98 Fenitoína 1S ( ) 2 N ( ) C981 Posologia:_____
C92 Fenobarbital 1S ( ) 2 N ( ) C921 Posologia:_____ C99 Clobazam 1S ( ) 2 N ( ) C991 Posologia:_____
C93 Valproato 1S ( ) 2 N ( ) C931 Posologia:_____ C10 Clonazepam 1S ( ) 2 N ( ) C101 Posologia:_____

C94 Lamotrigina 1S ( ) 2 N ( ) C941 Posologia:_____ C11 Nitrazepam 1S ( ) 2 N ( ) C112 Posologia:_____
C95 Topiramato 1S ( ) 2 N ( ) C951 Posologia:_____ C12 Primidona 1S ( ) 2 N ( ) C121 Posologia:_____
C96 Levetiracetam 1S ( ) 2 N ( ) C961 Posologia:_____ C13 Etoxussimida 1S ( ) 2 N ( ) C131 Posologia:_____

C14 Suplemento (Vit/Mineral) 1S ( ) 2 N ( ) C15 Posologia:_____
C16 Outro 1S ( ) 2 N ( ) C17 Qual: _____ C18 Posologia:_____

C10 Intercorrências durante o tratamento com DC do T0 ao T1: 1 ( ) Sim 2 ( ) Não

C100 Náusea 1S ( ) 2 N ( ) C105 Esofagite 1S ( ) 2 N ( )
C101 Vômito 1S ( ) 2 N ( ) C106 Gastrite 1S ( ) 2 N ( )
C102 Diarréia 1S ( ) 2 N ( ) C107 Outros 1S ( ) 2 N ( ) C108 Qual: _____
C103 Constipação 1S ( ) 2 N ( ) C109 ( ) Internação ( ) Sim 2 ( ) Não C110 Motivo: _____
C104 Refluxo 1S ( ) 2 N ( )

C12 Suspensão da DC do T0 ao T1: 1 ( ) Sim 2 ( ) Não
C121 Motivo:_____
Período: ____/____/____ a ____/____/____ C122 Dias sem dieta: _____

MOMENTO T2

D1 Média N° Crises na última semana: D2 Cetonúria: 1 ( )+ 2 ( ) +/++ 3 ( ) ++ 4 ( ) ++/+++ 5 ( ) +++

TIPOS DE DRISES:

D3A TCG	1 ( ) S 2 ( ) N
D3B Ausência Típica	1 ( ) S 2 ( ) N
D3D Ausência Atípica	1 ( ) S 2 ( ) N
D3D Ausência Mioclônica	1 ( ) S 2 ( ) N
D3E Ausência com Mioclonia palpebral	1 ( ) S 2 ( ) N
D3F Mioclônica	1 ( ) S 2 ( ) N
D3G Mioclônica Atônica	1 ( ) S 2 ( ) N
D3H MioclôniDa Tônica	1 ( ) S 2 ( ) N
D3I Clônica	1 ( ) S 2 ( ) N
D3J Tônica	1 ( ) S 2 ( ) N
D3LAtônica	1 ( ) S 2 ( ) N
D3M Crise Focal	1 ( ) S 2 ( ) N
D3N Espasmos Epilépticos	1 ( ) S 2 ( ) N

DIETA

D4 Proporção (G:D+P):
D5 Total KDal:
D6 KDal/Kg peso:
D8 N° de refeições:

D9 Uso medicamentos:

D90 Vigabatrina 1S ( ) 2 N ( ) D901 Posologia:_____ D97 Oxcarbazepina 1S ( ) 2 N ( ) D971 Posologia:_____
D91 Darbamazepina 1S ( ) 2 N ( ) D911 Posologia:_____ D98 Fenitoína 1S ( ) 2 N ( ) D981 Posologia:_____
D92 Fenobarbital 1S ( ) 2 N ( ) D921 Posologia:_____ D99 Dlobazam 1S ( ) 2 N ( ) D991 Posologia:_____
D93 Valproato 1S ( ) 2 N ( ) D931 Posologia:_____ D10 Dlonazepam 1S ( ) 2 N ( ) D101 Posologia:_____
D94 Lamotrigina 1S ( ) 2 N ( ) D941 Posologia:_____ D11 Nitrazepam 1S ( ) 2 N ( ) D112 Posologia:_____
D95 Topiramato 1S ( ) 2 N ( ) D951 Posologia:_____ D12 Primidona 1S ( ) 2 N ( ) D121 Posologia:_____
D96 Levetiracetam 1S ( ) 2 N ( ) D961 Posologia:_____ D13 Etoxussimida 1S ( ) 2 N ( ) D131

Posologia:_____

D14 Suplemento (Vit/Mineral) 1S ( ) 2 N ( ) D15 Posologia:_____
D16 Outro 1S ( ) 2 N ( ) D17 Qual: _____ D18 Posologia:_____

D10 Intercorrências durante o tratamento com DC do T1 ao T2: 1 ( ) Sim 2 ( ) Não

D100 Náusea 1S ( ) 2 N ( ) D105 Esofagite 1S ( ) 2 N ( )
D101 Vômito 1S ( ) 2 N ( ) D106 Gastrite 1S ( ) 2 N ( )
D102 Diarréia 1S ( ) 2 N ( ) D107 Outros 1S ( ) 2 N ( ) D108 Qual: _____
D103 Donstipação 1S ( ) 2 N ( ) D109 ( ) Internação ( ) Sim 2 ( ) Não D110 Motivo: _____
D104 Refluxo 1S ( ) 2 N ( )

D12 Suspensão da DD do T0 ao T1: 1 ( ) Sim 2 ( ) Não
D121 Motivo:_____
Período: ____/____/____ a ____/____/____ D122 Dias sem dieta: _____

PARAMETROS ANTROPOMÊTRICOS

	Valor T0		Valor T1		Valor T2	
Estatura (cm)						
Peso (Kg)						
IMC (Kg/m^2)						
DCT (mm)						
DCS (mm)						
Σ DCT e DCS						
Percentil Σ						
Z E/I						
Z P/I						
Z IMC/I						
Classificação do EN						
Resistência (R)						
Reactância (Xc)						
Ângulo de fase (AF)						
% MCC						
% ME						
% MM						
% MG						
% AI						
% AE						
% ACTmm						
% ACTpeso						

Anexo 5 – Classificação das crises epilépticas (ILAE, 2010)

Glossário e Classificação das Crises – ILAE 2001 e 2010	
Terminologia	**Descrição**
Crises Generalizadas	Ativação inicial de ambos os hemisférios cerebrais
Tônico-clônica	Sequência consistente de tônica seguida de clônica. Variações de clônica-tônica-clônica podem ser vistas
Ausência	
Típica	Perda súbita da consciência e parada do olhar
Atípica	Perda e volta da consciência de maneira menos abrupta que a ausência típica
Ausência com características especiais	
Ausência Mioclônica	Combinação de ausência com mioclônica
Mioclonia Palpebral	Rápida e breve (< 100ms) contração única ou múltipla da pálpebra
Mioclônica	
Mioclônica	Rápida e breve (< 100ms) contração única ou múltipla dos músculos ou grupos musculares de topografia variável (axial, proximal, membros, distal).
Mioclônica atônica	Súbita perda ou diminuição de tônus muscular precedida de mioclonia com duração de > 1 a 2 s, envolvendo a cabeça, tronco, mandíbula ou membros.
Mioclônica tônica	Combinação de tônica com mioclônica
Clônica	Mioclonia que é regularmente repetitiva, envolve os mesmos grupos musculares, com uma frequência de 2 a 3 c/s, e é prolongada. Sinônimo: mioclonia ritmicas.
Tônica	Aumento da contração muscular sustentada que dura poucos segundos a minutos
Crises Focais	Ativação inicial de apenas uma parte do hemisfério cerebral
Espasmos epilépticos	Súbita flexão, extensão, ou misto de extensão-flexão dos músculos predominantemente proximais e do tronco, mais sustentável que a mioclônica, mas não tão sustentado que a crise tônica

Anexo 6 – Exemplo de Dieta Cetogênica 4:1

DIETA CETOGÊNICA 4:1

NOME: **DATA:**

REFEIÇÃO	ALIMENTOS	QUANTIDADE		SUBSTITUTOS
Café da manhã	Creme de leite	115	g	não tem
	Ovo	36	g	não tem
	Fruta	**ver lista**		ver lista
	Óleo	2	ml	ou azeite
Almoço	Carne	**ver lista**		ver lista
	Hortaliça grupo I	**ver lista**		ver lista
	Hortaliça grupo II	**ver lista**		ver lista
	Toucinho fresco	39	g	não tem
	Óleo	1	ml	ou azeite
	Limonada ou suco de maracujá sem açúcar	1 copo		
Merenda	Creme de leite	115	g	não tem
	Ovo	36	g	não tem
	Fruta	**ver lista**		ver lista
	Óleo	2	ml	ou azeite
Jantar	Carne	**ver lista**		ver lista
	Hortaliça grupo I	**ver lista**		ver lista
	Hortaliça grupo II	**ver lista**		ver lista
	Toucinho fresco	39	g	não tem
	Óleo	1	ml	ou azeite
	Limonada ou suco de maracujá sem açúcar	1 copo		

BEBIDAS PERMITIDAS: SUCO DE LIMÃO E MARACUJÁ DILUÍDOS, SUCO ARTIFICIAL EM PÓ SEM AÇÚCAR, CHÁS SEM AÇÚCAR E ÁGUA.

LISTA DE ALIMENTOS PERMITIDOS - QUANTIDADES E SUBSTITUTOS

FRUTAS

TIPO	QUANT. (g)	TIPO	QUANT. (g)
Abacaxi	19	Mamão	13
Abacate	15	Manga	7
Ameixa fresca	10	Melancia	20
Caqui	6	Melão	17
Carambola	12	Mexerica	10
Figo maduro	7	Morango	12
Goiaba	6	Pêra	8
Kiwi	8	Pêssego	11
Maçã	7	Uva	7

CARNES

TIPO	QUANT. (g)	ACRESCENTAR
Carne de Vaca	38	-----
Frango	33	6 ml de óleo
Carne de Porco	39	3 ml de óleo
Costela porco s/osso	38	-----
Sardinha enlatada, a óleo	29	-----
Salsicha	35	-----
Lingüiça mista	32	-----
Mortadela	29	-----
Peixe	35	4 ml de óleo
Presunto	38	-----
Sardinha fresca	26	4 ml de óleo
Hambúrguer industrializado	32	4 ml de óleo

HORTALIÇAS GRUPO I

TIPO	QUANT. (g)	TIPO	QUANT. (g)
Abóbora	31	Couve manteiga	21
Abobrinha	39	Espinafre	33
Berinjela	35	Nabo	43
Brócolis	23	Quiabo	21
Cenoura	26	Repolho	33
Chuchu	29	Vagem	29
Couve-flor	27	Palmito conserva	48

HORTALIÇAS GRUPO II

TIPO	QUANT. (g)	TIPO	QUANT. (g)
Acelga	20	Azeitona verde	34
Agrião	24	Rúcula	24
Alface	35	Pepino	36
Almeirão	25	Pimentão	18
Chicória	23	Rabanete	25
Escarola	25	Tomate	27

OPÇÃO DE DESJEJUM E/OU MERENDA COM POLENGUINHO OU PRESUNTO

	ALIMENTOS	QUANTIDADE		SUBSTITUTOS
Café da manhã	Creme de leite	90	g	não tem
ou	Polenguinho	46	g	não tem
Merenda	Fruta	**ver lista**		ver lista
	Óleo	2	ml	ou azeite

LISTA DE ALIMENTOS PERMITIDOS - QUANTIDADES E SUBSTITUTOS

FRUTAS

TIPO	QUANT. (g)	TIPO	QUANT. (g)
Abacaxi	18	Mamão	13
Abacate	14	Manga	7
Ameixa fresca	10	Melancia	19
Caqui	5	Melão	17
Carambola	12	Mexerica	9
Figo maduro	7	Morango	12
Goiaba	6	Pêra	8
Kiwi	8	Pêssego	11
Maçã	45	Uva	6

POLENQUINHO

TIPO	QUANT. (g)
Presunto	39

ORIENTAÇÕES PARA A DIETA CETOGÊNICA

1. Todos os alimentos devem ser pesados crus, exceto o ovo.

2. Pode-se usar como temperos: alho, cebola (1colher de chá), louro, cheiro-verde hortelã, orégano, manjericão e outros (1 colher de chá).

3. Pode-se usar essência de baunilha ou de frutas no creme de leite.

4. Pode-se usar adoçantes artificiais **sem lactose e sem frutose.**

5. Pode-se dar chá de erva-doce, camomila, erva-cidreira, **sem açúcar.**

6. Para facilitar o preparo do toucinho, pese as quantidades necessárias para cada refeição e congele.

7. Com os alimentos que constam em cada refeição, pode-se preparar: sopas, frituras, saladas, cozidos ou assados.

8. Não utilize alimentos que não estão na lista.

9. Não prepare duas ou mais refeições e depois divida. Prepare cada uma separadamente.

10. Não use alimentos de uma lista como substitutos de outra.

11. Ofereça todas as refeições nos horários estabelecidos.

12. Caso a criança não aceite toda a refeição ou um de seus componentes, despreze-os, não ofereça em nenhum outro horário ou refeição.

13. Registre diariamente num caderno anotando:

- Sempre o horário das refeições, alimentos oferecidos e sua aceitação,
- Leitura da cetonúria
- O número de crises convulsivas.
- Os outros problemas de saúde quando houver.

Anexo 7 – Modelo de Registro Alimentar

Formulário a ser aplicado nos momentos: T0, T1 e T2

NOME:_____

TEL: _____

ENTREVISTA: __/__/__

DIA DA SEMANA: ( )dom ( )seg ( )ter ( )qua ( )qui ( )sex ( )sáb

Horário e Local	**Alimentos ou Preparações**	**Quantidade**	**Marca Comercial**	**OBS**

Entrevistador: _____

Anexo 8 – Manuscrito 1: aceito para publicação no periódico Clinics

Running title: Mechanisms of ketogenic diet

Title: Neurobiochemical mechanisms of ketogenic diet in refractory epilepsy

Patricia Azevedo de Lima[a], Leticia Pereira de Brito Sampaio[b], Nágila Raquel Teixeira Damasceno[c]

[a] *Post-Graduate Program in Applied Human Nutrition, University of Sao Paulo; Av. Prof. Lineu Prestes, 580; 05508-000, Sao Paulo, SP, Brazil* [c]

[b] *Children's Institute, Hospital of Clinics, School of Medicine, University of Sao Paulo; Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, 647; 05403-000, Sao Paulo, SP, Brazil*

[c]*Department of Nutrition, School of Public Health, University of Sao Paulo; Av. Dr. Arnaldo, 715; 01246-904, Sao Paulo, SP, Brazil*

* Corresponding author: *E-mail*: nagila@usp.br

Phone number: +55(11) 3061-7865; Fax number: +55(11) 3061-7130

Author´s contributions

PAL and NRTD designed and coordinated the study. PAL and LPBS raised the main aspects of the study. PAL were in charge of the analysis and quality control of data. PAL and NRTD prepared the table. PAL draw the figure and LPBS revised it. All authors contributed to interpretation of data. PAL wrote the first draft of the manuscript. NRTD critically reviewed the manuscript and LPBS revised it. All authors gave their approval to the final version of the manuscript.

Abstract

Ketogenic diet is an important therapy used in the control of drug-refractory seizures. Many studies have shown that children and adolescents under ketogenic diet of treatment present over 50% reduction in seizures, which is considered clinically relevant. Such benefit is based on provision of a diet containing high fat (about 90% fat for 24 months). This dietary model was proposed in the twenties of the last century and the clinical response has been widely described. Previous studies have shown that mechanisms for the control of seizures are associated with ketone bodies, which are produced by fatty acid oxidation. Although the pathways involved in ketogenic diet are not entirely clear, production of ketone bodies appears to be the main point of neurotransmitter modulation and antioxidant effect on the brain. This review highlights the impact of ketogenic diet on the modulation by neurotransmitters, levels of biogenic monoamines, and protective antioxidant mechanisms of neurons. In addition, future perspectives are proposed aiming new studies.

KEYWORDS: ketogenic diet; ketone bodies; refractory epilepsy.

Abbreviations: A_1R: adenosine receptor; ATP: adenosine triphosphate; GABA: γ-aminobutyric acid; KB: ketone bodies; KD: ketogenic diet; MAD: modified Atkins diet; mTOR: mammalian target of rapamycin; ROS: reactive oxygen species; UCP: uncoupling protein; VGLUT: vesicular glutamate transporters

1. Introduction

Ketogenic diet (KD) is a treatment especially directed to children and adolescents with refractory epilepsy (drug-refractory seizures), regardless of epilepsy etiology (1). Although refractory epilepsy is the starting point of this treatment, clinical and epidemiologic studies indicate that chronic epilepsy is followed by long-term behavioral changes and cognitive degeneration even in optimal state of the antiepileptic drug therapy (2,3). As a consequence, some authors argue that KD could be an early option fin the treatment of patients with epilepsy instead of the last choice. The KD is also an important coadjuvant treatment for most refractory and generalized epilepsies as the Dravet, Doose, Lennox-Gastaut, and West syndromes (4).

The KD was developed in 1920 by Wilder (5), and many studies have shown its positive benefits, with over 50% reduction in seizures, which is considered clinically relevant (6,7). In evidence of positive results, the average time of treatment with KD is 2 years, and it should be discontinued after this period (1).

Recently, Hirano et al (8) reported the positive effect of KD in children with West syndrome resistant to the adrenocorticotropic hormone (ACTH) therapy, a first-line treatment for children with this syndrome. Among the main effects observed in 5 out of 6 children in this study, spasms disappeared in 2 children and their frequency decreased by 80% in the other 3 children. Similar results of the positive effect of KD were observed in a study of 41 children with refractory epilepsy, in which the number of seizures was reduced by 90% in 10.53% of children, by at least 50% in 36.84% of children, and 5,26% of children had no more seizures (9).

Composition of KD is based on high fat, low-carbohydrate, and moderate-protein components and production of ketone bodies (KB) from oxidation of fat is the primary source of

metabolic energy, which appears to be involved in the therapeutic mechanisms for the control of seizures (10).

The modified Atkins diet (MAD) was also used in the treatment of patients with refractory epilepsy (11). As opposed to KD, there is no restriction to the intake of protein and daily calories in MAD. This diet is composed of 60% fat, 30% protein, and 10% carbohydrates (12). Although MAD is more palatable than KD, its efficacy in relation to KD is unclear (11). In children with Lennox-Gastaut syndrome, MAD was effective and well tolerated and the 9 children on diet had more than 50% reduction in seizure frequency after one year of treatment (13). However, a previous review showed that 37% of patients fed KD had an additional decrease (≥10%) in seizures as compared to patients fed MAD (14).

Regardless of using MAD or KD, in some clinical situations such as patients with glucose transporter 1 deficiency syndrome (GLUT1-DS), these dietary treatments can be used as tools for identifying patients with metabolic diseases, since these patients are generally seizure-free after diet introduction (15).

Previously, the KD protocol recommended to start the diet after a fasting period of 12-48 h, during which the child must stay in a hospital (1). As described in the references, many centers start the diet without fasting since several studies have found no difference between these procedures in clinical practice (5). Introduction of KD following specific requirements (fat to carbohydrate and protein ratio) and control of seizures usually occur when these ratios are 3:1 or 4:1, the proportions most commonly used (16). Diets containing lower proportions (2:1) are normally used when the treatment is introduced (10).

The KD is usually well tolerated and the number of studies in the literature reporting their benefits is increasing. However, the metabolic pathways involved in the production of KB are not well established in spite of almost one century of research. This review highlights the main neurobiochemical mechanisms studied in the past 15 years according to the original and review studies indexed in the MedLine/PubMed database.

2. Anticonvulsant mechanisms and ketone bodies

There are many hypotheses regarding the antiepileptic mechanisms of KD. The early hypotheses on action of KD were focused on the concepts of acidosis, dehydration, and increased ketone concentration (17). Other mechanisms such as γ-aminobutyric acid (GABA) and glutamate, membrane potential, ion channels, biogenic monoamines, and neuroprotective action (**Figure 1**) have been studied in experimental models (*in vivo* or *in vitro*).

Although the mechanism through which KD exerts its anticonvulsant effects is unclear, this effect is often associated with important metabolic changes that induce increased levels of KB, mainly β-hydroxybutyrate and acetoacetate (18,19).

The energy metabolism of brain involves distinct and complex pathways. In physiological conditions, most precursors of KB are long-chain fatty acids. They are released from adipose tissue in response to a decrease in blood glucose, as in fasting (20).

Similar mechanisms are involved in KD, during which long-chain fatty acids are metabolized in the liver and converted into KB. These fatty acids are oxidized within the mitochondria producing high levels of acetyl-CoA, which cannot be oxidized in the Krebs cycle. Such excess of acetyl-CoA is converted to acetoacetate and subsequently to acetone and β-hydroxybutyrate (21). The KB cross the blood-brain barrier and are transported by monocarboxylic-acid transporters to the brain interstitial space, the glia, and neurons. In these tissues, KB act as substrates in the Krebs cycle and respiratory chain, contributing to the brain energy metabolism (21).

Currently, there is no evidence that dehydration or fluid restriction is necessary for clinical efficacy of KD (17). Furthermore, KD has been associated with pH changes, which directly influence the behavior of ion channels and neurotransmitter receptors (17).

Some studies suggest that KD is more effective in children than in adults. There are high levels of ketone-metabolizing enzymes in the brain and their capacity to take up ketone bodies is higher in infancy than in adulthood (18,21). The amount of monocarboxylic-acid transporters decreases with cerebral maturation and they are present at low levels in adulthood (21). Despite these differences, adaptive cerebral metabolic changes occur in adults exposed to stress situations such as ischemia, trauma, and sepsis (22). As shown in the literature, there is an increase in the concentration of ketone-dependent monocarboxylic-acid transporters in these situations showing that KD treatment in adults is feasible, (22,23).

Several studies on mechanisms of action of KD are based on animal models allowing investigators to examine anatomical, chemical, cellular, molecular, and functional changes after seizures (24,25). Different animal models have been used including electrical and chemical stimulation and physical, genetic or spontaneous seizure models that simulate different epileptic seizures (17,21,26). **Table 1** shows the main outcomes reported in the last years.

The *in vivo* and *in vitro* models have exhibited different anticonvulsant properties and antiepileptic effects of KD. These aspects have been studied primarily in models of non-epileptic rodents receiving a KD and later exposed to proconvulsant agents or electrical stimuli (18). However, the levels of therapeutic KB and specific effects of each ketone body are not clear in the literature.

In 2003, Likhodii et al (27) administered intraperitoneal injection of acute acetone in rats in increasing doses from 2 to 32 mmol/kg. These authors observed an increase in the protective effect of seizures as the dose increased in four different models: maximal electroshock, subcutaneous pentylenetetrazol, amygdala kindling, and AY-9944 (27). Posteriorly, Gaisor et al (26) showed similar results administering acetone (1-32 mmol/kg) to juvenile mice and protecting them against induced-seizures with pentylenetetrazol and 4-aminopyridine. However, acetone doses $\geq$ 10 mmol/kg promoted toxic effects in the pentylenetetrazol model generating motor impairment in mice.

2.1 Modulation of neurotransmitters

The major mechanisms proposed to explain such increased inhibition and/or decreased excitation induced by KD include the presence of neurotransmitters (GABA and glutamate) (28). KB act not only as energy source, but also contribute to reduce glucose consumption in the brain by modulating the action of neurotransmitters (29).

Changes in the levels of glutamate and GABA, the major excitatory and inhibitory neurotransmitters, respectively and their receptors have been proposed as a possible mechanism of action of KD (30). GABA is an intermediate of α-ketoglutarate, which is synthesized in the Krebs cycle (via glutamate) and converted into GABA by glutamate decarboxylase (21). Moreover, KB inhibit glutamate decarboxylase and its decrease stimulates the synthesis of GABA, thus contributing to seizure control (31).

In previous experimental studies, the authors used animals fed KD and reported a higher concentration of β-hydroxybutyrate in the forebrain and cerebellum, indicating increased GABA levels (32). Astrocytes and neuroglia cells, which are also enriched with the enzyme in the ketone metabolism, utilize KB as energy source (23,33). Suzuki et al (33), suggested that inhibition of GABA-transaminase mRNA expression was mainly dependent on ß-hydroxybutyrate in astrocytes [after] inducing increased GABA levels in the brain (33). This allows glutamate to be more available for GABA synthesis, favoring the hypothesis that β-hydroxybutyrate leads to inhibition of neuronal firing after recurrent neuronal activity (34).

Similar results were observed in a clinical study, in which GABA levels in responders were higher than in non-responders during KD (30). However, it was not evaluated whether the response was dependent on the levels of β-hydroxybutyrate.

Increased inhibition or decreased excitability, if sufficiently intense, may influence normal function of the brain, besides controlling seizures (28). In addition, high GABA levels

seem to stimulate chloride channel receptors, increasing the influx of negatively charged ions and consequently inducing neuronal hyperpolarization (32). This event is responsible for inhibiting activation of sodium and calcium channels, whose activity is required for neuronal excitation. KB possibly contribute to the activity of K_{ATP} channels, which present an activity-dependent opening, and could partly explain the reduction in the number of epileptic seizures (34).

Contrary to the high level of GABA, the glutamate-to-ketone ratio can modulate glutamate physiological functions through VGLUT, which are responsible for filling presynaptic vesicles with glutamate in a Cl^--dependent manner (35). An *in vitro* study showed that Cl^- is an allosteric activator of VGLUT, which are competitively inhibited by KB (more by acetoacetate than by β-hydroxybutyrate) (36).

2.2 Biogenic Monoamines

Modulation of biogenic monoamines levels was proposed as a plausible mechanism to explain the anticonvulsant effect of KD. However, the specific mechanisms of such action remain unclear (17,19,37,38).

In animal models, norepinephrine levels increase in rats receiving KD (37). This beneficial effect of KD was not observed when the norepinephrine transport was inhibited, suggesting that the noradrenergic system is required for the neuroprotective effects of KD to be expressed. A similar profile was observed in norepinephrine transporter knockout mice fed normal diet (38).

A clinical study on biogenic monoamines in the cerebrospinal fluid of children treated with KD, showed that the dopamine and serotonin levels were significantly reduced [from 410 to 342 and from 158 to 137 nmol/L (16.6 and 13.3% reduction), respectively] after a 3-month treatment, while the norepinephrine levels [from 51.7 to 51.0 nmol/L (1.4% reduction)],

remained unchanged (19). These authors proposed that changes in monoamine levels are also associated with children who are respondent or non-respondent to KD.

Some authors consider adenosine as the major seizure inhibitory neuromodulator and KD exerts a regulatory role in relation to this monoamine (39). This hypothesis was reinforced by Fedele et al (40) who used transgenic mice for adenosine A_1 receptors (A_1Rs) and showed spontaneous hippocampal electrographic seizures due to overexpression of adenosine. Recently, the positive impact of KD was assessed in transgenic mice with or without adenosine A_1Rs. In mice with A_1Rs and fed KD, seizures were nearly abolished after four weeks of treatment. On the contrary, this effect was not observed in mice lacking these receptors (41).

Thus, KD increases the levels of adenosine. However the efficiency of KD in the control of seizures dependes on expression of A_1Rs (39).

2.3 Neuroprotective mechanisms

Many studies have shown that the epileptogenic state involves complex molecular pathways in which oxidative stress and mitochondrial dysfunction could exert important role in neuronal programmed/controlled (apoptosis) or uncontrolled/passive (necrosis) cell/death (42). Thus, investigators have given particular emphasis to the modulation of mitochondrial biogenesis of neurons by the KD and caloric restriction highlighting the neuroprotective role of mitochondria as the primary key to the control of apoptosis and cell death (43,44,45,46,47,48).

Mitochondria are intracellular organelles whose primary function is the production of cellular energy in the form of adenosine triphosphate (ATP). This nucleotide is produced by the mitochondrial respiratory chain through oxidative phosphorylation, which is performed by five multienzyme complexes (Complexes I-V). Dysfunction of Complex I may lead to a decreased ATP production commonly observed in neuronal diseases (42,49). In prolonged-seizures, a temporary reduction in the ATP levels can contribute to cell death (50).

In the experimental study of Bought et al (43), mice fed KD for at least 3 weeks showed a 46% increase in hippocampal biogenesis of mitochondria as compared with control animals. In addition, these authors observed that 39 of 42 regulated transcripts encoding mitochondrial proteins were up-regulated, implying an increased ATP production and capacity of stabilizing neuronal membrane potential (43).

Mitochondria is the major pathway able to reduce O_2 to non-oxidative substances. However, when the mitochondrial respiratory chain is deregulated (dysfunction on calcium homeostasis, balance of membrane potential), decrease in ATP generation and overproduction of reactive oxygen species (ROS) occurs (49,51). In normal conditions, 1-5% of O_2 in the mitochondrial electron transport chain is not reduced to H_2O, CO_2 and ATP, stimulating generation of ROS [H_2O_2, $O_2^{\bullet -}$, nitric oxide (NO) and peroxinitrite] (52).

Regarding coupled changes in ROS production, other authors (44) observed that rats KD-fed for 10 to 12 days showed significant increases in uncoupling proteins (UCPs) in hippocampal mitochondria. This response was related to the 15% decrease in ROS in the hippocampus of these animals (44). Both effects were associated with mitochondrial biogenesis and maintenance of calcium homeostasis (43,44).

The protective effect of KD on the oxidative stress was also observed in the antioxidant system, and especially glutathione (GSH) that showed an increased capacity of peroxide detoxification within the cell (47). In juvenile rats KD-fed for 3 weeks it was observed an increase in the levels of mitochondrial reduced glutathione (GSH) and the ratio between GSH and oxidized glutathione (GSSG) suggesting that KD improves hippocampal redox status and protects mitochondrial DNA from oxidative stress. During seizures, these antioxidants are depleted and oxidative stress is stimulated (45).

Recently, some studies (46,48) overviewed these mechanisms emphasizing that the effect of caloric restriction is associated with KD. In addition to the increased levels of UCPs

and decreased production of ROS, these authors also reported other mechanisms involved in the control of seizures: decrease in both insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and the mammalian target of rapamycin (mTOR) and increase in both sirtuins and adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK).

Sirtuins are deacetylases with multiple functions related to fat oxidation and increased mitochondrial size and number. Increased expression of sirtuins may be associated with inhibition of IGF-1 after calorie restriction (46,48). In addition, increase in AMPK directly implies in the capacity of production of ATP (48).

The mTOR protein kinase show multiple and complex actions in the body, that participates in specific mechanisms in the nervous system, being an exciting target for new horizons in drug discovery (53). Brain abnormalities are associated with hyperactivation of the mTOR pathway, and KD may have an important action in inhibiting the mTOR pathway thus producing anticonvulsant effects. However, this mechanism is still unknown and needs to be better explored (48,53).

It is important to recognize that seizures stimulate the production of free radicals and the mitochondrial dysfunction results in a chronic redox state with production of neuronal changes and increased susceptibility to seizures that lead to epilepsy (42). As a result, KD improves stability of the mitochondrial membrane, increases the efficiency of O_2 consumption, stimulating generation of ATP, and minimizing the oxidative stress-induced epileptogenic state and mitochondrial dysfunction.

3. Future Perspectives

Regarding the studies mentioned above, we verified that the mechanisms of action of KB involved in reduction of epileptic seizures are distinct and complex. In addition, the major mechanisms proposed so far are based on experimental models and few clinical studies, which have a reduced number of patients and uncontrolled design. Furthermore, the multiple etiologies of epilepsy are an important limitation to understand the relationship between KD, KB, and neuronal mechanisms of control of seizures. With this background, we propose that: I - physical or chemical mechanisms employed to induce seizures follow standardized protocols; II - more physiological levels of KB are used in experimental treatment; III - the etiology of epilepsy is better characterized in clinical trials; IV - biomarker of treatment efficacy (levels of KB, GABA, and monoamines) is evaluated; V - potential side effects of treatments are systematically monitored; and VI - new mechanisms of action of KB are evaluated. Even taking these points in account, the positive clinical response to KD remain the principal advocate of this treatment. Thus, given the current state of the art, we also propose that KD intervention should be early included in clinical protocols for treatment of children and adolescents with refractory epilepsy, not only as the last therapeutic option.

5. Conflicts of interest

The authors of this study have no conflict of interest to declare.

6. Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support from the State of Sao Paulo Research Foundation (FAPESP # 12/03775-0), National Institute for Science and Technology of Complex Fluids (INCT-FCx-USP), and Group for Research on Complex Fluids (NAP-FCx-USP).

7. References

1. Kossoff EH, Zupec-Kania BA, Amark PE, Ballaban-Gil KR, Christina Bergqvist A, Blackford R, et al., Optimal clinical management of children receiving the ketogenic diet: recommendations of the International Ketogenic Diet Study Group. Epilepsia 2009;50(2):304-17.
2. Cendes F. Progressive hippocampal and extrahippocampal atrophy in drug resistant epilepsy. Curr Opin Neurol. 2005;18(2):173-7.
3. Sutula TP, Hagen J, Pitkänen A. Do epileptic seizures damage the brain? Curr Opin Neurol. 2003;16(2):189-95.
4. Wang H, Lin K. Ketogenic diet: An early option for epilepsy treatment, instead of a last choice only. Biomedical Journal 2013;36(1):16.
5. Wilder R. The effect of ketonemia on the course of epilepsy. Mayo Clinic Bulletin 1921;2:307.
6. Neal EG, Chaffe H, Schwartz RH, Lawson MS, Edwards N, Fitzsimmons G, et al., The ketogenic diet for the treatment of childhood epilepsy: a randomised controlled trial. Lancet Neurology 2008;7(6):500-6.
7. De Kinderen RJ, Lambrechts DA, Postulart D, Kessels AG, Hendriksen JG, Aldenkamp AP, et al., Research into the (Cost-) effectiveness of the ketogenic diet among children and adolescents with intractable epilepsy: design of a randomized controlled trial. BMC Neurology 2011;11(1):10.
8. Hirano Y, Oguni H, Shiota M, Nishikawa A, Osawa M. Ketogenic diet therapy can improve ACTH-resistant West syndrome in Japan. Brain Dev. 2014.

9. Pablos-Sánchez T, Oliveros-Leal L, Núñez-Enamorado N, Camacho-Salas A, Moreno-Villares JM, Simón-De las Heras R. The use of the ketogenic diet as treatment for refractory epilepsy in the paediatric age. Rev Neurol. 2014;58(2):55-62.
10. Lee PR, Kossoff EH. Dietary treatments for epilepsy: management guidelines for the general practitioner. Epilepsy & Behavior. 2011;21(2):115-21.
11. Sharma S, Jain P. The Modified Atkins Diet in Refractory Epilepsy. Epilepsy Res Treat. 2014;2014:404202.
12. Kossoff EH. More fat and fewer seizures: dietary therapies for epilepsy. Lancet Neurol. 2004;3(7):415-20.
13. Sharma S, Jain P, Gulati S, Sankhyan N, Agarwala A. Use of the Modified Atkins Diet in Lennox Gastaut Syndrome. J Child Neurol. 2014.
14. Kossoff EH, Bosarge JL, Miranda MJ, Wiemer-Kruel A, Kang HC, Kim HD. Will seizure control improve by switching from the modified Atkins diet to the traditional ketogenic diet? Epilepsia. 2010;51(12):2496-9.
15. Ramm-Pettersen A, Nakken KO, Haavardsholm KC, Selmer KK. Occurrence of GLUT1 deficiency syndrome in patients treated with ketogenic diet. Epilepsy Behav. 2014;32:76-8.
16. Kim DW, Kang HC, Park JC, Kim HD. Benefits of the nonfasting ketogenic diet compared with the initial fasting ketogenic diet. Pediatrics. 2004;114(6):1627-30.
17. Masino SA, Rho JM. Mechanisms of ketogenic diet action. In: Noebls JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, editors. Jasper´s Basic Mechanisms of the Epilepsies. 4th edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012.
18. Freeman JM, Kossoff EH, Hartman AL. The ketogenic diet: one decade later. Pediatrics. 2007;119(3):535-43.

19. Dahlin M, Månsson J-E, Åmark P. CSF levels of dopamine and serotonin, but not norepinephrine, metabolites are influenced by the ketogenic diet in children with epilepsy. Epilepsy Research. 2012;99(1):132-8.
20. Kossoff EH, Hartman AL. Ketogenic diets: new advances for metabolism-based therapies. Current Opinion in Neurology. 2012;25(2):173-8.
21. MCNally MA, Hartman AL. Ketone bodies in epilepsy. Journal of Neurochemistry. 2012;121(1):28-35.
22. Prins ML. Cerebral metabolic adaptation and ketone metabolism after brain injury. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. 2008;28(1):1-16.
23. Klein P, Janousek J, Barber A, Weissberger R. Ketogenic diet treatment in adults with refractory epilepsy. Epilepsy Behav. 2010;19(4):575-79.
24. Fisher RS. Animal models of the epilepsies. Brain Res Brain Res Rev. 1989;14(3):245-78.
25. Löscher W. Animal models of intractable epilepsy. Prog Neurobiol. 1997;53(2):239-58.
26. Gasior M, French A, Joy MT, Tang RS, Hartman AL, Rogawski MA. The anticonvulsant activity of acetone, the major ketone body in the ketogenic diet, is not dependent on its metabolites acetol, 1, 2-propanediol, methylglyoxal, or pyruvic acid. Epilepsia. 2007;48(4):793-800.
27. Likhodii SS, Serbanescu I, Cortez MA, Murphy P, Snead OC, Burnham WM. Anticonvulsant properties of acetone, a brain ketone elevated by the ketogenic diet. Annals of Neurology. 2003;54(2):219-26
28. Ruskin DN, Masino SA. The nervous system and metabolic dysregulation: emerging evidence converges on ketogenic diet therapy. Front Neurosci. 2012; 6:33.
29. LaManna JC, Salem N, Puchowicz M, Erokwu B, Koppaka S, Flask C, Lee Z. Ketones suppress brain glucose consumption. Adv Experimental Medicine and Biology. 2009;645:301-6.

30. Dahlin M, Elfving Å, Ungerstedt U, Åmark P. The ketogenic diet influences the levels of excitatory and inhibitory amino acids in the CSF in children with refractory epilepsy. Epilepsy Research. 2005;64(3):115-25.

31. Neal E, Cross J. Efficacy of dietary treatments for epilepsy. Journal of Human Nutrition and Dietetics. 2010;23(2):113-9.

32. Yudkoff M, Daikhin Y, Nissim I, Lazarow A, Nissim I. Brain amino acid metabolism and ketosis. Journal of Neuroscience Research. 2001;66(2):272-81.

33. Suzuki Y, Takahashi H, Fukuda M, Hino H, Kobayashi K, Tanaka J, et al., β-hydroxybutyrate alters GABA-transaminase activity in cultured astrocytes. Brain Research. 2009; 1268(1):17-23.

34. Tanner GR, Lutas A, Martínez-François JR, Yellen G. Single KATP channel opening in response to action potential firing in mouse dentate granule neurons. The Journal of Neuroscience. 2011;31(23):8689-96.

35. Omote H, Miyaji T, Juge N, Moriyama Y. Vesicular neurotransmitter transporter: bioenergetics and regulation of glutamate transport. Biochemistry. 2011;50(25):5558-65.

36. Juge N, Gray JA, Omote H, Miyaji T, Inoue T, Hara C, et al., Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. Neuron. 2010;68(1):99-112.

37. Weinshenker D. The contribution of norepinephrine and orexigenic neuropeptides to the anticonvulsant effect of the ketogenic diet. Epilepsia. 2008;49(s8):104-7.

38. Martillotti J, Weinshenker D, Liles LC, Eagles DA. A ketogenic diet and knockout of the norepinephrine transporter both reduce seizure severity in mice. Epilepsy Research. 2006;68(3):207-11.

39. Masino SA, Kawamura M, Wasser CD, Pomeroy LT, Ruskin DN. Adenosine, ketogenic diet and epilepsy: the emerging therapeutic relationship between metabolism and brain activity. Curr Neuropharmacol. 2009;7(3)257-68.

40. Fedele DE, Gouder N, Güttinger M, Gabernet L, Scheurer L, Rülicke T, et al., Astrogliosis in epilepsy leads to overexpression of adenosine kinase, resulting in seizure aggravation. Brain. 2005;128(10):2383-95.

41. Masino SA, Li T, Theofilas P, Sandau US, Ruskin DN, Fredholm BB, et al., A ketogenic diet suppresses seizures in mice through adenosine A1 receptors. J Clin Invest. 2011;121(7):2679-83.

42. Chuang YC. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in seizure-induced neuronal cell death. Acta Neurol Taiwan. 2010;19(1):3-15.

43. Bough KJ, Wetherington J, Hassel B, Pare JF, Gawryluk JW, Greene JG, et al., Mitochondrial biogenesis in the anticonvulsant mechanism of the ketogenic diet. Annals of Neurology. 2006;60(2):223-35

44. Sullivan PG, Rippy NA, Dorenbos K, Concepcion RC, Agarwal AK, Rho JM. The ketogenic diet increases mitochondrial uncoupling protein levels and activity. Annals of Neurology. 2004;55(4):576-80

45. Jarrett SG, Milder JB, Liang LP, Patel M. The ketogenic diet increases mitochondrial glutathione levels. J Neurochem. 2008;106(3):1044-51.

46. Maalouf M, Rho JM, Mattson MP. The neuroprotective properties of calorie restriction, the ketogenic diet, and ketone bodies. Brain Research Reviews. 2009;59(2):293-315.

47. Milder J, Patel M. Modulation of oxidative stress and mitochondrial function by the ketogenic diet. Epilepsy Research. 2012;100(3):295-303.

48. Yuen AW, Sander JW. Rationale for using intermittent calorie restriction as a dietary treatment for drug resistant epilepsy. Epilepsy Behav. 2014;33C:110-4.

49. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. Free Radic Biol Med. 2000;29(3-4):222-30.

50. Chuang YC, Lin JW, Chen SD, Lin TK, Liou CW, Lu CH, et al., Preservation of mitochondrial integrity and energy metabolism during experimental status epilepticus

leads to neuronal apoptotic cell death in the hippocampus of the rat. Seizure. 2009;18(6):420-8.

51. Patel M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. Free Radic Biol Med. 2004;37(12):1951-62.
52. Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. Drugs Aging. 2001;18(9):685-716.
53. Maiese K, Chong ZZ, Shang YC, Wang S. mTOR: on target for novel therapeutic strategies in the nervous system. Trends Mol Med. 2013;19(1):51-60.

Table 1 – Neuroprotective effects of ketone bodies (KB).

Species	Injury models	Intervention times	Treatment	Effect on seizures	Mechanisms	References
Rats	Maximal electroshock or subcutaneous pentylenetetrazol or amygdala kindling or AY-9944	1- 6 days	Acetone injection	↓	Anticonvulsant effect of acetone[a]	27
Mice	Pentylenetetrazol, 4-aminopyridine	15-240 min	Acetone injection	↓	Anticonvulsant effect of acetone[a]	26
Mice	-	3 days	KD	Not rated	↑ GABA	32
Rats (culture astrocytes)	-	5 days	β-hidroxybutyrate	Not rated	↓ GABA-transaminase mRNA	33
Humans (children with refractory epilepsy)	-	3-6 months	KD	↓	↑ GABA	30
Rats (hippocampal slice)	Antidromic stimulation	40 min	β-hidroxybutyrate	↓	↑ K_{ATP} Channels	34
Rats	-	3 weeks	KD	↓	↑ Brain KB and ↓ uptake glucose	29
In vitro (Proteolipossomes)	-	n.d.	Acetoacetate	Not rated	↓ Glutamate	36
Mice (Norepinephrine transporter knockouts)	Maximal electroshock	n.d.	KD	↓	↑ Norepinephrine[b]	38
Humans (children with refractory epilepsy)	-	3 months	KD	↓	↓ Dopamine and Serotonin	19
Mice (adenosine deficiency)	Kainic acid	4-6 weeks	No therapy	↑	↓ Adenosine	40
Mice (transgenic models)	-	3 weeks	KD	↓	↑ A_1R	41
Mice (hippocampal slice)	-	3 weeks	KD	↓	↑ Number of mitochondrial	43
Mice (hippocampal mitochondria)	-	10-12 days	KD	Not rated	↑ UCP levels and ↓ ROS	44
Rats (hippocampal mitochondria)	-	3 weeks	KD	Not rated	↑GSH and ↓ mitochondrial H_2O_2	45

Abbreviations: GSH: glutathione; KD: Ketogenic diet, ROS: reactive oxygen species; UCP: uncoupling protein; -: without stimulating substance of seizure; n.d.: not described;[a]: very high doses of acetone may contribute to motor impairment; [b]: Norepinephrine transporter knockout mice and mice fed a KD had a similar reduction in seizure severity.

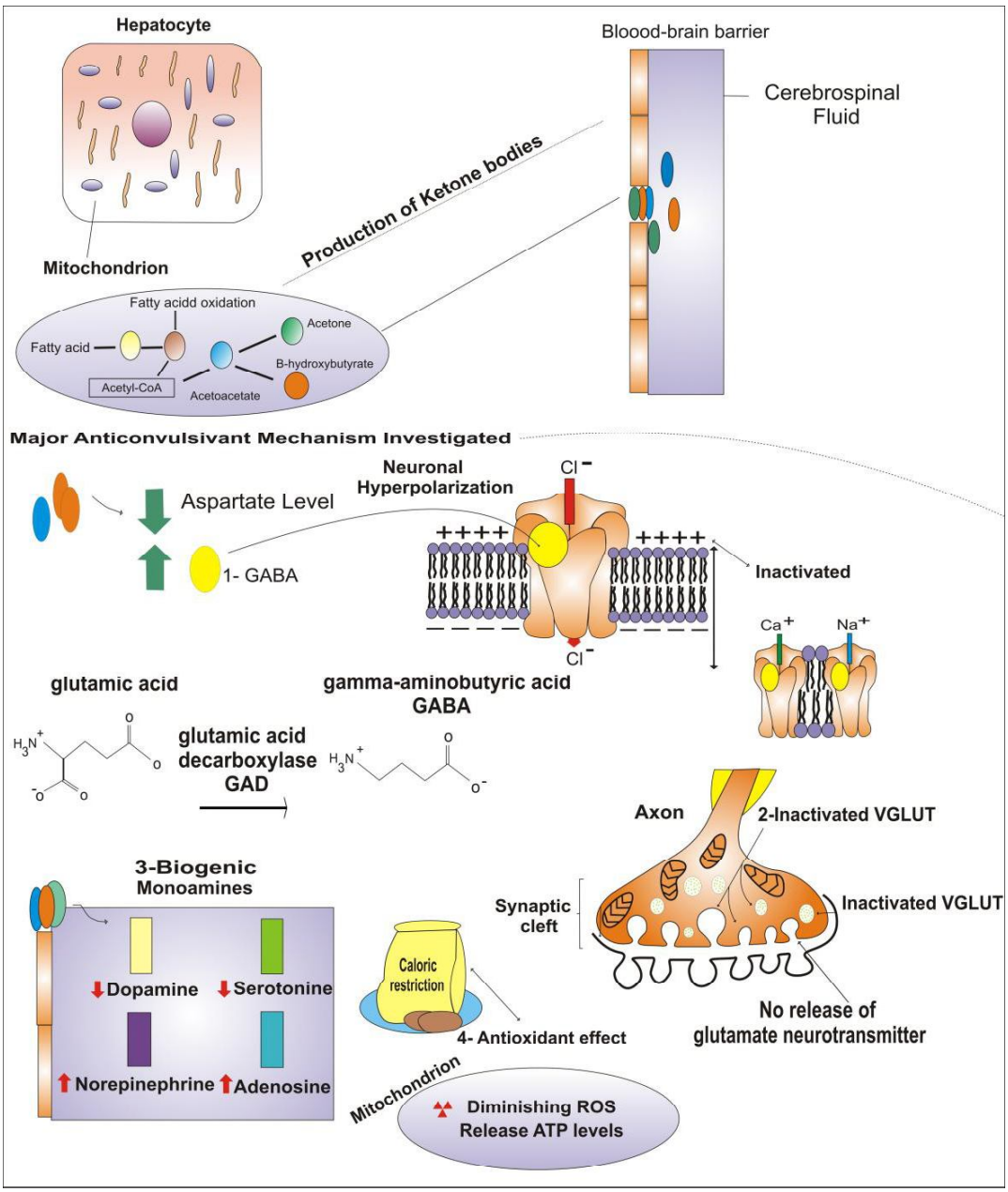


Figure 1 Production of ketone bodies (KB) and major possible anticonvulsant mechanism: (1) GABA neurotransmitter (neuronal hyperpolarization and membrane channels; (2) Inactivation of VGLUT and inhibition of glutamate neurotransmitter; (3) Modified concentration of biogenic monoamines; and (4) Antioxidant mechanism: diminishing reactive oxygen species (ROS). For more information, please see text.

Anexo 9 – Manuscrito 2: submetido ao periódico Epilepsia

REVIEW

Impact of the ketogenic diet on lipids and oxidative changes in lipoproteins of epileptic children: questions not answered

[a]Patricia Azevedo de Lima, [b]Leticia Pereira de Brito Sampaio, [c]Nágila Raquel Teixeira Damasceno[*]

[a] *Post-Graduate Program in Applied Human Nutrition, University of Sao Paulo; Av. Prof. Lineu Prestes, 580; 05508-000, Sao Paulo, SP, Brazil*

[b] *Department of Nutrition, School of Public Health, University of Sao Paulo; Av. Dr. Arnaldo, 715; 01246-904, Sao Paulo, SP, Brazil*

[c] *Children's Institute, Hospital of Clinics, School of Medicine, University of Sao Paulo; Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, 647; 05403-000, Sao Paulo, SP, Brazil*

* Corresponding author:

Nágila Raquel Teixeira Damasceno

Department of Nutrition, School of Public Health, University of São Paulo; Av Dr Arnaldo, 715; 01246-904, Sao Paulo, SP, Brazil; Phone number: +55(11) 3061-7865; Fax number: +55(11) 3061-7130;E-mail: nagila@usp.br

Running title: impact of ketogenic diet on lipoproteins

SUMMARY

Objective: Ketogenic diet (KD) is an important therapy used in the control of drug-refractory seizures. The major goal of this review is to update the knowledge about the adverse effects of the KD on lipoproteins, contributing to answer these questions: (1) What are the main changes in the lipid profile? (2) What aspects and risks that may be associated with this change? (3) Is the KD associated with increased cardiometabolic risk? **Methods**: Articles about effect of the KD on plasma lipoproteins of children and adolescents with refractory epilepsy published in the last 15 years and indexed in the PubMed and MedLine databases were included. **Results**: Although the differences between studies limiting comparisons related changes in lipoprotein profile, dyslipidemia was recurrent in children and adolescents treated with KD. Evidences show that the hypercholesterolemia promotes structural modifications in LDL particles that possibly favor oxidation processes and contribute to changes of size of lipoproteins particularly related with small and denser low-density lipoprotein. However, oxidative modifications in LDL of children under KD are not described in the literature. **Significance**: The positive effects of KD for health of children and adolescents with refractory epilepsy are unquestionable. Conversely, this positive role is associated to significant and negative changes in lipid metabolism possibly related with oxidative reactions and unbalance of antioxidants that can contribute to increased cardiometabolic risk. Therefore, this review invites clinicians and researchers to investigate lipid and oxidative metabolism in their clinical practice and trials, respectively.

KEY WORDS: Fat diet, Refractory epilepsy, Lipid metabolism, Dyslipidemia, Oxidative stress.

Abbreviations: ApoB: apolipoprotein B; ATP: adenosine triphosphate; GABA: γ-aminobutyric acid; HDL: high-density lipoprotein; KB: ketone bodies; KD: ketogenic diet; LCT: long-chain triglycerides; LDL: low-density lipoprotein; MCT: medium-chain triglycerides; MCAT: monocarboxylic-acid transporters; LDLox: oxidized LDL; ROS: reactive oxygen species; RNS: reactive nitrogen species; TC: total cholesterol; TG: triglycerides.

INTRODUCTION

Epilepsy is a brain disorder of multiple etiologies, being characterized by the presence of seizures.[1]Prevalence of epilepsy in the general population is in the range from 0.27-1.7%.[2]

Most individuals who develop epilepsy will response to pharmacologic treatment with antiepileptic drugs. However, 20-30% of children affected by epilepsy have seizures that are refractory to these drugs.[3]In this context, ketogenic diet (KD) represents an important and efficient tool, able to reduce seizure events.

The KD was developed in 1920 by Wilder,[4] and represents a non-pharmacological treatment prescribed specifically for children and adolescents with epilepsy refractory to at least two first-line drugs.[3]Many studies have shown the benefits of KD, with over 50% reduction in seizures, which is considered clinically relevant.[5,6]

In evidence of positive results, the average time of treatment with KD is 2 years, and it should be discontinued after this period. Risks and benefits should be assessed if the decision is to maintain the treatment for a longer period.[3] Recently, Wang and Lin[7]proposed KD as an early option instead of last therapy in the treatment of epilepsy.

Composition of the KD is based on high-fat, low-carbohydrate, and moderate-protein components, and oxidation of fat is the primary source of metabolic energy. Consequently, fat is responsible for the production of ketone bodies (KB), which appear to be involved in the mechanisms of therapeutic control of crises.[8]

The classic KD, first described by Wilder[4] and more traditionally used in treatment, provides long-chain triglycerides (LCT) as source of fat.[4,9] Data from 20 years of studies suggest that there is no difference in efficacy between KD and medium-chain triglyceride diet.[3] However, supplementation of the KD with medium-chain triglycerides (MCT) has been used in some cases, being considered more ketogenic and allowing a greater supply of carbohydrates and protein.[10]

Introduction of KD following specific requirements (ratio of fat to carbohydrate and protein) and control of seizures usually occur when these ratios are 3:1 or 4:1, the proportion most commonly used. Diets containing lower proportions (2:1) are normally used when the treatment is introduced.[8]In the traditional method, ketosis by the KD is induced by fasting for 12-48 h.[3]However, recent studies show that previous fasting to induce ketosis it is not necessary. It can be initiated in an outpatient setting using a smaller fat proportion (2:1), and the ketosis response lead to an increase in the fat proportion (3:1 or 4:1).[11]

Although adverse effects of the KD rarely justify discontinuing the diet, it is important for neurologists and pediatricians to identify and monitor such events. Usually, KD is well tolerated and major systemic complications are associated with growth retardation, nephrolithiasis, and hyperlipidemia. Probably, hyperlipidemia is the most common adverse effect of KD described in the literature.[12] However, other lipid and oxidative changes are scarcely observed in researches and clinical practice. Regarding this background, the major goal of this review is to update the knowledge about the adverse effects of the KD on lipoproteins. We also discuss the likely role of the diet on changes in the oxidative and physical characteristics of lipoparticles. Therefore, we systematically selected articles published in the last 15 years, indexed in the PubMed and MedLine databases, in which the effect of the KD on plasma lipoproteins of children and adolescents with refractory epilepsy was evaluated for at least three months. Research was performed for refractory epilepsy, children, adolescents, ketogenic diet, lipid metabolism, oxidative reactions and their associations. Evidences were critically analyzed by experts group.

EFFECTS OF KETOGENIC DIET ON PLASMA LIPID LEVELS

In general, KD is accepted as a safe therapy, whose adverse effects are light or temporary. In this context, dyslipidemia is probably the major change observed in children

submitted to KD.[12] Although this event is widely observed in clinical practice, there are few studies describing the mechanism involved. Regarding the criteria used in this review, seven original articles were evaluated: six with follow up for three months or more and one after discontinuing the diet. An additional article was considered, but it was excluded due to the low quality of data.

Adverse effects of the KD in children were reported by Kwiterovich et al.,[40] in a prospective study with a follow up of 2 years. After 6 months, children showed an increase in the levels of plasma triglycerides (TG; 60.4%), total cholesterol(TC; 33.3%), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C; 48.0%),very low-density lipoprotein (VLDL-C; 47.0%), and apolipoprotein B (ApoB; 57.0%), and a decrease in the level of cholesterol associated with high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C; 12.5%). After 12 and 24 months under KD therapy, the levels of CT, LDL-C, and TG, but not HDL-C, remained higher than those at the baseline time point. However, these levels were lower than those observed at 6 months after KD was initiated. This profile indicates a possible return to the basal lipid levels.

Groesbeck et al.,[41] established an adequate cut-off point to plasma TC (300 mg/dL) for 26 children who received KD and two other children who received the Atkins diet (both for at least 6 y). Regarding these values, only two children showed high levels for TC (355 and 383 mg/dL). It should be remembered that adequate values of TC for children and adolescents, as proposed by the American Heart Association, are lower than 200 mg/dL (AHA, 2005). An increase in the values for TC (12.9%), LDL-C (25.2%), HDL-C (3.8%), and apolipoprotein A-I (Apo A-I; 41.4%) was observed when the lipid profile for the other 24 children was evaluated at baseline time. In addition, a decrease was observed in the levels of TG (19.2%).

Liu et al.,[9] compared the changes in the lipid profile of children after 4 months receiving the classic KD *versus* the medium-chain triglyceride (MCT) KD. An increase in the levels for LDL-C (34.8%) and TC (24.4%) was found in patients who received classic KD, but no

significant change was found in those who received MCT-KD. Posteriorly, Tumas et al.,[43] described similar results.

The MCT are rapidly absorbed into the portal circulation, being metabolized much faster than LCT. Therefore, MCT are more ketogenic than LCT. Huttenlocher et al.,[44] initiated the KD using MCT as an alternative fat source. However, three limitations contributed to reduce its application in clinical practice: (I) the negative interaction between the anti-epileptic drug (valproate)and increases the risk of liver failure; (II) low gastrointestinal tolerance requires a long time to establish the ketosis status; and (III) MCT are very expensive.

Recently, another study[45] identified 12 children (7.5%) with hyperlipidemia in a sample composed of 160 children who had refractory epilepsy. These children received KD containing very-low saturated fat (10-11% of daily caloric intake) and low dietary cholesterol (< 80 mg/day), without addition of *trans*-fatty acids, while children with hypertriglyceridemia received optimized polyunsaturated and monounsaturated fat, with supplementation of omega-3. The low prevalence of dyslipidemia observed in this study suggests that adverse effects linked to high-fat diet can be controlled by the quality of fat used in KD.

The long-term effects of the KD on lipoprotein metabolism, if any, are unclear. However, some authors state that patients maintained on KD for more than 2 years display a lipid profile similar to that observed at the baseline time when they return to a normal diet.[12]

Recommendations of the International Ketogenic Diet Study Group[3] identified the major adverse effects of the KD: hyperuricemia (2-26%), hypocalcaemia (2%), hypomagnesemia (5%), decreased amino acid levels and acidosis (2-5%), and gastrointestinal symptoms (including vomiting, constipation, diarrhea, and abdominal pain) occur in 12-50% of children, but prevalence of hypercholesterolemia (14-59%) remain the major adverse effect of KD.[40,42] Other guidelines for dietary treatment of epilepsy recommend that fat composition be changed, increasing the polyunsaturated fatty acids, when KD promotes dyslipidemia.[8]

Table 1 summarizes the studies in which the lipid profile was monitored in children undergoing KD. It is remarkable that there was an early- and possibly a later-onset increase in the TC and LDL-C, independent of the intervention time. Although our goal is to establish a comparison between different studies, we recognize that this analysis shows some limitations: the studies show (I) different designs; (II) different diet composition, not always described; (III) different cut-off points for dyslipidemia; (IV) usually very small sample sizes; (V) lipid profile poorly described, and (VI) different times of intervention. Regarding this scenario, evaluation of the possible negative effects of KD on lipid metabolism remains an unanswered question for the actual and future cardiovascular health of children under KD.

POTENTIAL EFFECT OF KETOGENIC DIET ON OXIDATIVE CHANGES OF LIPOPROTEINS

It is widely accepted that dyslipidemia (high LDL-C and low HDL-C) is an important cardiovascular risk factor and a surrogate for atherosclerosis development.[46-48] However, it has not been established whether typical short-term use of KD in children leads to a later increased risk of atherosclerosis. A previous study showed that 20-30% of children present hypercholesterolemia at the time of KD initiation.[40,49] This prevalence increases to 60% during follow-up time periods. Age and the fatty acids: ketone bodies ratio does not influence the prevalence of dyslipidemia, but gender and solid-food consumption are associated with high hypercholesterolemia.[49]In addition, the potential cardiovascular risk of children with hypercholesterolemia ishigh.[50]Therefore, children or adolescents fed KD are likely to have a higher cardiovascular risk in comparison with non-epileptic children not fed the diet. Similarly to what was observed in the above studies, our group has also observed increased dyslipidemia. It was especially attributed to an increase in the levels for LDL-C (59% of children and adolescents after a 3-month follow-up period with a cutoff point ≥ 130mg/dL). Therefore, we

recommend that all children under KD be monitored and their lipoproteins manipulated as a function of their response to KD. Recently, Liu et al., (2013)[45] found that substitution of saturated fat for polyunsaturated and monounsaturated fats (including omega-3 fatty acids) during the KD promoted normalization of lipid levels in children with pre-existing dyslipidemia.

In addition to the lipid hypothesis of atherosclerosis, the classical study of Brown and Goldstein[51] showed that oxidized LDL (LDLox) plays a fundamental role in the initiation and progression of atherosclerosis. In this context, Steinberg[46] demonstrated that a concentration of native LDL is40-fold higher than that of LDLox was required to induce foam cell formation. The LDLox particles exhibit a wide array of biological properties: they are cytotoxic for endothelial cells cultured in serum-free medium, induce apoptosis, stimulate a wide variety of proinflammatory cytokines in macrophages, and expression and release of the monocyte chemo attractant protein-1 from endothelial cells, and inhibit release and/or function of nitric oxide.[46]Therefore, the lipid oxidation mechanisms constitute the synergistic hypothesis, in which circulating LDL particles can accumulate in the intima. There, ApoB-100 binds to proteoglycans in the membrane extracellular matrix through electrostatic interaction, an important initiating factor in early atherogenesis. As a consequence of this subendothelial retention, LDL particles are trapped in the intima, where they are prone to oxidative modification. This process induces generation of foam cells, fatty streaks, and later atherosclerotic lesions.[48,52] In addition to atherosclerosis, oxidative stress has been shown to be a component of neurodegenerative disorders, such as Parkinson and Alzheimer diseases, and multiple and amyotrophic lateral sclerosis.[22] Recently, electronegative LDL [LDL(-)], a modified subfraction of LDL, has been detected in chronic disease, and increase in this subfraction is linked to inflammation and oxidative stress (for a review, see reference 53).

Furthermore, it is widely accepted that hypercholesterolemia promotes structural modifications in LDL particles that possibly favor oxidation processes in this lipoprotein.[52]

However, oxidative modifications in LDL of children under KD are not described in the literature. In physiologic conditions, low levels of ROS (less than 5% of molecular oxygen escape to complete reduction) are generated in mitochondria by the electron transport chain (ETC). The ROS and non-ROS are collectively represented by hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$), hydroxyl radical ($^{\bullet}OH$), and reactive nitrogen species (RNS), such as nitric oxide and its product peroxynitrite ($ONOO^-$) anion, which inhibits mitochondrial metabolism, promoting neuronal excitotoxicity and neuroinflammation.[35]

Epilepsy and, particularly, uncontrolled seizures promote mitochondrial dysfunction associated with toxicity of ROS/RNS in mitochondria. Gardner and Fridovich[54] described that status epilepticus (SE) is linked to inactivation of aconitase, a potential hall marker for increased production of intracellular singlet oxygen. Furthermore, KB are associated with an increased production of glutathione. This profile was improved by overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase (MnSOD), suggesting a possible response to maintain a redox balance between the oxidant and antioxidant defenses.[55]

In epilepsy, monitoring of oxidative stress and its relationship with clinical prognosis or development of morbidities (cardiovascular diseases) in humans are not described in the literature. However, a paradoxical KD-induced ROS reduction as opposed to increased mitochondrial biogenesis has been widely accepted. Lipid peroxides (4-hydroxy-2-nonenal), ROS, and RNS are potent stimulants of transcription factors nuclear factor kappa B (NF-kB) and NF E2-related factor 2(Nrf_2). Studies in mice and rats show that KD improves hippocampus function, possibly by activation of uncoupling protein, increased reduced (GSH)/oxidized glutathione (GSSG) ratio, and other antioxidants (via activation of transcription of Nrf_2).[35] These events reinforce the concept of protective mechanisms of KD. On the other hand, our group has recently investigated the lipid peroxidation in 17 children under the classic KD and observed high plasma thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels (unpublished data). Contrarily, Nazarewich et al.,[56] investigated the short-term KD effects in young women

and showed increased levels of total antioxidant status (TAS), while catalase and SOD remained unchanged. It is likely that KD acts as antioxidant at the central nervous system, but induces oxidative stress in the blood, thus contributing to negative clinical prognosis.[57,58] In this context, Mohamed et al.,[59] attributed the neuroprotective action of KD to increased mitochondrial uncoupling protein (UCP), apolipoprotein E (the main protein related to cholesterol transporter in the brain), and caspase-3. The possible mechanisms related to KD, paradoxical systemic oxidative stress, and neuronal antioxidant protection are summarized in **Figure 2**.

Investigating the antioxidant or pro-oxidant effects of KB can be exciting because evidence from *in vivo* and *in vitro* studies is conflicting.[60]*In vitro*,[61] acetoacetate was able to quench the activity of singlet oxygen, hypochlorous acid (HOCl), and $ONOO^-$, whereas3-β-hydroxybutyrate was able to quench only the activity of hydroxyl radicals. In humans,[62] increased formation of $O_2^{\bullet-}$was associated to high levels of acetoacetate, suggesting that 3-β-hydroxybutyrate is a better antioxidant in both human and animal models.[60]

Recently, physical properties of lipoproteins have also been investigated and the results indicate that lipoprotein size can provide additional information to the classic lipid profile regarding individual cardiovascular risk.[63] Small dense LDL is more susceptible to oxidation and its generation is modulated by environmental and genetic factors in both adults and children.[64] Small dense LDL (identified as phenotype B) is related to an increased risk of cardiovascular disease.[65,66]

Physical properties of lipoproteins in children under KD are not described in the literature at the moment, and the few studies in adults are inconclusive as to whether diet confers increased or reduced size of lipoproteins.

In 2002,[67] the effects of a 6-week KD on fasting and postprandial serum biomarkers were examined in 20 normal-weight normolipidemic men. Fasting serum TC, LDL-C, and LDLox were unaffected, and HDL-C tended to increase with KD. In subjects with predominance of small LDL particles (phenotype B), significant increases in diameter and

percentage of LDL-1 (small denser LDL subfraction) were observed after KD. Therefore, it is reason able that children and adolescent under KD display a negative distribution of LDL subfractions.

Contrarily, another randomized study[68] evaluated the effect of KD on lipoprotein subfractions in an overweight and hyperlipidemic community of adult volunteers who were motivated to lose weight. Comparing baseline with 6-month KD, significant changes were found in LDL particle size (+2%), large (+54%), medium (-42%), and small (-78%), HDL particle size (+5%), and large HDL (+21%), indicating that KD can reduce cardiovascular risk.[68] We have recently evaluated the effect of KD on particle size of lipoprotein subfractions in children, regarding the absence of information on these parameters. From children and adolescents on KD for at least 3 months, we observed increase in LDL particle subfractions (LDL-2, LDL-3, and appearance of LDL-4), suggesting a sensitization to increased subfraction of LDL with atherogenic profile (unpublished data).

These findings suggest that the KD used as a treatment for refractory epilepsy can interfere not only in traditional biomarkers of lipid metabolism, but also in physical and oxidative characteristics of lipoproteins. Therefore, despite of unquestionable benefits of KD, it is critical for clinicians to evaluate more frequently lipid and oxidative metabolism of lipoproteins of children and adolescents under KD treatment.

4. FUTURE PERSPECTIVES

Regarding the background described in this review, we conclude that KD remains important primary and secondary tool during treatment of children with refractory epilepsy. The adverse effects of KD are scarcely described in the literature and the parameters studied up to now are limited to the traditional lipid profile. Oxidative and physical modifications of lipoproteins have not been investigated in children submitted to KD. We emphasize the growing

need to establish an international protocol to monitor the cardiovascular health of children undergoing KD, with focus on oxidative stress, physical properties of lipoproteins, and lipid profile.

5.DISCLOSURE

None of the authors has any conflict of interest to disclose.

6. ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the support from the State of Sao Paulo Research Foundation (FAPESP # 12/03775-0).

7. REFERENCES

[1] Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, et al., Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. Epilepsia 2010;51:676-685.

[2] Banerjee PN, Filippi D, Hauser WA. The descriptive epidemiology of epilepsy-a review. Epilepsy Res 2009;85(1):31-45.

[3] KOSSOFFf EH, Zupec-Kania BA, Amark PE, et al., Optimal clinical management of children receiving the ketogenic diet: recommendations of the International Ketogenic Diet Study Group. Epilepsia 2009;50(2):304-317.

[4] Wilder RM. The effects of ketonemia on the course of epilepsy. Mayo ClinProc 1921;2:307-308.

[5] Neal EG, Chaffe H, Schwartz RH, et al., The ketogenic diet for the treatment of childhood epilepsy: a randomised controlled trial. Lancet Neurol 2008;7(6):500-506.

[6] de Kinderen RJ, Lambrechts DA, Postulart D, et al., Research into the (Cost-) effectiveness of the ketogenic diet among children and adolescents with intractable epilepsy: design of a randomized controlled trial. BMC Neurology 2011;11(1):10.

[7] Wang H, Lin K. Ketogenic diet: An early option for epilepsy treatment, instead of a last choice only. Biomed J 2013;36(1):16.

[8] Lee PR, KOSSOFFf EH. Dietary treatments for epilepsy: management guidelines for the general practitioner. Epilepsy Behav 2011;21(2):115-121.

[9] Liu Y-MC, Williams S, Basualdo-Hammond C, et al., A prospective study: growth and nutritional status of children treated with the ketogenic diet. J Am Diet Assoc 2003;103(6):707-712.

[10] Neal E, Cross J. Efficacy of dietary treatments for epilepsy. J Hum Nutr Diet 2010;23(2):113-119.

[11] Kim DW, Kang HC, Park JC, et al., Benefits of the nonfasting ketogenic diet compared with the initial fasting ketogenic diet. Pediatrics 2004;114(6):1627-1630.

[12] Freeman JM, KOSSOFFf EH, Hartman AL. The ketogenic diet: one decade later. Pediatrics 2007;119(3):535-543.

[13] Masino SA, Rho JM. Mechanisms of ketogenic diet action. In: Noebls JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, editors. Jasper´s Basic Mechanisms of the Epilepsies. 4thEd. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012:1-28.

[14] Dahlin M, Månsson J-E, Åmark P. CSF levels of dopamine and serotonin, but not norepinephrine, metabolites are influenced by the ketogenic diet in children with epilepsy. Epilepsy Res 2012;99(1):132-138.

[15] KOSSOFFf EH, Hartman AL. Ketogenic diets: new advances for metabolism-based therapies. Curr Opin Neurol 2012;25(2):173-178.

[16] MCNally MA, Hartman AL. Ketone bodies in epilepsy. J Neurochem 2012;121(1):28-35.

[17] Withrow C. The ketogenic diet: mechanism of anticonvulsant action. Advances in Neurology 1980;27:635.

[18] Sirven J, Whedon B, Caplan D, et al., The ketogenic diet for intractable epilepsy in adults: preliminary results. Epilepsia 1999;40(12):1721-1726.

[19] Prins ML. Cerebral metabolic adaptation and ketone metabolism after brain injury. J Cereb Blood Flow Metab 2007;28(1):1-16.

[20] Gasior M, French A, Joy MT, et al., The anticonvulsant activity of acetone, the major ketone body in the ketogenic diet, is not dependent on its metabolites acetol, 1, 2-propanediol, methylglyoxal, or pyruvic acid. Epilepsia 2007;48(4):793-800.

[21] Likhodii SS, Serbanescu I, Cortez MA, et al., Anticonvulsant properties of acetone, a brain ketone elevated by the ketogenic diet. Ann Neurol 2003;54(2):219-226.

[22] Ruskin DN, Masino SA. The nervous system and metabolic dysregulation: emerging evidence converges on ketogenic diet therapy. Front Neurosci 2012;6:33.

[23] Dahlin M, Elfving Å, Ungerstedt U, et al., The ketogenic diet influences the levels of excitatory and inhibitory amino acids in the CSF in children with refractory epilepsy. Epilepsy Res 2005;64(3):115-125.

[24] Cheng CM, Hicks K, Wang J, et al., Caloric restriction augments brain glutamic acid decarboxylase-65 and -67 expression. J Neurosci Res 2004;77(2):270-276.

[25] Yudkoff M, Daikhin Y, Nissim I, et al., Effects of ketone bodies on astrocyte amino acid metabolism. J Neurochem 1997;69(2):682-692.

[26] Tanner GR, Lutas A, Martínez-François JR, et al., Single K_{ATP} channel opening in response to action potential firing in mouse dentate granule neurons. J Neurosci 2011;31(23):8689-8696.

[27] Erecińska M, Nelson D, Daikhin Y, et al., Regulation of GABA level in rat brain synaptosomes: fluxes through enzymes of the GABA shunt and effects of glutamate, calcium, and ketone bodies. J Neurochem 1996;67(6):2325-2534.

[28] LaManna JC, Salem N, Puchowicz M, et al., Ketones suppress brain glucose consumption.Adv Exp Med Biol2009;645:301-306.

[29] Weinshenker D. The contribution of norepinephrine and orexigenic neuropeptides to the anticonvulsant effect of the ketogenic diet. Epilepsia 2008;49(s8):104-107.

[30] Martillotti J, Weinshenker D, Liles LC, et al., A ketogenic diet and knockout of the norepinephrine transporter both reduce seizure severity in mice. Epilepsy Res 2006;68(3):207-211.

[31] Szot P, Weinshenker D, Rho JM, et al., Norepinephrine is required for the anticonvulsant effect of the ketogenic diet. Dev Brain Res 2001;129(2):211-214.

[32] Masino SA, Kawamura M, Wasser CD, et al., Adenosine, ketogenic diet and epilepsy: the emerging therapeutic relationship between metabolism and brain activity. Curr Neuropharmacol 2007;7(3)257-268.

[33] Fedele DE, Gouder N, Güttinger M, et al., Astrogliosis in epilepsy leads to overexpression of adenosine kinase, resulting in seizure aggravation. Brain 2005;128(10):2383-2395.

[34] Juge N, Gray JA, Omote H, et al., Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. Neuron 2010;68(1):99-112.

[35] Milder J, Patel M. Modulation of oxidative stress and mitochondrial function by the ketogenic diet. Epilepsy Res2012;100(3):295-303.

[36] Bough KJ, Wetherington J, Hassel B, et al., Mitochondrial biogenesis in the anticonvulsant mechanism of the ketogenic diet. Ann Neurol 2006;60(2):223-235.

[37] Maalouf M, Rho JM, Mattson MP. The neuroprotective properties of calorie restriction, the ketogenic diet, and ketone bodies. Brain Res Rev2009;59(2):293-315.

[38] Maalouf M, Sullivan PG, Davis L, et al., Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation. Neuroscience 2007;145(1):256-264.

[39] Sullivan PG, Rippy NA, Dorenbos K, et al., The ketogenic diet increases mitochondrial uncoupling protein levels and activity. Ann Neurol2004;55(4):576-580.

[40] Kwiterovich Jr PO, Vining EP, Pyzik P, et al., Effect of a high-fat ketogenic diet on plasma levels of lipids, lipoproteins, and apolipoproteins in children. JAMA 2003;290(7):912-920.

[41] Groesbeck DK, Bluml RM, KOSSOFFf EH. Long-term use of the ketogenic diet in the treatment of epilepsy. Dev Med Child Neurol 2006;48(12):978-981.

[42] Kang HC, Chung DE, Kim DW, et al., Early- and late-onset complications of the ketogenic diet for intractable epilepsy. Epilepsia 2004;45(9):1116-1123.

[43] Tumas R, Lopes CA, Marques-Dias MJ, et al., Ketogenic diet in epileptic children: clinical and laboratory assessment. Nutrición hospitalaria 2010;25(2):317.

[44] Huttenlocher P, Wilbourn A, Signore J. Medium-chain triglycerides as a therapy for intractable childhood epilepsy. Neurology 1971;21(11):1097-1103.

[45] Liu Y-MC, Lowe H, Zak MM, et al., Can children with hyperlipidemia receive ketogenic diet for medication-resistant epilepsy? J Child Neurol 2013;28(4):479-483.

[46] Steinberg D. The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. J Lipid Res 2009;50(Suppl.):S376-S381.

[47] Steinberg D, Witztum JL. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2010;30(12):2311-2316.

[48] Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. Nat Immunol2011;12(3):204-212.

[49] Nizamuddin J, Turner Z, Rubenstein JE, et al., Management and risk factors for dyslipidemia with the ketogenic diet. J Child Neurol 2008;23(7):758-761.

[50] Brotons C, Ribera A, Perich RM, et al., Worldwide distribution of blood lipids and lipoproteins in childhood and adolescence: a review study. Atherosclerosis 1998;139(1):1-9.

[51] Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. Annu Rev Biochem1983;52(1):223-261.

[52] Charach G, Rabinovich A, Argov O, et al., Anti-oxidized low-density lipoprotein antibodies in chronic heart failure. World J Cardiol2012;4(11):302.

[53] Mello AP, da Silva IT, Abdalla DS, et al., Electronegative low-density lipoprotein: origin and impact on health and disease. Atherosclerosis 2011;215(2):257-265.

[54] Gardner P, Fridovich I. Inactivation-reactivation of aconitase in *Escherichia coli*. A sensitive measure of superoxide radical. J Biol Chem 1992;267(13):8757-8763.

[55] Liang L, Ho Y, Patel M. Mitochondrial superoxide production in kainate-induced hippocampal damage. Neuroscience 2000;101(3):563-570.

[56] Nazarewicz RR, Ziolkowski W, Vaccaro PS, et al., Effect of short-term ketogenic diet on redox status of human blood. Rejuvenation Res2007;10(4):435-440.

[57] Beisswenger BGK, Delucia EM, Lapoint N, et al., Ketosis leads to increased methylglyoxal production on the Atkins diet. Ann N Y Acad Sci 2005;1043:201-210.

[58] Tsai WC, Li YH, Lin CC, et al., Effects of oxidative stress on endothelial function after a high-fat meal.Clin Sci (Lond) 2004;106(3):315-319.

[59] Mohamed HE, El-Swefy SE, Rashed LA, et al., Biochemical effect of a ketogenic diet on the brains of obese adult rats. J Clin Neurosci 2010;17(7):899-904.

[60] McPherson PAC, McEneny J. The biochemistry of ketogenesis and its role in weight management, neurological disease and oxidative stress. J Physiol Biochem 2012;68(1):141-151.

[61] Haces ML, Hernandes-Fonseca K, Medina-Campos ON, et al., Antioxidant capacity contributes to protection of ketone bodies against oxidative damage induced during hypoglycemic conditions. Exp Neurol2008;211(1):85-96.

[62] Jain SK, Kannan K, Lim G. Ketosis (acetoacetate) can generate oxygen radicals and cause increased lipid peroxidation and growth inhibition in human endothelial cells. Free Radic Biol Med 1998;25(9):1083-1088.

[63] Kotani K, Tsuzaki K, Taniguchi N, et al., LDL particle size and reactive oxygen metabolites in dyslipidemic patients. Int J Prev Med 2012;3(3):160.

[64] Stan S, Levy E, Delvin EE, et al., Distribution of LDL particle size in a population-based sample of children and adolescents and relationship with other cardiovascular risk factors. Clin Chem2005;51(7):1192-1200.

[65] Packard CJ. Small dense low-density lipoprotein and its role as an independent predictor of cardiovascular disease. Curr Opin Lipidol2006;17(4):412-417.

[66] Rizzo M, Berneis K. Low-density lipoprotein size and cardiovascular risk assessment. QJM 2006;99(1):1-14.

[67] Sharman MJ, Kraemer WJ, Love DM, et al., A ketogenic diet favorably affects serum biomarkers for cardiovascular disease in normal-weight men. J Nutr 2002;132(7):1879-1885.

[68] Westman EC, Yancy Jr W, Olsen MK, et al., Effect of a low-carbohydrate, ketogenic diet program compared to a low-fat diet on fasting lipoprotein subclasses. Int J Cardiol2006;110(2):212.

[69] Patel A, Pyzik PL, Turner Z, et al., Long-term outcomes of children treated with the ketogenic diet in the past. Epilepsia 2010;51(7):1277-1282.

Table 1. Plasma lipid parameters in different periods of the ketogenic diet (KD) for patients with refractory epilepsy.

Time of KD	CT (%)	LDL (%)	HDL (%)	VLDL (%)	TG (%)	ApoB (%)	ApoA-1 (%)	Age (mean or range)	Sample size (basal/follow up)	References
3-4 months	↑ 24.4	↑ 34.8	↓ 7.7	NA	↑ 84.3	NA	NA	2.8y to 14.1 y	CD (14/14)	9
	↑ 2	↓ 13	↑ 23	NA	↑ 26	NA	NA	3y to 14 y	MCTD (11/11)	9
	↓ 19.12	↓ 31.4	↓ 14.0	NA	↑ 19.8	NA	NA	6 mo to 8 y	(12/9)	45
6-12 months	↑ 33.3	↑ 48.0	↓ 12.5	↑ 47.0	↑ 60.4	↑ 57.3	↑ 2.0	4 mo to 20 y	(141/141)	40
	↑ 35.0	↑ 19.0	↑ 17.0	NA	↑ 27.0	NA	NA	–	(137/99)	49
	↑ 14.2	↑ 10.24	–	–	↓ 11.9	NA	NA	6.2 y	(20/20)	43
	↓ 16.5	↓ 23.9	↓ 20	NA	↑ 11.5	NA	NA	6 mo to 8 y	(12/9)	45[a]
	↓ 32.1	↓ 41.9	↓ 14	NA	↑ 15.3	NA	NA	6 mo to 8 y	(12/9)	45[b]
18-24 months	↑ 20.1	↑ 23.3	NA	NA	↓ 20.3	NA	NA	6.2 y	(20/20)	43
6 years	↑ 12.9	↑ 25.2	↑ 3.8	NA	↓ 19.2	NA	↑ 41.4	7 y to 23 y	(28/28)	41
2 years after KD was discontinued	↓ 26.3	↑ *	**	–	–	–	–	3 mo to 17.8 y	(25/23)	69

APO A-I: apolipoprotein A-I; ApoB: apolipoprotein B; CD: classic diet; HDL: high-density lipoprotein; LDL: low-density lipoprotein; MCTD: medium-chain triglyceride diet; mo: months; TC: total cholesterol; VLDL: very low-density lipoprotein; y: years.

* Three subjects had elevated LDL and stopped the KD 2, 7, and 13 years ago (132, 133, and 148 mg/dL), respectively. ** HDL was normal.[a]After 6 months; [b]after 12 months. NA: not applicable; -: not informed. Reference 49 shows frequency, but not plasma level (mg/dL), for patients with dyslipidemia.These authors have used different cut-off points (TC >200 mg/dL) for dyslipidemia.

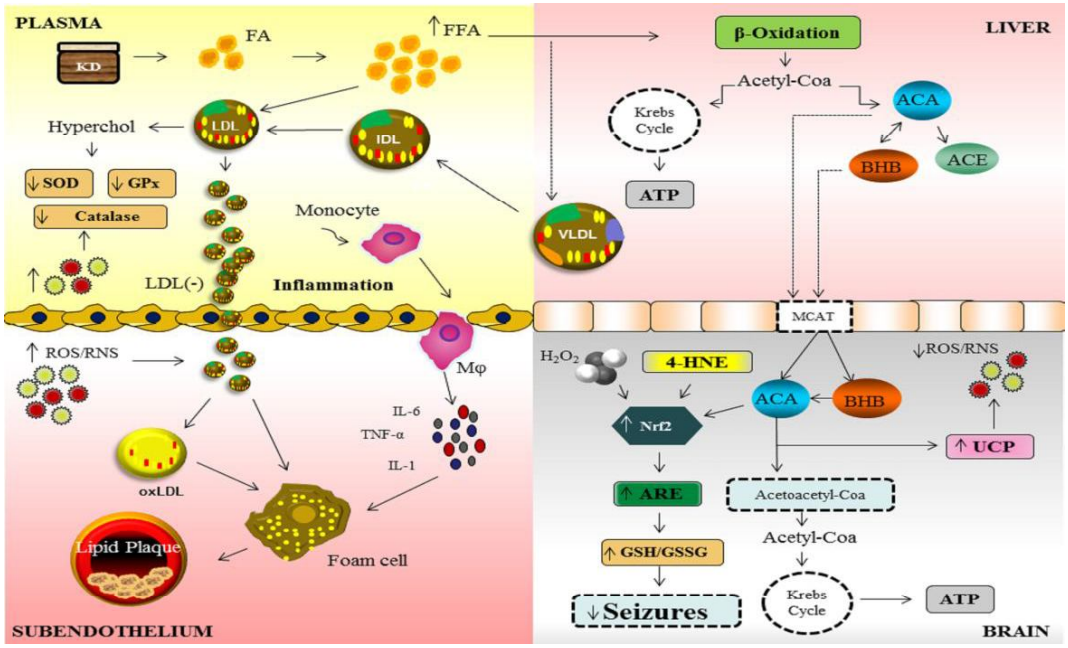


Figure 1. Possible effects of the ketogenic diet (KD) on the plasma, liver, subendothelial space, and brain compartments. The KD provides high levels of fatty acids (FA) and free fatty acids (FFA). In plasma, FFA are incorporated into LDL particles, contributing to hypercholesterolemia (Hyperchol) and high levels of electronegative LDL [LDL(-)]. These events induce an inflammatory process and consequent generation of reactive oxygen (ROS)/nitrogen (RNS) species that promote formation of oxidized LDL (LDLox) and unbalance in the [activity of] antioxidant enzymes [superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), and catalase]. Endothelial dysfunction induced by inflammatory processes and oxidative reactions activates the monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1). Monocytes migrate to the subendothelial space, where atherogenic processes are intensified, and macrophages (Mφ) phagocyte the LDLox and LDL(-) particles, eventually turning into foam cells. In parallel, liver uses FA forβ-oxidation and generation of ATP in the Krebs cycle. The ketogenic pathway is activated and high levels of acetone (ACE), acetoacetate (ACA), and β-hydroxybutyrate (BHB) are generated. Ketone bodies (KB) cross the blood-brain barrier and are transported by monocarboxylic-acid transporters (MCAT). During epilepsy, high levels of KB contribute to the control of seizures in the brain. However, participation of other mechanisms is also stimulated by presence of KB: I. increased levels of uncoupled protein (UCP) promotes a decrease in the ROS/RNS [ratio] and II. early increased levels of H_2O_2 and 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) stimulate the NF E_2-related factor 2 (Nrf2),which favors an increase in the antioxidant response (ARE) and, consequently, high levels of reduced (GSH)/oxidized (GSSG) glutathione ratio.

Anexo 10 – Manuscrito 3: submetido ao periódico Nutritional Neuroscience

KETOGENIC DIET IN REFRACTORY EPILEPSY: STUDY OF INADEQUACY OF MICRONUTRIENTS

Prudencio MB[a], Lima PA[b], Murakami D[c], Sampaio LPB[c], Damasceno NRT[a].

[a]*Department of Nutrition, School of Public Health, University of Sao Paulo; Av. Dr. Arnaldo, 715; 01246-904, Sao Paulo, SP, Brazil*

[b] *Post-Graduate Program in Applied Human Nutrition, University of Sao Paulo; Av. Prof. Lineu Prestes, 580; 05508-000, Sao Paulo, SP, Brazil* [c]

[c] *Children's Institute, Hospital of Clinics, School of Medicine, University of Sao Paulo; Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, 647; 05403-000, Sao Paulo, SP, Brazil*

[a]*Department of Nutrition, School of Public Health, University of Sao Paulo; Av. Dr. Arnaldo, 715; 01246-904, Sao Paulo, SP, Brazil*

* Corresponding author: *E-mail*: nagila@usp.br

Phone number: +55(11) 3061-7865; Fax number: +55(11) 3061-7130

Sources of funding and support

The funding for this study was provided by FAPESP.

Conflicts of Interest

The authors declare that we have no conflicts of interest.

Acknowledgement Statement

The authors wish to thanks the Children´s Institute of the Hospital of Clinics where the researchers developed the study and the financial support provided by FAPESP.

ABSTRACT

Introduction: the prevalence of epilepsy was 0.5% to 1.0% in the population. Approximately 20% to 30% of the patients were refractory for the drug treatment. The KD has been used to the treatment of refractory epilepsy since 1920. The KD consists in a high–fat, adequate protein and low-carbohydrate. The micronutrient deficiencies were one of the adverse effects caused by the diet. However the nutritional deficiencies were described in the literature, there were not studies showing the real micronutrients inadequacies provided by KD. The objective of this study was analyzed the micronutrients deficiencies in the KD. **Methods:** for this study were selected children and adolescents with refractory epilepsy from the neurology pediatric clinic at Children's Institute, Hospital of Clinics, a reference center in São Paulo, Brazil, between June 2012 and June 2013. The nutrient intake was obtained from the data of 3 food registers. The foods were converted in nutrients and energy using the software *Food Processor version 10.11.0* (ESHA Research, USA). The nutrients intake was compared with the EAR. The nutrients with values less than EAR cut off points were considered inadequate. **Results:** the majority of the micronutrients analyzed were inadequate in special the vitamin D, folate, calcium and magnesium. **Conclusion:** the results reinforcing the need to establish an individualized protocol of vitamins and oral supplementation based on the inadequacies provided by KD.

Key Words: epilepsy; micronutrient deficiency; DRIs

Abbreviations

CNS: Central Nervous System

KD: Ketogenic Diet

MCT: Medium Chain Triglycerides

USDA: United States Department of Agriculture

MSM: Multiple Source Method

EAR: Estimated Average Recommended

INTRODUCTION

Epilepsy is the most common childhood neurologic disorder, affecting 0.5% to 1.0% of children younger than 16 years of age. [1] This illness is defined by two or more spontaneous recurrent seizures not caused by fever, acute insults in Central Nervous System (CNS) or severe toxic-metabolic imbalances. [2] Therefore, the etiology may be associated to neurochemical dysfunctions, structural changes, syndromes or genetic mutations and often of idiopathic origin. [3] At the moment, the anticonvulsant drugs represent the major treatment focus for epilepsy. Based on this point, the pharmaceutical industry has developed new anticonvulsants able to control recurrent seizures. [4] Despite of the high efficacy of these drugs, approximately 20% to 30% of the pediatric patients show refractory seizures to maximum doses at least two or three antiepileptic drugs. [4]

WILDER [5] in 1920 at Mayo Clinic described that epileptic patients had better control of their seizures when fasting or in the presence of metabolic acidosis induced by fasting. [6] This author proposed a revolutionary treatment to treat patients with epilepsy based in ketosis induced by high intake of fat named ketogenic diet (KD). The KD has been very used since 1920 until today in the treatment for refractory epilepsy. [4]

The efficacy of the KD was demonstrated in several studies. [7-9] In a classical systematic review of LEFEVRE [7] (2000) the efficacy of the KD was confirmed by the reduction on the number of seizures in 50% of the patients after to start the diet. Later, LEE [8] (2011) described that efficacy of KD was linked to 50% reduction of number of crises. Recently, KOSSOFF [9] (2013) showed that one third of the

responders have >90% of the seizures frequency decreased and over 1 in 10 became seizure free.

In general, KD consists in a high–fat, adequate protein and low-carbohydrate diet administrated for two years. [10] The mechanisms of action and its anticonvulsant properties are still unclear but it is probably that the ketones bodies produced by the catabolism of fat are involved in the therapeutic mechanism of control the seizures. [8]

In the KD calories are often restricted to 80% to 90% of the estimated daily requirements[9] and protein supply is 0.75 to 1g/kg.weight. [11] Although KD was designed to provide relevant macronutrient to produce anticonvulsants effects, [8] this diet supply lower micronutrient than the recommended. Therefore, one of the side effects of KD is inadequacy of micronutrients that can be partially controlled by multivitamin and mineral supplements administration such as calcium, iron, selenium, zinc and vitamin D.[9]

LIU et al [12] (2003) compared the micronutrients and macronutrients intake before and after 4 months of treatment with classical KD and medium chain triglycerides (MCT) KD. These authors showed that both dietetic protocols were able to provide adequate levels of nutrients only when vitamin and minerals supplements were added.

Although the efficacy of KD on control of seizures to be consensus in literature and supplement of micronutrients represents a strategy to prevent deficiencies, there were not studies showing the real inadequacies of micronutrient associated with KD. [12,9] In the same way in the Brazil the prevalence of inadequacy of micronutrients in children and adolescents under KD was also not described. Therefore, the objective of this study was analyze the inadequacies on the

consumption of micronutrients in children and adolescents under KD treatment for refractory epilepsy.

METHODS

For this study were selected children and adolescents with refractory epilepsy from the neurology pediatric clinic at Children´s Institute, Hospital of Clinics, a reference center in São Paulo, Brazil, between June 2012 and June 2013. The admission criteria enrolled children and adolescent age between 1 and 19 years, both sexes, after 3 months to start KD for treatment of refractory and after ketosis has been established. The research was approved for the research ethics board and the parents signed the consent form before start this protocol.

The children and adolescents included in this study were distributed in 4 age groups including boys and girls: group I- 1 to 3 years; group II- 4 to 8 years; group III- 9 to 13 years and group IV- 14 to 18 years. The criteria for cut off points were the age used to divide the life stage group in the DRIs recommendations.[13]

After complete demographic and clinical characterization, the energy needed for the dietary planning was calculated according proposed by FREEMAN [10] (1994). The calories per body weight (Kcal/Kg) were based on the current weight and ideal weight by Z-score of body mass index (Z-BMI/age) **(Table 1)**. The protein supplied were 0.75 to 1g/kg.weight. [11] The standardized protocol in this hospital introduces the classical KD without fasting and all patients were oriented to start the KD in the 2:1 ratio. The fat to carbohydrate and protein ratio were gradually increased until to achieve the 3:1 or 4:1 ratio depending on the urinary ketosis have been stabilized.

The oral vitamin and mineral supplementation was prescribed for the patient and recommended to maintain the use of anticonvulsants prescribed before start the diet.

The classical KD prescribed was composed by four meals distributed in four groups of food: fat, oil, meat and drinks substitutes. All the meals provided in the dietary planning had the same proportion of fat for carbohydrate and protein **(Figure 1)**.

Evaluation of the food consumption was analyzed after three months that the patient has started the diet using three foods registers. The weight of food was measured with digital scale with precision of 0.1g, when the ingredient was raw, except to egg that was measured after cooking.

To analyze the nutrient intake the data of food register were converted in nutrients and energy using the software *Food Processor version 10.11.0*. [14] The nutritional information used to recipes and the ingredients included in this software were based in United States Department of Agriculture (USDA) data. The oral supplementation was not considered to analyze the nutrient intake.

Calories, macronutrients (carbohydrates, proteins and lipids) and micronutrients [retinol (RE), vitamin B1 (mg), vitamin B2 (mg), vitamin B3 (mg), vitamin B6 (mg), vitamin B12 (µg), vitamin C, vitamin D (µg), vitamin E (mg), vitamin K (µg), folate (µg), calcium (mg), iron (mg), magnesium (mg), phosphorus (mg) and zinc (mg) were analyzed. The values of micronutrients were adjusted by Multiple *Source Method* (MSM) to remove within-subjects variations in all groups [15].

The inadequacies of consumption of micronutrients associated to KD were obtained comparing the average of the adjusted nutrients consumed with the values of the Estimated Average Recommended (EAR) for sex and age groups. The nutrients values lower than EAR cut off points were considered inadequate.

RESULTS

Twenty one children and adolescents were included in this study, the mean age was 8.6 years (1.9 to 18.3 years) and 76.2% of the sample was composed by boys. The distribution of the macronutrients intake after three months to start KD treatment was present in **Table 2**.

The results of prevalence of inadequacy were presented in **Table 3** with values of micronutrient expressed in mean intake. Independently of age was observed inadequacy of nutrients in 100% of the sample, and the profile of inadequacy worsened in function of increasing age. The nutrients with higher inadequacies were vitamin D, folate, calcium and magnesium, independently of groups.

The **Figure 2** shows the distribution of main inadequate micronutrients according to EAR cut off points and groups. Children and adolescents in group IV showed inadequacy of calcium (>30%), vitamin D (>25%) and more than 15% for magnesium. Other groups showed significant inadequacies in function of age.

DISCUSSION

Brazilian children and adolescents with refractory epilepsy under KD treatment show inadequacy of vitamins and minerals. Particularly in relation to vitamin D, folate, calcium and magnesium, this consumption reflected not only low mean intake but also represented 100% of inadequacy among these patients. Furthermore, both inadequate consumption and prevalence were proportional to age reinforcing the negative role of the KD treatment on micronutrients status in children and adolescents.

These resultants are especially important because during this life stage adequate supply of vitamins and minerals are essential to prevent deficiencies and ensure growth and development of children and adolescents. [16]

Our results showed that calcium intake was five times less than the EAR in the group 1 reaching up to 10 time less in the group 3. In the same group inadequate intake of vitamin D was 87% lower than the EAR for the age. The adequate intake of calcium and the vitamin D are essential to promote the bone mineralization contributing to normal growth in these children and adolescents and preventing the risks of development osteopenia. [17] Regarding that numerous antiepileptic drugs stimulate osteoclasts activity, the depletion of calcium associated with inadequate intake, can favor reduced growth observed in epileptic children and adolescents. [18]

Despite the high content of fat in KD we verified that in addition to the lower intake of vitamin D, other fat-soluble vitamins such as retinol and vitamin E and K

were inadequate. Second WANG [19] (2013), reduced intake of tocopherols, which are show antioxidant properties, can provide prejudicial cardiac effects to children and adolescents. Although the literature not describes studies with cardiovascular events in epileptic children and adolescents, GARAIOVA [20] (2013) proposed that the adequate supply of vitamin E in children and adolescents could minimize the adverse effects caused by the high fat intake such as dyslipidemias, an important cardiovascular risk factor.

The iron intake was also inadequate in the epileptic dietary treatment. During the growth and body development the need of iron increases. This micronutrient has important metabolic functions as a cofactor for several enzymes and a major component of oxygen transport in the body. [21]The iron deficiency has many negative effects on health such as immune function and unappropriated cognitive development. [22] In the population of this study the prevalence of iron inadequacies increased with the age. Furthermore the intake of vitamin C, that auxiliary the iron absorption, between the groups 3 and 4 was inadequate, influencing negatively in the iron homeostasis in these epileptic patients.

The intake of vitamin A and zinc was also inadequate between all life stage groups. The zinc shows many traditional functions in the body and more recently their antioxidants properties have described. [23] Both micronutrients are enrolled in the immune system and their deficiencies can be change patients under KD treatment more susceptible to infections. In addition, the lower intake of zinc can affect the child growth and the neurobehavioral development.[23]

In our study were found high prevalence of inadequate consumption of complex B vitamins and all the participants had inadequate consumption of folate

during the treatment. The folate and the complex B vitamins have important functions in the synthetize of DNA and RNA. [24] The literature described that the deficiency of vitamin B12 and folate can be affecting the brain development and reduced the cognitive function, possibly worsening cerebral dysfunctions common in epilepsy.[25]

In relation to vitamin B2 and B12 is important highlight elevate inadequacies observed mainly in the group 3 and 4. This prevalence showed that possibly the diet prescription, food intake or both were not adequate for patients higher than ten years of age. Similar profile was observed to folate intake. STRAND [25] (2013) described that deficiency of folate was associated with reduction in learning ability and impaired school achievements, both events normally compromised in epileptic patients.

Magnesium was other important mineral where all patients showed inadequate values and the percentage of inadequacies changed proportionally to age. SWAMINATHAN [26] (2003) described that the magnesium deficiencies can be prejudicing the calcium and potassium metabolism, and modifies the cardiac and neurological functions, in this sample the magnesium inadequacies could be very prejudiced since these patients have already its neurological functions compromised.

It was very important observe that our results show inadequacies of calcium, vitamin D, magnesium and phosphorus will modify negatively the bone homeostasis. This profile can be intensified unbalanced bone mineralization present in patients under epileptic drugs. [27]

Despite was the first time that the inadequacies on the micronutrient intake were analyzed in epileptic children and adolescents under KD treatment, the high

prevalence of inadequacy was expected. The need to offer a high quantity of fat in the KD contributes to limit the supply of any foods such as fruits, greens, vegetables and meats. Besides these restrictions, milk, dairy products, cereals and legumes represent foods were prohibited during KD treatment. These foods were not prescribed because supply more proteins and/or carbohydrates per kilogram of weight when compared to others foods available in the diet.

The study revealed that have a dietary planning which prioritized the offer of food with less proportion of carbohydrate and protein per kilogram of weight were not enough to provide the micronutrients need, because of this: it is important to raise awareness the mothers about the importance to variety the foods available on the diet and develop protocols about supplementation in the KD.

The results showed in this study not included vitamin and mineral supplements. However, after inclusion of this information was possible observed that total intake was not able to acquire EAR levels, according age. Therefore, our results confirm that KD is not able to supply adequate micronutrients and addition of supplements appears was not able to acquire adequate status of vitamins and minerals when recommendations for age are considered. Finally, these points will contribute to development of international trial of supplements in epileptic patients under KD treatment.

LIMITATIONS

The size of sample used in this study to estimate the prevalence of micronutrients inadequacies can be considered small however corroborate with the prevalence described in the literature. Other potential limitation is related to lack of

plasma and urinary micronutrients biomarkers able to confirm the deficiency of these nutrients.

CONCLUSION

The results of this study showed that KD treatment were inadequate to provide the majority of the micronutrients analyzed, mainly vitamin D, folate, calcium and magnesium. The prevalence of inadequacies was proportional to age representing the negative role of the KD treatment on micronutrients status in children and adolescents. The results reinforce the need to establish an individualized protocol of micronutrients and oral supplementation based in inadequacies of KD treatment.

Table 1: Recommendations of calories for children and adolescents.

Age (years)	**Kcal/Kg ***
< 1	80
1 - 3	75
4 - 6	68
6 - 10	60
≥ 11	40 - 50 or <

* Values estimated per kilogram of body weight (Kcal/Kg) based on the current weight and ideal weight by z- score of BMI/age. Source: FREEMAN et. al. (1994).

Table 2- Demographic and dietetic profile of children and adolescents after three months to start KD treatment.

Variables	**Group I (n=5)**	**Group II (n=8)**	**Group III (n=6)**	**Group IV (n=2)**	**Total (n=21)**
Demographic					
Age*	2.5 (1.9 to 3.9)	5.2 (4 to 7)	10.4 (9 to 12)	16.7 (15 to 18.3)	8.6 (1.9 to 18.3)
Sex					
Females	2	1	1	1	5
Males					
Ketogenic diet**	3	7	5	1	16
Calories (Kcal)	879.6 (313.7)	1225.9 (251.13)	1939.8 (5.4)	2622.5 (123.8)	1480.5 (661.7)
Carbohydrates (g)	12.7 (3.9)	19.9 (7.7)	27.5 (5.4)	22.4 (19.8)	20.9 (8.8)
Proteins (g)	13.7 (4.5)	20.5 (7.5)	36.3 (5.1)	55.9 (3.1)	26.5 (14.4)
Fats (g)	85.8 (31.1)	118.5 (27.1)	185.5 (28.9)	253.9 (123.8)	142.8 (65.3)

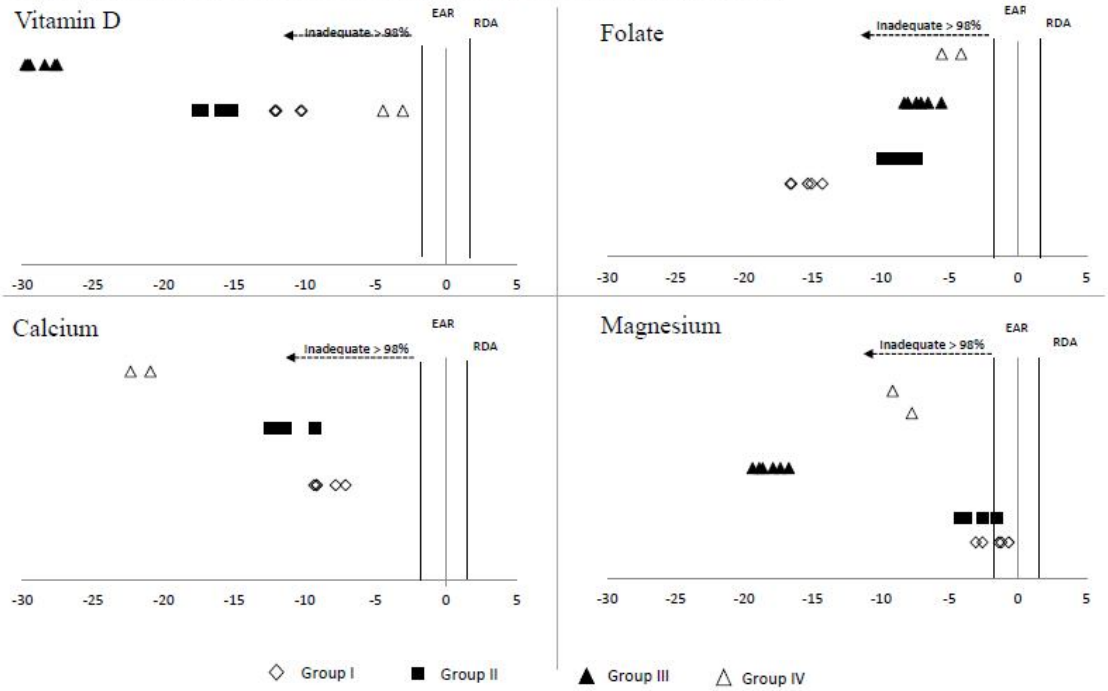
*Data shown in mean (min –max), **Data shown in mean (standard deviation)

Table 3- Prevalence of inadequacies of vitamin and mineral in children and adolescent after three months to start KD treatement.

	Grupo I (n=5)			Grupo II (n=8)			Grupo III (n=6)			Grupo IV (n=2)		
	EAR	Mean (SD)	Prevalence of Inadequacy (%)	EAR	Mean (SD)	Prevalence of Inadequacy (%)	EAR	Mean (SD)	Prevalence of Inadequacy (%)	EAR	Mean (SD)	Prevalence of Inadequacy (%)
Retinol (RE)	210	137.7 (159.7)	80	275	132.5 (147)	87.5	420	127.0 (60.2)	100	557.5	396.4 (0.3)	100
Vitamin B1 (mg)	0.4	0.3 (0.2)	60	0.5	0.4 (0.2)	62.5	0.7	0.6 (0.2)	66.7	0.95	0.9 (0.6)	50
Vitamin B2 (mg)	0.4	0.4 (0.2)	60	0.5	0.5 (0.3)	50	0.8	0.8 (0.2)	50	1	1.3 (0.4)	0
Vitamin B3 (mg)	5	3.8 (2.4)	60	6	5.8 (2.4)	37.5	9	9.9 (2.4)	16.7	11.5	11.7 (5.5)	50
Vitamin B6 (mg)	0.4	0.3 (0.1)	60	0.5	0.5 (0.1)	62.5	0.8	0.7 (0.1)	83.3	1.05	0.8 (0.2)	100
Vitamin B12 (µg)	0.7	1.4 (1.0)	20	1	1.9 (0.7)	12.5	1.5	3.3 (0.9)	0	2	3.8 (1.4)	0
Vitamin C (mg)	13	26.4 (7.6)	0	22	26.3 (10.5)	25	39	26.4 (0.1)	100	59.5	43.0 (0.0)	100
Vitamin D (mcg)	10	0.7 (0.8)	100	10	0.8 (0.6)	100	13	1.7 (0.4)	100	10	2.8 (1.9)	100
Vitamin E (mg)	5	3.3 (1.0)	87.5	6	3.6 (1.3)	100	10	5.1 (0.8)	100	12	6.7 (1.9)	100
Vitamin K (µg)*	30	76.9 (37.5)	0	55	69.5 (39.5)	50	60	49.8 (23.1)	66.7	75	59.4 (0.2)	100
Folate (µg)	120	53.4 (4.3)	100	160	61.3 (11.1)	100	250	78.4 (23.9)	100	330	120.0 (43.3)	100
Calcium (mg)	500	89.2 (48.1)	100	800	96.6 (60.6)	100	1100	107.0 (0.1)	100	1100	222.4 (40.5)	100
Iron (mg)	3	2.4 (1.1)	60	4.1	3.4 (1.0)	75	5.7	4.3 (0.4)	100	7.8	5.8 (0.9)	100
Magnesium (mg)	65	37.4 (15.4)	100	110	48.3 (18.4)	100	200	55.4 (8.0)	100	320	80.4 (0.1)	100
Phosphorus (mg)	380	214.7 (128.8)	80	405	285.6 (117.6)	75	1055	472.6 (98.4)	100	1055	670.6 (332.7)	100
Zinc (mg)	2.5	2.0 (0.7)	80	4	3.2 (1.2)	62.5	7	6.1 (1.3)	83.3	7.9	6.5 (1.3)	100

* Nutrient without EAR values established were used the Adequate Intake (AI) values with reference. The values of EAR presented in this table were the medium value of the different recommendations for the sex.

Figure 2- Distributions of main inadequate micronutrients intake in the KD according the EAR cut off point and groups.



*Inadequate calcium to Group III>-30: not appear

REFERENCES

1- Jones JE, Austin JK, Caplan R, Dunn D, Plioplys S, Salpekar JA. Psychiatric disorders in children and adolescents who have epilepsy. Pediatrics in Review. 2008;29(2):e9-e14.
2- Sillanpää M. Children with epilepsy as adults: outcome after 30 years of follow-up. Acta paediatrica Scandinavica Supplement. 1989;368:1-78.
3- Helbig I, Lowenstein DH. Genetics of the epilepsies: where are we and where are we going?. Current opinion in neurology. 2013;26(2):179-85.
4- Wilder R. The effect of ketonemia on the course of epilepsy. Mayo Clinic Bulletin. 1921;2:307.
5- Freeman JM, Kossoff EH, Hartman AL. The ketogenic diet: one decade later. Pediatrics. 2007;119(3):535-43.
6- Geyelin HR. Fasting as a method for treating epilepsy. Med Rec. 1921;99:1037-9.
7- Lefevre F, Aronson N. Ketogenic diet for the treatment of refractory epilepsy in children: a systematic review of efficacy. Pediatrics. 2000;105(4):e46-e.
8- Lee PR, Kossoff EH. Dietary treatments for epilepsy: management guidelines for the general practitioner. Epilepsy & Behavior. 2011;21(2):115-21.
9- KOSSOFF EH, Wang ES. Dietary therapies for epilepsy. Biomedical Journal. 2013; 36:2-8
10- Kossoff EH, ZupecKania BA, Amark PE, Ballaban-Gil KR, Christina Bergqvist A, Blackford R, et al., Optimal clinical management of children receiving the ketogenic diet: recommendations of the International Ketogenic Diet Study Group. Epilepsia. 2009;50(2):304-17.
11- Nonino-Borges CB, Bustamante VCT, Rabito EI, Inuzuka LM, Sakamoto AC, Marchini JS. The ketogenic diet on the treatment of drug resistant epilepsies. Revista de Nutrição. 2004;17(4):515-21.
12- Liu Y-MC, Williams S, Basualdo-Hammond C, Stephens D, Curtis R. A prospective study: growth and nutritional status of children treated with the ketogenic diet. Journal of the American Dietetic Association. 2003;103(6):707-12.
13- Institute of medicine (IOM). National Academy Press. Dietary Reference Intakes: application in Dietary Assesment. Washington DC: National Academy Press; 2011.
14- Food Processor: nutrition and fitness software [Software, FPSQL W/ PS 10,11]. Esha Research, Inc. 2011.
15- The Multiple Source Method (MSM) [software disponível na internet]. Version 1.0.1. Potsdam: Department of Epidemiology of the German Institute of Human Nutrition; 2008-2011 [atualizado em 20 fev 2012; acesso em 07 jan 2013]. Disponível em https://msm.dife.de/.
16- Black RE, Allen LH, Bhutta ZA, Caulfield LE, De Onis M, Ezzati M, et al., Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. The Lancet. 2008;371(9608):243-60.

17- Cosenza L, Pezzella V, Nocerino R, Di Costanzo M, Coruzzo A, Passariello A, et al., Calcium and vitamin D intakes in children: a randomized controlled trial. BMC pediatrics. 2013;13(1):86.
18- Bertoli S, Cardinali S, Veggiotti P, Trentani C, Testolin G, Tagliabue A. Evaluation of nutritional status in children with refractory epilepsy. Nutr J. 2006;5(14):1-9.
19- Wang Y, Chun OK, Song WO. Plasma and Dietary Antioxidant Status as Cardiovascular Disease Risk Factors: A Review of Human Studies. Nutrients. 2013;5(8):2969-3004.
20- Garaiova I, Muchová J, Nagyová Z, Mišľanová C, Oravec S, Dukát A, et al., Effect of a plant sterol, fish oil and B vitamin combination on cardiovascular risk factors in hypercholesterolemic children and adolescents: a pilot study. Nutrition journal. 2013;12(1):7.
21- Bao W, Rong Y, Rong S, Liu L. Dietary iron intake, body iron stores, and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. BMC medicine. 2012;10(1):119.
22- Ferrari M, Mistura L, Patterson E, Sjöström M, Díaz L, Stehle P, et al., Evaluation of iron status in European adolescents through biochemical iron indicators: the HELENA Study. European journal of clinical nutrition. 2011;65(3):340-9.
23- Wessells KR, Brown KH. Estimating the global prevalence of zinc deficiency: results based on zinc availability in national food supplies and the prevalence of stunting. PloS one. 2012;7(11):e50568.
24- Zschäbitz S, Cheng T-YD, Neuhouser ML, Zheng Y, Ray RM, Miller JW, et al., B vitamin intakes and incidence of colorectal cancer: results from the Women's Health Initiative Observational Study cohort. The American journal of clinical nutrition. 2013;97(2):332-43.
25- Strand TA, Taneja S, Ueland PM, Refsum H, Bahl R, Schneede J, et al., Cobalamin and folate status predicts mental development scores in North Indian children 12–18 mo of age. The American journal of clinical nutrition. 2013;97(2):310-7.
26- Swaminathan R. Magnesium metabolism and its disorders. The Clinical Biochemist Reviews. 2003;24(2):47.
27- Vervloet MG, van Ittersum FJ, Büttler RM, Heijboer AC, Blankenstein MA, ter Wee PM. Effects of dietary phosphate and calcium intake on fibroblast growth factor-23. Clinical Journal of the American Society of Nephrology. 2011;6(2):383-9.