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

Dieta cetogênica clássica e modificada: risco cardiometabólico e potencial terapêutico em pacientes pediátricos com epilepsia refratária

Patricia Azevedo de Lima Masuda

Tese apresentada para obtenção do Título de Doutor

Orientadora: Profª. Dra. Nágila Raquel Teixeira Damasceno

Coorientadora: Dra. Leticia Pereira de Brito Sampaio

São Paulo

2017

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

Dieta cetogênica clássica e modificada: risco cardiometabólico e potencial terapêutico em pacientes pediátricos com epilepsia refratária

Patricia Azevedo de Lima Masuda

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.

Tese apresentada para obtenção do Título de Doutor

Orientadora: Profª. Dra. Nágila Raquel Teixeira Damasceno

Coorientadora: Dra. Leticia Pereira de Brito Sampaio

São Paulo

2017

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Lima-Masuda, Patricia Azevedo de
L732d Dieta cetogênica clássica e modificada : risco cardiometabólico e potencial terapêutico em pacientes pediátricos com epilepsia refratária / Patricia Azevedo de Lima-Masuda. -- São Paulo, 2017.
177p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade da USP. Faculdade de Saúde Pública da USP. Curso Interunidades em Nutrição Humana Aplicada.
Orientador : Damasceno, Nágila Raquel Teixeira
Co-orientador: Sampaio, Leticia Pereira de Brito

1. Bioquímica nutricional 2. Dietoterapia 3. Epilepsia I. T. II. Damasceno, Nágila Raquel Teixeira, orientador. III. Sampaio, Leticia Pereira de Brito, co-orientador.

641.1 CDD

Patricia Azevedo de Lima Masuda

Dieta cetogênica clássica e modificada: risco cardiometabólico e potencial terapêutico em pacientes pediátricos com epilepsia refratária

Comissão Julgadora

da

Tese para obtenção do grau de Doutor

Profª. Dra. Nágila Raquel Teixeira Damasceno

orientador/presidente

_____

1° Examinador

_____

2° Examinador

_____

3° Examinador

_____

4° Examinador

São Paulo, _____de_____de 2017.

DEDICATÓRIA

Ao homem da minha vida, meu marido Flavio, meu amigo, meu tudo!

Aos meus pais, Francisco e Maria, que me ensinaram a jamais desistir. Por me ensinarem a ser honesta e que é preciso ter coragem.

Depois de um tempo você aprende que o sol queima
se ficar exposto por muito tempo.
E aprende que não importa o quanto você se importe,
algumas pessoas simplesmente não se importam...

E você aprende que realmente pode suportar...
que realmente é forte,
e que pode ir muito mais longe depois de
pensar que não se pode mais.

(William Shakespeare)

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado capacidade para desenvolver esta pesquisa, por ter colocado em meu caminho verdadeiros anjos da guarda para que eu chegasse até o fim.

À Profa. Nágila Raquel Teixeira Damasceno pela orientação da tese.

As alunas Mariana Baldini e Giovanna Ricciarelli por serem leais companheiras neste projeto. Pela dedicação e profissionalismo, por serem meninas brilhantes, meninas de sucesso, e simplesmente pela nossa amizade.

A Brenda Ladeia pela sua participação nesta pesquisa, pelo auxílio durante a coleta, pelo seu empenho e dedicação. Pelo seu carisma e grande coração.

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

Às especialistas de laboratório Geni, Rosana e Liânia, por sempre estarem dispostas a ajudar, pelas orientações e pela amizade. Não tenho palavras para agradecer!

A todos os outros alunos: Flavia Cartolano, Caroline Pappiani, Camila Pruper, Alexandre Orsi, Gabriela Dias, por compartilhar conhecimento, dúvidas, e soluções. Por todos esses anos de convivência. Por vocês serem excelentes!

A Dra. Leticia Sampaio e a Cristina Takakura pelas portas abertas a esta pesquisa, por permitirem o desenvolvimento deste projeto. Por nos auxiliar com os cuidados aos pacientes participantes.

Ao Prof. Dr. Júlio Tirapegui pela compreensão e apoio, por me ouvir pacientemente. Por renovar as minhas esperanças. Serei eternamente grata!

A Profa. Dirce Marchioni por me acudir nos momentos de aflição. Por me ouvir e me mostrar que a sensatez pode ser aplicada mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos meus sogros, Olindo Masuda e Celina Masuda, por sempre serem tão gentis e contribuírem tanto para que eu tivesse mais tempo de me dedicar e finalizar este trabalho.

A Josiane Steluti pela amizade verdadeira! Seja em qual momento for estaremos sempre juntas, pois o destino nos fez amigas, mas o coração nos tornou irmãs.

As minhas sobrinhas, Ana Beatriz e Maria Fernanda, por encantarem a minha vida e torná-la mais leve e feliz!

As crianças, adolescentes, responsáveis e ao Instituto da Criança da FMUSP que permitiram que essa pesquisa acontecesse.

Ao Serviço de Nutrição e Dietética do Instituto da Criança da FMUSP pelos cuidados especiais com este protocolo de pesquisa.

A todos os funcionários do Programa de Pós Graduação em Nutrição Humana da USP por permitir a minha formação, meu aprendizado e contribuir com o meu crescimento profissional e pessoal. Ainda espero poder retribuir!

A FAPESP pelo incentivo a esta pesquisa com a concessão de bolsa sob o processo n° 2014/26094-4. Pelos incentivos anteriores durante a iniciação científica e o mestrado, pontes para que eu chegasse até aqui.

RESUMO

Lima Masuda PA. **Dieta cetogênica clássica e modificada: risco cardiometabólico e potencial terapêutico em pacientes pediátricos com epilepsia refratária** 2017. 177f. [Tese de Doutorado] - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Economia e Administração, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A dieta cetogênica (DC) é um tratamento não farmacológico prescrito especialmente para crianças e adolescentes com epilepsia refratária. A composição da dieta cetogênica é baseada no alto teor de gorduras, baixo teor de carboidratos e teor proteico moderado, sendo a produção de corpos cetônicos o mecanismo provável envolvido no controle das crises epilépticas. Apesar dos benefícios clínicos, a relação entre DC e o risco cardiometabólico não está bem estabelecida, especialmente sob os fatores de risco não clássicos. **Objetivo**: comparar os efeitos da dieta cetogênica clássica com a dieta cetogênica modificada nas subfrações de LDL e HDL, nos marcadores oxidativos, no perfil de apolipoproteinas e no perfil lipídico de crianças e adolescentes com epilepsia refratária, além do efeito clínico no controle da epilepsia. **Métodos:** Estudo de intervenção 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. O grupo controle recebeu DC clássica e o grupo caso recebeu a DC modificada com redução em pelo menos 20% de ácidos graxos saturados (AGS) e redução da relação w6/w3 em pelo menos 50% em comparação a DC clássica. Para ambos os grupos foram analisados os seguintes parâmetros bioquímicos no período basal, após 3 meses e 6 meses de DC: perfil lipídico clássico, concentração de ácidos graxos não esterificados (AGNEs), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), subfrações de lipoproteina de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL), e perfil de apolipoproteínas (APOA-I e APOB). Além da avaliação clínica, antropométrica e de consumo alimentar. **Resultados:** A redução de crises e dos fármacos antiepilépticos foi semelhante entre os grupos. O aumento na concentração de colesterol total (CT) e LDL foi inferior no grupo caso, a Não-HDL manteve-se significativamente menor no grupo caso em comparação ao grupo controle e a relação LDL/APOB foi superior no grupo controle após 6 meses de DC. O percentual de partículas pequenas de LDL apresentou aumento superior em 208% no grupo controle comparado ao grupo caso, e consequentemente o tamanho de LDL apresentou maior redução no grupo controle. A incidência de dislipidemia foi significativamente inferior no grupo caso considerando os pontos de corte para LDL (≥130 mg/dL) e não-HDL (≥145 mg/dL). Não houve diferença entre os grupos na concentração de ácidos graxos não esterificados (AGNES) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs). **Conclusão:** A mudança do perfil de gorduras

contribuiu para melhora das concentrações de marcadores de risco cardiometabólico (CT, LDL e LDL pequenas) e consequentemente, perfil mais cardioprotetor nos pacientes do grupo caso.

Descritores: Dieta cetogênica, Epilepsia, Tamanho de lipoproteína, Dislipidemia

ABSTRACT

Lima Masuda PA. **Classic and modified ketogenic diet: cardiometabolic risk and therapeutic potential in pediatric patients with refractory epilepsy** 2017. 177f [Doctoral Thesis] - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Economia e Administração, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The ketogenic diet (KD) is a non-pharmacological treatment especially prescribed to children and adolescentes with refractory epilepsy. The composition of the ketogenic diet is based on the high fat, low carbohydrate and moderate protein. The production of ketone bodies is the probable mechanism involved in the control of epileptic seizures. Despite the clinical benefits, the relationship between KD and cardiometabolic risk is not well established, especially under non-classical risk factors. **Objective:** to compare the effects of the classical KD with the modified KD on the LDL and HDL subfractions, in oxidative biomarkers, in apolipoprotein profile and lipid profile of children and adolescentes with refractory epilepsy, as well as the clinical effect on control of seizure. **Methods**: Dietary intervention study with recruitment of children and adolescentes with refractory epilepsy aged 1 to 19 years of both sexes from the Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. The control group received classical KD and the case group received modified KD with a reduction of at least 20% saturated fatty acids (SFA) and a reduction of the w6/w3 ratio by at least 50% compared to classic KD. For both groups, the following biochemical parameters were analyzed at baseline and after 3 and 6 months of the KD: classical lipid profile, concentration of non-esterified fatty acids (NEFAs), thiobarbituric acid reactive substances (TBARs), low density lipoprotein (LDL) and high density lipoprotein (HDL) subfractions, size LDL, and apolipoprotein profile (APOA-I and APOB). In addition to clinical, anthropometric and food consumption assessment. **Results:** The reduction of seizures and antiepileptic drugs was similar between the groups. The increase in total cholesterol (TC) and LDL levels was lower in the case group, non-HDL remained significantly lower in the case group compared to the control group and the LDL/APOB ratio was higher in the control group after 6 months of KD. The percentage of small LDL particles showed a 208% higher in the control group than case group. Consequently, the LDL size showed a greater reduction in the control group. The incidence of dyslipidemia was significantly lower in the case group considering cut-off points for LDL (≥130 mg/dL) and non-HDL (≥145 mg/dL). There was no difference between the groups in the NEFAs and TBARs levels. **Conclusion**: The change in the fatty acids profile contributed to improvement the concentrations of cardiometabolic risk markers (TC,

LDL and small LDL), and consequently, a more cardioprotective profile in the patients of case group.

Keywords: ketogenic diet, epilepsy, lipoprotein size, dyslipidemia

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO 21
1.1 ETIOLOGIA E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS 21
1.2 ASPECTOS DIETOTERÁPICOS 23
1.2.1 Absorção de lipídeos e β-oxidação: triacilgliceróis de cadeia longa e cadeia média 24
1.3 MECANISMOS NEUROBIOQUÍMICOS DA DIETA CETOGÊNICA 27
1.4 IMPACTO DA DIETA CETOGÊNICA NAS LIPOPROTEÍNAS 31
1.5 JUSTIFICATIVA 34
1.6 HIPÓTESE 34
2. OBJETIVOS 36
2.1 GERAL 36
3. MATERIAL E MÉTODOS **37**
3.1 CASUÍSTICA e DELINEAMENTO DO ESTUDO 37
3.2 TAMANHO DA AMOSTRA 39
3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E NÃO INCLUSÃO 40
3.4 ANÁLISE DE RISCOS E BENEFÍCIOS 40
3.5 PERFIL SOCIOECONÔMICO E CLÍNICO 41
3.6 CÁLCULO DA DIETA E PROTOCOLO DE ORIENTAÇÃO 41
3.7 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA E COMPOSIÇÃO CORPORAL 44
3.8 AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR 46
3.9 ADESÃO A DIETA CETOGÊNICA 47
3.10 OBTENÇÃO DE SANGUE 48
3.11 DETERMINAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO 49
3.12 DETERMINAÇÃO DAS APOLIPOPROTEÍNAS 50
3.13 DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS NÃO ESTERIFICADOS 50
3.14 SUBFRAÇÕES de LDL e HDL e TAMANHO DE LDL 50
3.15 SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS) 52
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA 52

5. RESULTADOS..... 53

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA 53

5.1.1 Perfil Socioeconômico e clínico 56

5.2 EFEITO DA DC NAS CRISES EPILÉPTICAS..... 58

5.3 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA E COMPOSIÇÃO CORPORAL 62

5.4 ADESÃO A DIETA CETOGÊNICA 66

5.4.1 Dieta Cetogênica..... 66

5.4. 2 Cetonúria e β-hidroxibutirato..... 68

5.5 AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR..... 69

5.6 PERFIL BIOQUÍMICO..... 75

6. DISCUSSÃO.....81

7. CONCLUSÃO.....93

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....94

ANEXOS.....108

Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre Esclarecido..... 108

Anexo 2 – Aprovação no Comitê de Ética..... 110

Anexo 3 – Aprovação no Clinical Trial..... 111

Anexo 4 – Dieta Cetogênica Clássica – grupo controle..... 112

Anexo 5 – Dieta Cetogênica Modificada – grupo caso..... 116

Anexo 6 – Cálculo comparativo DC clássica e modificada..... 119

Anexo 7 – Questionário de Identificação e Avaliação Socieconômica e Clinica 120

Anexo 8 – Modelo de Registro Alimentar..... 124

MANUSCRITO 1 (não submetido)..... 125

MANUSCRITO 2 (submetido)..... 149

MANUSCRITO 3 (submetido)..... 162

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.....42

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

TABELA 3: Caracterização socioeconômica e demográfica dos participantes.....57

TABELA 4: Etiologia da epilepsia, segundo ILAE (2010).....58

TABELA 5: Percentual de redução de crises conforme grupo e tempo de intervenção.....60

TABELA 6: Frequência e dosagem de fármacos antiepilépticos (mg) utilizados pelos participantes segundo grupo e tempo de intervenção.....61

TABELA 7: Classificação do estado nutricional conforme grupo e tempo de intervenção.....63

TABELA 8: Caracterização antropométrica e composição corporal por bioimpedância elétrica conforme grupo e tempo de intervenção.....65

TABELA 9: Caracterização do consumo de energia, macronutrientes, ácidos graxos e fibras, segundo grupo e tempo de intervenção.....70

TABELA 10: Caracterização do consumo de micronutrientes (vitaminas, antioxidantes e minerais) segundo grupo e tempo de intervenção.....73

TABELA 11: Perfil bioquímico segundo grupo e tempo de intervenção.....76

TABELA 12: Frequência de dislipidemia segundo parâmetros da Academia Americana de Pediatria segundo grupo e tempo de intervenção.....80

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Absorção dos triacilgliceróis de cadeia longa e cadeia média no sistema gastrointestinal.....26

FIGURA 2: Produção de corpos cetônicos e possíveis efeitos anticonvulsivos no cérebro.....28

FIGURA 3: Delineamento do estudo nos diferentes momentos de monitoramento.....38

FIGURA 4 – Fracionamento de sangue e realização das análises no plasma.....49

FIGURA 5 – Separação das subfrações de LDL e HDL pelo sistema Lipoprint System, Quantrimetrix®.....51

FIGURA 6: Fluxograma de pacientes inclusos e perdas no seguimento. TCLE: Termo de Consentimento Livre Esclarecido.....55

FIGURA 7: Redução média de crises diárias segundo grupo e tempo de intervenção.....59

FIGURA 8: Prescrição e ingestão de energia segundo grupo e tempo de intervenção.....67

FIGURA 9: Prescrição e ingestão de lipídeos segundo grupo e tempo de intervenção.....67

FIGURA 10: Detecção de β-hidroxibutirato.....68

FIGURA 11: Mudança de fenótipo segundo grupo e tempo de intervenção.....79

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

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

FAEs – Fármacos antiepilépticos

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

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

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

1.1 ETIOLOGIA E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

A epilepsia é uma doença neurológica caracterizada por 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., 2014; GITAÍ et al., 2008). Independente da causa ou sintomatologia da doença, as repercussões desta doença cerebral envolvem consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e consequências sociais (FISHER et al., 2014).

A definição de epilepsia pode ser atribuída a qualquer uma das seguintes condições: pelo menos 2 crises não provocadas ocorrendo em período > 24h, uma crise não-provocada e a probabilidade de recorrência de novas crises semelhantes (pelo menos 60%) , após duas crises não provocadas , ocorrendo ao longo dos próximos 10 anos ou diagnóstico de síndrome epiléptica (FISHER et al., 2014).

A classificação etiológica da epilepsia vem sendo revisada constantemente pela Comissão de Classificação e Terminologia da Liga Internacional contra Epilepsia (ILAE), sendo publicada pela primeira vez em 1981. Em 2010 uma nova proposta de classificação foi publicada, ressaltando a importância da classificação etiológica como determinante do tratamento, prognóstico e curso clínico da epilepsia (BERG et al., 2010). Segundo esta proposta, as crises epilépticas e a epilepsia podem ser classificadas em três categorias: Genética, Estrutural/Metabólica e Causa Desconhecida. Baseado nesta estrutura, recentemente, um novo relatório da Comissão da ILAE (2013) foi publicado onde alguns termos foram revisados e foi proposta nova abordagem e ampliação das categorias etiológicas: Genética, Estrutural, Metabólica, Imunológica, Infecciosa e Desconhecida.

Assim como a etiologia, a prevalência e a incidência são essenciais para se avaliar os programas de saúde pública e medidas de prevenção. 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. Em

2012 a Organização Mundial da Saúde estimou que 0,7% da população mundial apresentava epilepsia, ou seja, 50 milhões de indivíduos, sendo que 80% vivim 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% no 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 à melhor e maior disponibilidade dos fármacos antiepilépticos.

Na maioria dos casos a base do tratamento da epilepsia consiste do uso de fármacos antiepilépticos. No entanto, 20% a 30% das crianças acometidas têm crises epilépticas refratárias a esses fármacos (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 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 pelo menos duas drogas de primeira linha (INUZUKA-NAKAHARA, 2008).

A composição da dieta cetogênica é baseada no alto teor de gorduras, baixo teor de carboidratos e teor proteico moderado, sendo o catabolismo das gorduras 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; LIMA PA et al., 2014).

Os benefícios da DC como tratamento apresentam redução acima de 50% das crises epilépticas, o que é considerado clinicamente relevante (FREEMAN et al., 2007; 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, exceto nos casos de erros inatos do metabolismo. 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, estudos demonstram 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).

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

A DC clássica, 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 das lipases lingual e 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). Esse processo é característico dos TCL que são absorvidos nos enterócitos e incorporados a quilomícrons, são transportados via 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 via circulação portal e prontamente oxidados nas mitocôndrias dos hepatócitos (BEERMANN et al., 2003) **(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). De modo contrário, 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). Além disso, independente da fonte de gordura ser proveniente de TCL ou TCM os principais ácidos graxos presentes da dieta cetogênica são os ácidos graxos saturados que interferem negativamente no perfil lipídico (LIU et al., 2003), enquanto os ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados estão mais associados a um papel cardioprotetor devido ao impacto positivo no metabolismo das lipoproteínas.

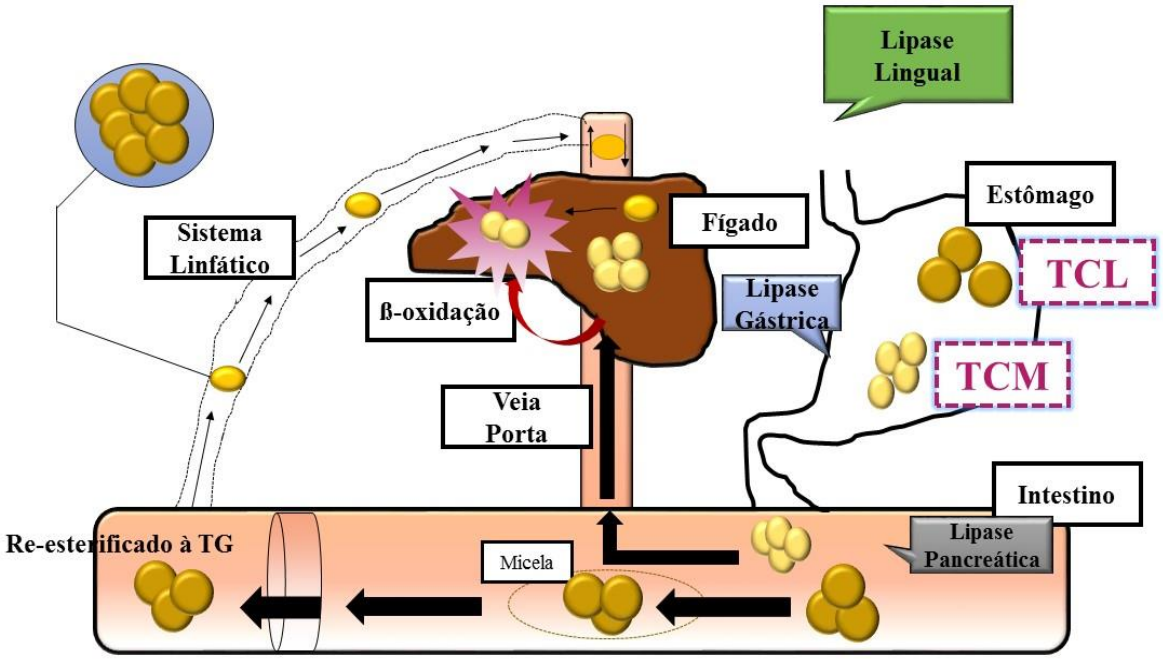


Figura 1: Absorção dos triacilgliceróis de cadeia longa e cadeia média no sistema gastrointestinal. Os TCM e TCL sofrem ação da lipase lingual e gástrica sendo a biodisponibilidade digestiva dos TCM maior que dos TCL. Os TCL sofrem ação emulsificante dos sais biliares facilitando a ação da lipase pancreática. 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 unem 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 SHINOHARA et al., (2005).

1.3 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 em detrimento de carboidratos e proteínas 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**).

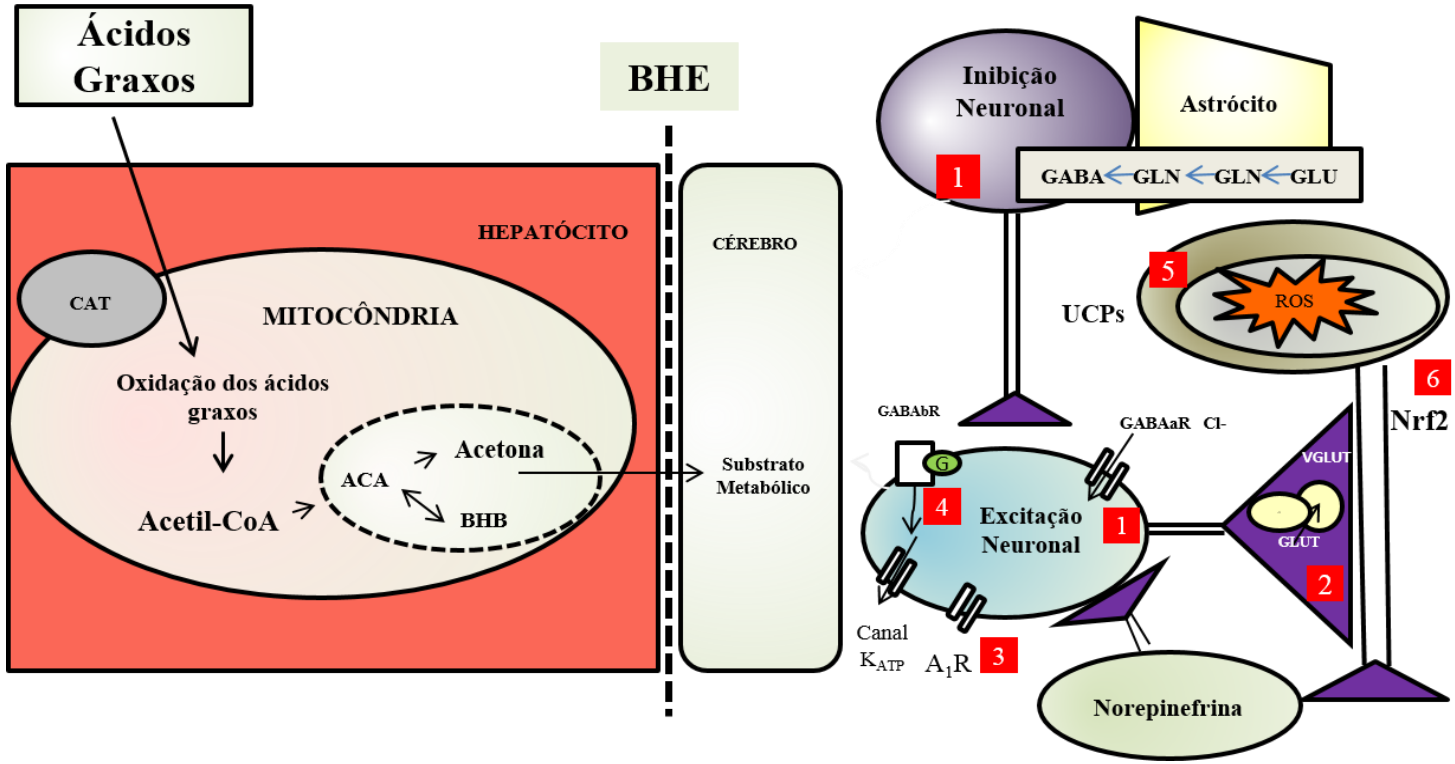


Figura 2: Produção de corpos cetônicos e possíveis efeitos anticonvulsivos no cérebro. Os ácidos graxos provenientes da DC são oxidados e o excesso de Acetil-CoA é convertido em ACA e posteriormente em acetona e β-hidroxibutirato. Os corpos cetônicos atravessam a BHE promovendo o efeito anticonvulsivante. 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 neurotransmissor sintetizado a partir do glutamato após a conversão de GABA pela glutamato descarboxilase (MCNALLY et al., 2012). 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 uma 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* mostrou 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.

1.4 IMPACTO DA DIETA CETOGÊNICA NAS LIPOPROTEÍNAS

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 clássica (rica em gorduras saturadas) apresentem maior risco cardiometabólico que crianças e adolescentes não submetidos a DC.

Além das alterações no perfil lipídico, estudos prévios demonstraram 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 não se limita apenas a concentração de colesterol associada à 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 retida à parede vascular, essas partículas se tornam susceptíveis a modificação oxidativa pela ação de enzimas como as lipoxigenases e mieloperoxidases, e também através de reações oxidantes não enzimáticas do tipo radicalar, favorecendo a geração LDL oxidada (LDLox), cujo potencial aterogênico é amplamente descrito na literatura (KETELHUTH e HANSSON, 2011). Assim, a LDLox induz o recrutamento de monócitos, a ativação dos macrófagos, 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 à 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).

Diversos estudos demonstraram que além da concentração maior da LDLox na circulação de indivíduos dislipidêmicos, esses indivíduos também apresentam partículas de LDL com carga de íons mais negativa, partículas de LDL minimamente oxidadas, classicamente denominadas como LDL eletronegativa [LDL(-)] (IVANOVA et al., 2015; MELLO et al., 2011), sendo o aumento dos ácidos graxos não esterificados (AGNES) uma das principais vias de geração desta partícula. A LDL(-) também está associada ao aumento no conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), aos 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).

O aumento na concentração destes marcadores (AGNES, TBARs e LDLoxidada) são fundamentais à ativação e manutenção da resposta imunológica associada ao desenvolvimento da aterosclerose e a resposta inflamatória, especialmente pelo aumento na produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) (MELLO et al., 2011).

A resposta inflamatória na aterogênese é mediada pelas mudanças funcionais em células endoteliais, linfócitos T, monócitos diferenciados em macrófagos e células do músculo liso. A ativação desas células desencadeia a geração de um extenso espectro de citocinas, moléculas de adesão, fatores de crescimento, acúmulo de lipídios e proliferação de células do músculo liso (LIBBY et al., 2009).

Na vigência de disfunção endotelial, a concentração destas citocinas eleva-se, estimulando a produção de moléculas de adesão, assim favorecendo o recrutamento e adesão de monócitos à superfície endotelial e consequentemente a formação de células espumosas e da placa lipídica (QUINTÃO et. al., 2011). Portanto, a resposta inflamatória pode ser induzida pelo estresse oxidativo, principalmente pela oxidação da LDL, sendo as partículas pequenas de LDL mais susceptíveis a este processo.

As propriedades físicas das lipoproteínas vêm sendo estudadas e sua variação sugere que o tamanho das partículas de lipoproteínas pode fornecer detalhes adicionais sobre o risco cardiovascular individual, além do clássico perfil lipídico (PACKARD et al., 2000; BERNEIS et al., 2002; OTVOS et al., 2011; DIFFENDERFER et al., 2014).

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.

Posteriormente, 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 favoreceu 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 as influências dessas mudanças nas doenças coronarianas são desconhecidas (LEE e KOSSOFF, 2011).

Recentemente, o estudo de KAPETANAKIS et al., (2014) e DOKSOZ et al., (2015), também observaram impacto negativo da DC no perfil lipídico clássico e nenhum efeito foi visto nas propriedades de elasticidade e espessura da artéria carótida após 24 e 6 meses de DC, respectivamente. Entretanto, esses estudos não apresentaram a composição de ácidos graxos da DC e não monitoraram nenhum marcador de oxidação.

Apesar dessas observações, até o momento a literatura é escassa em 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 JUSTIFICATIVA

Considerando que a DC é um coadjuvante terapêutico com eficácia comprovada no controle das crises epilépticas e que a literatura é deficiente em 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, o perfil oxidativo e o perfil de apolipoproteínas envolvidos na patogênese da aterosclerose.

1.6 HIPÓTESE

A hipótese deste estudo de intervenção, prevê que o grupo caso (DC modificada) submetido a uma intervenção de DC com redução em pelo menos 20% da oferta de gorduras saturadas, e otimização da oferta de ácidos graxos monoinsaturados e poli-

insaturados, em comparação ao grupo controle (DC clássica), apresente um melhor perfil dos parâmetros cardiometabólicos mantendo ou aumentando a eficácia no controle das crises convulsivas e com potencial redução da politerapia medicamentosa de drogas anticonvulsivas.

Desfechos esperados:

a) Crianças e adolescentes do grupo caso apresentarão maior eficácia no controle das crises convulsivas após 3 (T1) e 6 meses (T2) de DC.
b) Crianças e adolescentes do grupo caso apresentarão menores 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 do grupo caso apresentarão maiores concentrações de APO A-I após 3 (T1) e 6 meses (T2) de DC.
c) Crianças e adolescentes do grupo caso apresentarão menores concentrações de TBARS após 3 (T1) e 6 meses (T2) de DC.
d) Crianças e adolescentes do grupo caso apresentarão menor concentração de partículas pequenas de LDL e maior tamanho médio de LDL após 3 (T1) e 6 meses (T2) de DC.
e) Crianças e adolescentes do grupo caso apresentarão aumento nas subfrações de HDL após 3 (T1) e 6 meses (T2) de DC.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Comparar os efeitos da dieta cetogênica clássica com a dieta cetogênica modificada nas subfrações de LDL e HDL, nos marcadores oxidativos, no perfil de apolipoproteínas e no potencial terapêutico em crianças e adolescentes com epilepsia refratária.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para a consecução do objetivo geral, os seguintes objetivos específicos são propostos:

a. Caracterizar a amostra quanto aos aspectos demográficos (sexo, idade), scioeconômicos e clínicos (número de crises, fármacos antiepilépticos e outros);
b. Avaliar o consumo alimentar por meio de registro alimentar;
c. Avaliar o perfil antropométrico e classificar o estado nutricional (escore Z do índice de massa corporal para idade [ZIMC/I]);
d. Avaliar a composição corporal (percentuais de gordura, massa magra, água total e ângulo de fase);
e. Determinar a concentração de colesterol e triacilgliceróis, nas lipoproteínas (CT, TG, LDL e HDL);
f. Determinar a concentração de apolipoproteínas: APOA-1 e APO-B;
g. Detectar a concentração de corpos cetônicos no plasma (β-hidroxibutirato);
h. Determinar as subfrações de HDL, LDL e tamanho médio da partícula de LDL;
i. Avaliar a concentração de ácidos graxos não esterificados (NEFAS);
j. Avaliar a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA E DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo de intervenção com seguimento de 6 meses (GRADY et al., 2003), sendo a intervenção com DC clássica denominada grupo Controle e a intervenção com DC modificada denominada grupo Caso.

3.1.1 Recrutamento

As crianças e adolescentes foram recrutadas do Ambulatório de Dieta Cetogênica do ICr-HC-FMUSP (São Paulo, São Paulo) seguindo o mesmo padrão de recrutamento para ambos os grupos. O encaminhamento dos pacientes ao ambulatório foi otimizado 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 coorientadora deste projeto e 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). A coleta de dados foi iniciada após aprovação do Comitê de Ética da FSP-USP, sendo o ICr-HC-FMUSP a instituição coparticipante (**Anexo 2**). Este projeto também apresenta registro internacional no National Institutes of Health (Clinical Trial - NCT02644239) (**Anexo 3**).

As crianças e adolescentes incluídas nos grupos **Caso** (DC modificada) e **Controle** (DC clássica) seguiram o mesmo fluxo: 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 (**Figura 3**).

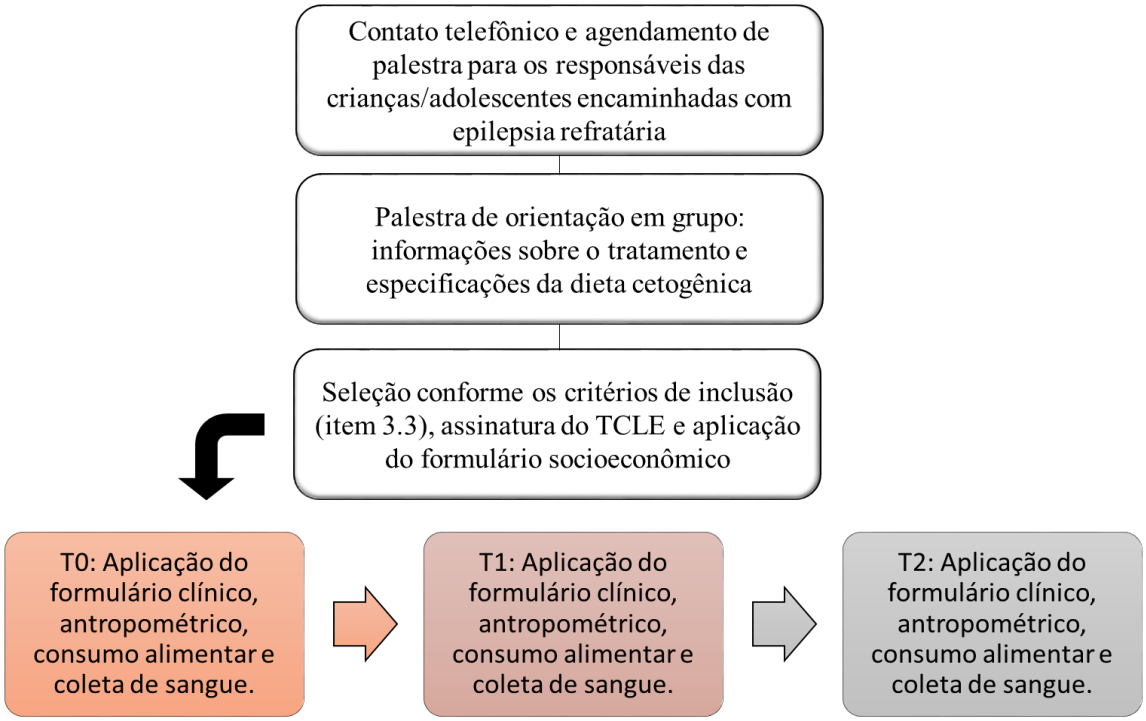


Figura 3: Delineamento do estudo nos diferentes momentos de monitoramento.

3.1.2 Descrição das Intervenções

O **grupo Controle** foi coletado durante o projeto de mestrado intitulado "Impacto da dieta cetogênica nas características oxidativas, físicas e lipídicas de lipoproteínas de crianças e adolescentes com epilepsia refratária" que contou com apoio da FAPESP sob o processo n° 2012/03775-0.

Este grupo de crianças e adolescentes com epilepsia refratária recebeu a dieta cetogênica clássica com protocolo padronizado pelo Instituto da Criança da FMUSP tendo como principais fontes de gorduras o creme de leite fresco, toucinho fresco, maionese industrializada, óleo vegetais em geral e orientação liberada para o consumo de carnes processadas e embutidos **(Anexo 4)**.

O **grupo Caso** foi coletado mais recentemente, durante o projeto de Doutorado e recebeu uma dieta cetogênica denominada modificada por apresentar redução em pelo menos 20% de gorduras saturadas, aumento > 50% da oferta de ácido graxo monoinsaturado, aumento >50% do teor de ácidos graxos poli-insaturados e redução da relação w6/w3 em pelo menos 50% em comparação a dieta clássica utilizada pelo grupo **Controle**.

Esta mudança no perfil de ácidos graxos foi otimizada especialmente pelo uso de uma formulação alimentícia rica em ácidos graxos mono e poli-insaturados e **sob registro de patente (RUSP 16.1.154.6.4)**, enriquecimento das preparações exclusivamente com óleo de canola ou azeite de oliva e uso mais frequente de carnes bovina não processada, aves e peixes em substituição a menor frequência de embutidos e carnes processadas (**Anexo 5**). No **Anexo 6** pode ser observado a estimativa na mudança do perfil de ácidos graxos ofertados pela DC modificada, quando comparada à DC clássica.

3.2 TAMANHO DA AMOSTRA

A amostra do estudo é de conveniência. Devido à baixa prevalência da epilepsia refratária e o Instituto da coleta de dado 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 (fármacos antiepilépticos) e com indicação para início do tratamento com a DC, respeitando-se os critérios de inclusão e não inclusão, encaminhados ao Ambulatório de Dieta Cetogênica do Instituto da Criança do HC-FMUSP. Considerando os dados estatísticos do Instituto da Criança, estimou-se que o tamanho amostral de 30 crianças/adolescentes para os **grupos Caso e Controle.**

3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E NÃO INCLUSÃO

3.3.1 Inclusão

Foram selecionadas crianças e adolescentes de ambos os sexos com idade de 1 a 19 anos, com diagnóstico de epilepsia refratária em politerapia medicamentosa (fármacos antiepilépticos) e indicação de tratamento com DC.

3.3.2 Não Inclusão

- Crianças e adolescentes que utilizavam qualquer tipo de reposição hormonal;
- Crianças e adolescentes que apresentavam diagnóstico de diabetes mellitus e hipotireoidismo ou hipertireoidismo;
- Crianças e adolescentes com ZIMC/I de magreza acentuada grau III
- Crianças e adolescentes que apresentavam doenças agudas e crônicas como cardiopatias e doenças renais que impedem 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 participantes do estudo recebessem um tratamento dietético terapêutico, ouseja, já seriam submetidos a esse tratamento pela dieta cetogênica clássica, no caso do grupo Caso, a única modificação foi a oferta de um perfil de gorduras da dieta possivelmente mais cardioprotetora. Sendo o risco considerado mínimo, e, portanto, todos os efeitos adversos eram constantemente monitorados pela equipe de saúde. Os benefícios resultantes da realização deste estudo basearam-se na identificação do impacto da qualidade das gorduras da DC no perfil lipídico, oxidação de lipoproteínas, parâmetros físicos das lipoproteínas e potencial terapêutico. Neste contexto, os benefícios para a população participante do estudo ainda são experimentais,

mas contribuirão com a conduta médica e/ou dietética no tratamento com a DC em crianças e adolescentes com epilepsia, sobretudo pelas modificações significativas na qualidade das lipoproteínas.

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 7**), permitindo a caracterização dos grupos estudados.

As faixas de classificação Socioeconômica apresentadas no **Anexo 7** 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 realizadas pela neuropediatra com base na classificação internacional proposta pelo ILAE, (2010). 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. Além desses aspectos, esta anamnese também permitiu a quantificação do número de crises.

3.6 CÁLCULO DA DIETA E PROTOCOLO DE ORIENTAÇÃO

O protocolo de orientação e planejamento dietético da instituição de coleta considerou as recomendações estabelecidas por FREEMAN et al., (1994) (**Tabela 1**). O peso ideal para ambos os grupos 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 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 dos **grupos Caso** e **Controle** incluídos no T0 passaram por todos os exames, sendo, em seguida, 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 = 27	27	1g x 4 Kcal/g = 4	27 + 4 = 31	2ª semana
4:1*	4g x 9 Kcal/g = 36	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

A orientação da dieta de ambos os grupos seguiu a distribuição de macronutrientes descrita na **Tabela 2,** respeitando a proporção de macronutrientes. O grupo **Controle** recebeu a DC clássica com maior aporte de gorduras saturadas, conforme protocolo adotado pelo ICr-HC-FMUSP e o grupo **Caso** recebeu a DC modificada com redução de pelo menos 20% das gorduras saturadas, otimizando uma oferta maior de gorduras monoinsaturadas e poli-insaturadas.

As calorias totais de ambos os grupos foram distribuídas em 4 refeições (café da manhã, almoço, merenda ou lanche noturno e jantar).

Grupo Controle - DC clássica – baseada em 4 refeições sendo a fonte de gordura de 2 refeições o toucinho fresco ou maionese industrializada e outras 2 refeições tendo o creme de leite fresco como fonte de gordura, além dos outros grupos alimentares:

carnes, hortaliças, frutas. Neste grupo foi orientado uso de óleo de soja e/ou azeite de oliva.

Grupo Caso - DC modificada – baseada em 4 refeições sendo a fonte de gordura de 2 refeições a **formulação alimentícia rica em ácidos graxos poli-insaturados e monoinsaturados, sob registro de patente (RUSP 16.1.154.6.4)** substituindo as refeições com toucinho/maionese ou as 2 refeições com creme de leite fresco. Os outros grupos alimentares permanecem na dieta (carnes, hortaliças e frutas), entretanto neste grupo foi orientado uso de óleo de canola e/ou azeite de oliva. Os pacientes do grupo Caso também receberam livro de receitas com preparações especificas contendo a formulação alimentícia. Todas as receitas foram desenvolvidas e testadas previamente pelos pesquisadores do projeto.

As bebidas permitidas nas DC clássica e modificada incluem 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 é 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) são inclusos apenas na DC 2:1.

A orientação da DC foi realizada por nutricionistas pesquisadoras do estudo, vinculados à Faculdade de Saúde Pública (FSP-USP) em conjunto com a Nutricionista do Ambulatório de Dieta Cetogênica (ICr-HC-FMUSP). Além dos critérios clínicos para inclusão de pacientes, a DC foi orientada somente para os responsáveis de crianças/adolescentes que atenderam os seguintes requisitos: presença do responsável pelo preparo da dieta, condições financeiras para 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 aderência à intervenção baseou-se no monitoramento da concentração de corpos cetônicos na urina realizado por meio de fita específica para cetonúria (*Accu-chek/Keto-diabur test do Laboratório Roche*®). Esse procedimento foi realizado domiciliarmente a partir da 2ª semana de introdução da dieta e sob a responsabilidade do cuidador da

criança/adolescente. A intensidade da cetose foi avaliada 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).

3.7 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA E COMPOSIÇÃO CORPORAL

Para avaliação antropométrica e de composição corporal foram aferidos peso (Kg), estatura (cm), composição corporal por bioimpedância elétrica.

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 ficam 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 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-se à 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.

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 olécrano, 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).

3.8 AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR

A avaliação do consumo alimentar foi realizada por meio da aplicação de três Registros Alimentares em cada momento do estudo (**Anexo 8**). 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 dieta cetogênica de ambos os grupos, visto que esses são 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 já possui como protocolo a indicação de uso de suplemento padrão a partir da 3ª semana de DC para todas as crianças e adolescentes. O uso desses suplementos foi monitorado, conforme **Anexo 7** e somado 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), selênio (mg), sódio (mg), zinco (mg) foram obtidos 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 são adicionados utilizando como referência as tabelas de composição de alimentos: Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO (2011) e PHILLIPI (2002).

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

Além do monitoramento da cetonúria por meio da fita de cetose, a adesão à dieta nos grupos **Caso** e **Controle** foi realizada por meio da detecção do β-hidroxibutirato no plasma, conforme descrito a seguir:

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) adicionou-se 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 adicionadas em placa para

Elisa Jet Biofil®, sendo a reação monitorada a 340 nm, a 37°C, em intervalos de 60 segundos, durante 3 minutos. 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.

Visando reforçar a adesão a intervenção, os responsáveis pelos pacientes foram contatados quinzenalmente por telefone ou e-mail, além de possuírem contato online com a equipe de pesquisadores para sanar eventuais dúvidas durante o tratamento.

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 demais análises no Laboratório de Nutrição Humana da FSP-USP, sendo a amostra de sangue distribuída entre os laboratórios (**Figura 4**).

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.

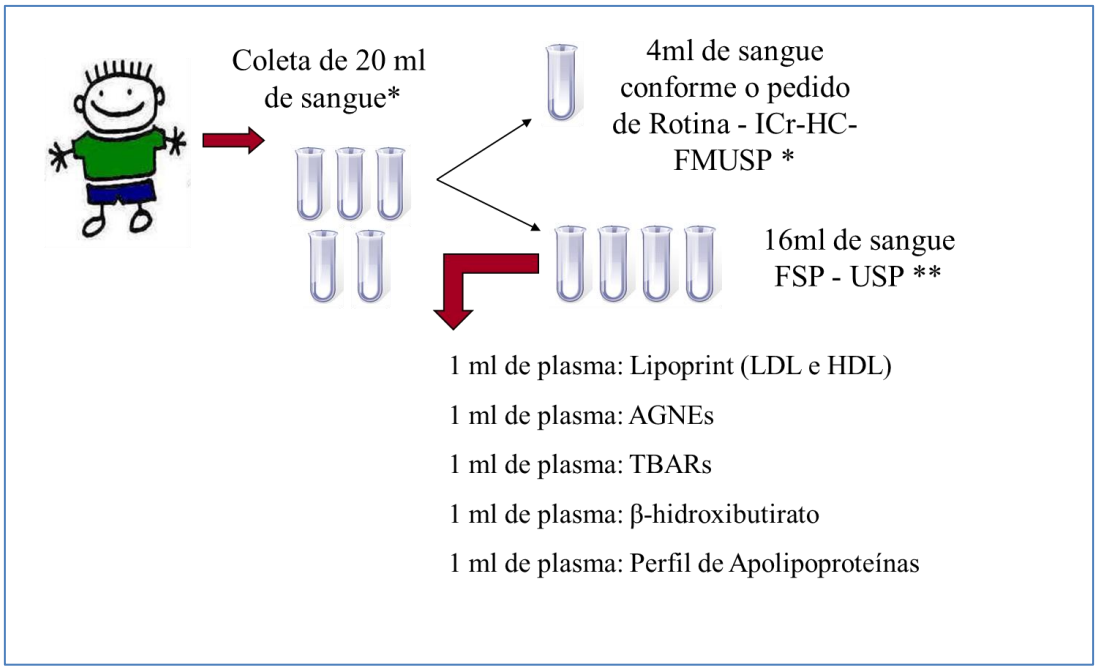


Figura 4 – Fracionamento de sangue e realização das análises no plasma. *****Realizado pelo Laboratório do Instituto da Criança do HC-FMUSP; ** Realizado pelo Laboratório de Nutrição Humana da FSP-USP.

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 em sistema automático *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.

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 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® **(Figura 5)**. Esse sistema utiliza 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 as intensidades 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 foi acrescentado aos tubos de gel, e posteriormente adicionados 200 µl da solução gel do Kit de LDL e 300 µl da solução gel do Kit de HDL. Após homogeneização e fotopolimerização das amostras por 35 minutos, as lipoproteínas foram separadas por eletroforese no intervalo de 1h a 3 mA.

Para LDL foram identificadas até 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 (≥ 26,8 nm), fenótipo intermediário (26,51 a 26,79 nm) e fenótipo B (≤ 26,5 nm). O fenótipo intermediário e B foram denominados fenótipo não-A.

Para HDL foram identificadas 10 subfrações (HDL-1 a HDL-10), 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.

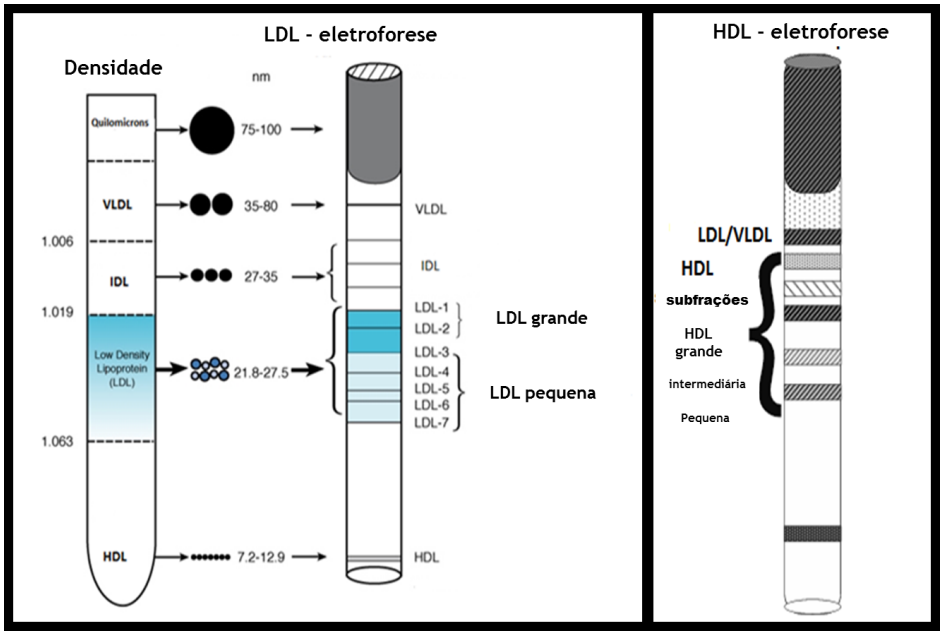


Figura 5 – Separação das subfrações de LDL e HDL pelo sistema Lipoprint System, Quantrimetrix®

3.15 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 foram 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

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio dos programas *Statistical Package for the Social Sciences*® (SPSS) versão 16 e R versão 3.3.2 (*The R Foundation for Statistical Computing, 2013*) com nível de significância adotado para todas as análises de $p<0,05$.

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 (X^2) e o teste Exato de Fisher para as comparações entre os grupos e modelos binomiais para comparar mudança de incidência.

A comparação entre o grupo **Caso** e grupo **Controle** referentes às mudanças observadas nas variáveis quantitativas: antropométricas, de composição corporal, bioquímicas e de consumo alimentar 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 fármacos antiepilépticos (FAEs).

O ajuste pela dosagem FAEs foi considerado nessas análises devido aos estudos apresentados na literatura, estes propõem associação positiva 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 e em cada grupo 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 Gaussiana e Gamma com função de ligação log, inversa e identidade, e teste de comparação múltipla com objetivo de verificar diferença significativa entre os grupos. Os valores foram apresentados na forma de média e desvio-padrão (DP). Para a comparação de variáveis qualitativas dicotômicas como percentual de incidência de dislipidemia e percentual de redução de crises foram utilizados modelos com distribuição binomial.

5. RESULTADOS

A coleta do **grupo Controle (DC clássica)** foi realizada no período de junho de 2012 a março de 2014 e a coleta do **grupo Caso (DC modificada)** no período de junho de 2015 a janeiro de 2017.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

No grupo Caso 51 pacientes compareceram à reunião sendo 41 crianças/adolescentes elegíveis enquanto no grupo Controle 52 pacientes compareceram à reunião e 38 crianças/adolescentes foram elegíveis. Entre o período basal e 3 meses de DC (T1) foram excluídos 16 pacientes do grupo Caso e 12 pacientes do grupo Controle. E entre o período T1 e 6 meses de DC, 5 pacientes foram excluídos do grupo Caso e 3 pacientes do grupo Controle (**Figura 6**). Portanto para análise dos resultados

foram considerados 25 pacientes do grupo Caso e 26 pacientes do grupo Controle que aderiram a DC até o terceiro mês.

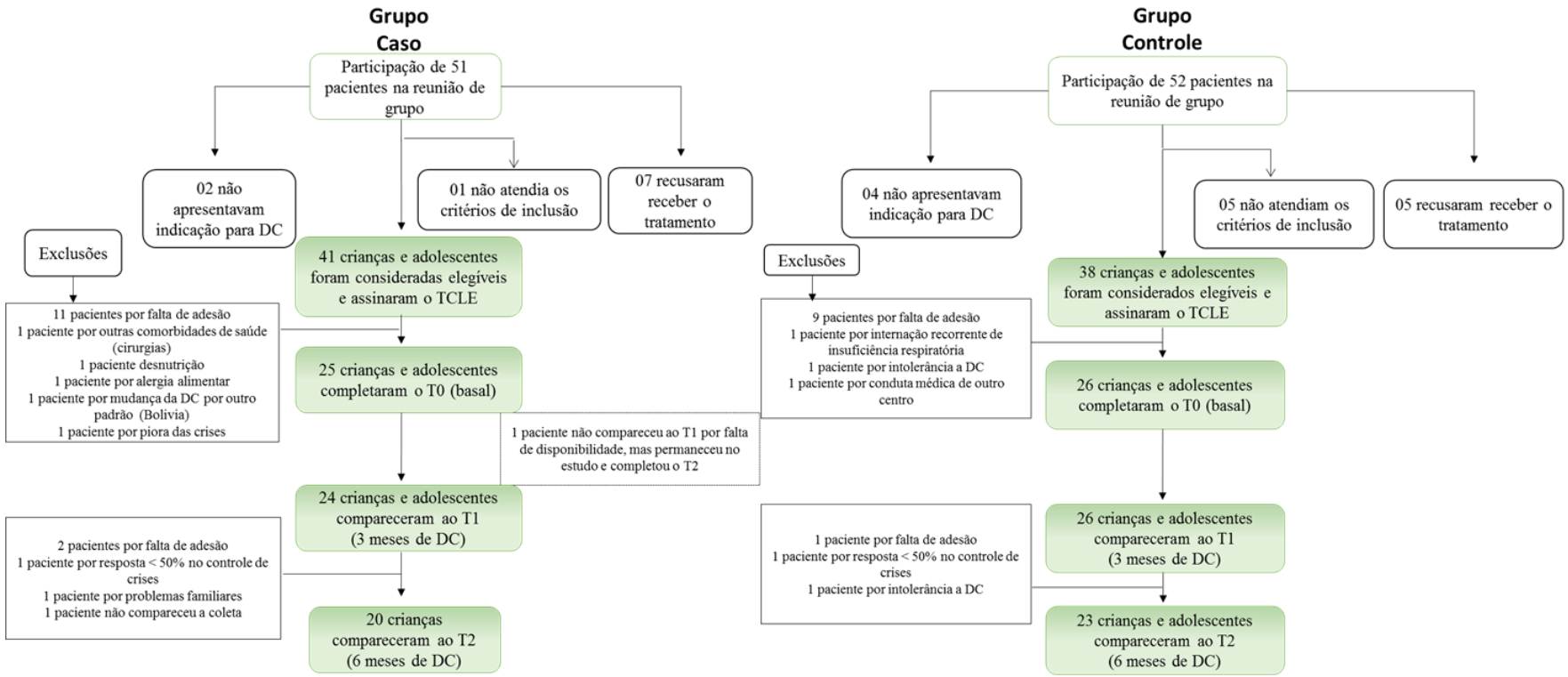


Figura 6: Fluxograma de pacientes inclusos e perdas no seguimento. TCLE: Termo de Consentimento Livre Esclarecido.

5.1.1 Perfil Socioeconômico e clínico

A média de idade dos pacientes do grupo Caso foi de 5,2 anos (1 a 15 anos) e do Controle foi de 6,5 anos (1,3 a 18 anos) (p=0,251).

A maioria dos pacientes era do sexo masculino em ambos os grupos (76%), sendo a raça branca predominante (grupo Caso = 48% e grupo Controle = 65,4%), embora o grupo Caso apresentou 44% dos pacientes pardos.

Segundo a Sociedade Brasileira de Pediatria (SBP, 2007), em relação ao peso de nascimento e idade gestacional, os grupos também eram semelhantes com 44% das crianças e adolescentes com peso adequado ao nascer no grupo Caso e 42,3% no grupo Controle, sendo que 76,9 e 72% dos pacientes nasceram com idade gestacional de 37 a 42 semanas, respectivamente (**Tabela 3**).

Para a maioria das crianças/adolescentes, a mãe foi a principal responsável por receber as orientações médicas, nutricionais e pelo preparo da dieta (grupo Caso = 80% e grupo Controle = 92,3%)

No grupo Caso, 76% dos responsáveis apresentou pelo menos o ensino médio completo, enquanto que no grupo Controle este percentual foi de 92,3%. Os dados de renda nas faixas medianas (R$ 1200,00 a 3000,00) foram mais representativos em ambos os grupos (grupo Caso = 60% e grupo Controle = 65,4%), entretanto 36 % do grupo Caso apresentou renda média mensal de R$ 600,00 a 1200,00.

A média do número de pessoas que moravam na mesma casa foi 4,3 (1,7) no grupo Caso e 3,7 (0,9) no grupo Controle (p=0,39). A quantidade média de crianças por domicílio foi de 1,9 (1,2) no grupo Caso e 1,4 (0,7) no grupo Controle (p=0,179). Portanto, não houve diferença significativa entre os grupos em nenhuma das características socioeconômicas e demográficas.

Considerando que o Instituto da Criança (ICr-HC-FMUSP) é um Centro de Referência Nacional, no grupo Caso, 8% dos pacientes eram de outros estados: 4% da Bahia e 4% do Maranhão; e embora 92% eram do estado de São Paulo, 48% residiam no interior, litoral ou ABC Paulista. Já no grupo Controle 23,1% das crianças e adolescentes eram de outros estados: 3,8% de Alagoas, 11,6% de Goiás, 7,7% de Pernambuco. E, 76,9% de São Paulo, sendo que 38,5% residiam no interior.

Tabela 3 – Caracterização socioeconômica e demográfica dos participantes. Instituto da Criança – HC-FMUSP, São Paulo, 2012-2017.

Variáveis	Grupo Caso n=25		Grupo Controle n=26		p
	n	%	n	%	
Sexo					
Masculino	19	76	20	76,9	0.938
Feminino	6	24	6	23,1	
Raça					0.438
Branca	12	48	17	65,4	
Negra	2	8	1	3,8	
Parda	11	44	8	30,8	
Peso ao nascer (g) *					0.751
Extremamente baixo: < 1000		-	1	3,8	
Baixo peso: < 2500	3	13,6	3	11,5	
Insuficiente: 2500 |─ 3000	8	36,4	7	26,9	
Adequado: 3000 |─ 4500	11	50	14	53,8	
Excessivamente grande: ≥ 4500	---	---	1	3,8	
Idade Gestacional (semanas)					0.687
Pré-termo: < 37	7	28	6	23,1	
Termo: 37 |─ 42	18	72	20	76,9	
Responsável pela dieta					0.432
Mãe	20	80	24	92,3	
Pai	3	12	1	3,8	
Avó	2	8	1	3,8	
Escolaridade do Responsável					0.082
Ensino Fundamental Incompleto	2	8	1	3,8	
Ensino Fundamental Completo	---	---	1	3,8	
Ensino Médio Incompleto	4	16	---	---	
Ensino Médio Completo	10	40	8	30,8	
Ensino Superior Incompleto	1	4	5	19,2	
Ensino Superior Completo	8	32	8	30,8	
Pós Graduação	---	---	3	11,5	
Renda familiar					0.093
< R$ 600	1	4	4	15,4	
R$ 600 |─| 1200	9	36	2	7,7	
R$ 1200 |─ 1800	6	24	6	23,1	
R$ 1800 |─ 3000	5	20	6	23,1	
R$ 3000 |─ 6000	4	16	5	19,2	
>R$ 6000	---	---	3	11,5	

Análise comparativa entre os grupos realizada pelo teste X^2 e Exato de Fisher com nível de significância de p<0,05. * 3 participantes do grupo caso não souberam informar o peso de nascimento.

A etiologia da epilepsia e síndromes epilépticas foram determinada pela neuropediatra com base em exames de imagem, exames genéticos, eletroencefalograma e avaliação clínica. Desta forma a distribuição percentual (%) das doenças de base associadas à epilepsia estão apresentadas na **Tabela 4**. Apesar de ambos os grupos apresentarem perfil heterogêneo, a maioria dos participantes apresentou etiologia desconhecida (grupo Caso = 32% e grupo Controle = 34,6%).

Tabela 4 – Etiologia da epilepsia ou Síndromes Epilépticas, segundo ILAE (2010). Instituto da Criança – HC-FMUSP, São Paulo, 2012-2017.

Etiologia da Epilepsia ou Síndromes Epilépticas	**Grupo Caso (n=25)** n (%)	**Grupo Controle (n=26)** n (%)
AVE perinatal	---	1 (3,8)
Deficiência GLUT-1	---	1 (3,8)
Mutação genética (gene PIGA)	1 (4)	---
Deleção cromossomo 2	---	1 (3,8)
Desconhecida	8 (32)	9 (34,6)
Displasia Cortical	3 (12)	2 (7,7)
Encefalopatia Hipóxia Isquêmica	---	2 (7,7)
Heterotopia Periventricular	---	1 (3,8)
Má formação do SNC	---	3 (11,5)
Sd Doose	2 (8)	3 (11,5)
Sd Pallister Killian	---	1 (3,8)
Sd Dravet	1 (4)	---
Sd Aicardi	1 (4)	---
Sd West	5 (20)	---
Sd Lennox Gastout	1 (4)	---
Sd Alcoólica Fetal	1 (4)	---
Sequela de meningite/encefalite	2 (8)	2 (7,7)

Sd: Síndrome; SNC: sistema nervoso central, AVE: acidente vascular encefálico

5.2 EFEITO DA DC NAS CRISES EPILÉPTICAS

A média do número de crises/dia do grupo Controle eram 12 (1 a 85 crises/dia) no tempo basal e após 3 meses de DC (T1) clássica o perfil foi reduzido para 4,6 (0 a 30 crises/dia), enquanto no grupo Caso, a média era de 15,4 (1 a 60 crises/dia) no tempo

basal, e passou a ser 3,5 (0 a 15 crise/dia), sendo a redução ao longo do tempo significativa em ambos os grupos e superior no grupo caso com redução média de 77.3% enquanto o grupo controle a redução média foi de 61.7% (**p<0,001**).

Após 6 meses de DC (T2) no grupo Caso a média de crises foi de 4,3 (0 a 25 crises dia e no grupo Controle de 3,4 (0 a 10 crises/dia), sem diferença significativa entre os grupos (p=0,266) (**Figura 7**).

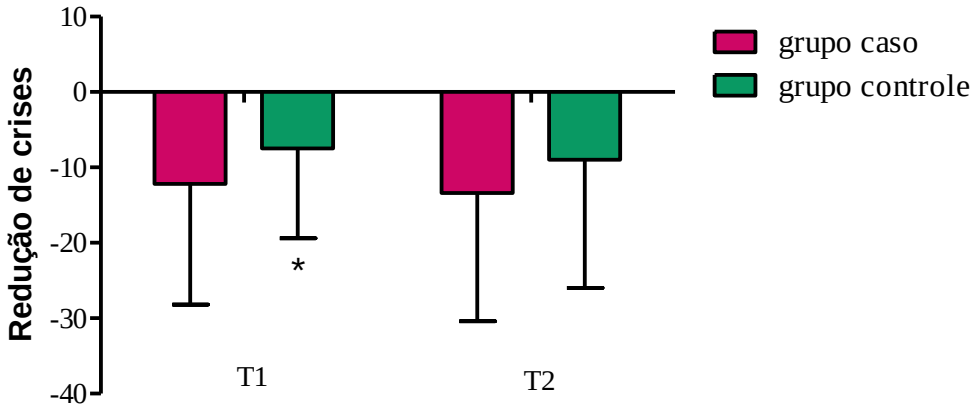


Figura 7: Redução média de crises diárias segundo grupo e tempo de intervenção. Instituto da Criança – HC-FMUSP, São Paulo, 2012-2017. *Diferença significativa no T1 caso vs controle (p<0,05).

Destaca-se que 40% (n=8) das crianças e adolescentes do grupo Caso ficaram livres de crises após os 6 meses de DC enquanto no grupo Controle 30% (n=7) dos pacientes ficaram livres de crises, apresentando diferença significativa entre os grupos apenas após os 3 meses de DC também na estratificação em percentual de redução (**Tabela 5**).

Tabela 5 – Percentual de redução de crises conforme grupo e tempo de intervenção. Instituto da Criança – HC-FMUSP, São Paulo, 2012-2017.

Redução de crises	Grupo Caso (n=25)		Grupo Controle (n=25)		Valor de p caso vs controle	
	T1	T2	T1	T2		
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	p (Δ%) T1-T0	p (Δ%) T2-T0
Redução <50%	5 (21)	6 (30)	9 (36)	7 (32)	0,123	0,625
Redução 50 a 90%	8 (33)	5 (25)	7 (28)	7 (32)	0,355	0,899
Redução >90%	11 (46)	9 (45)	9 (36)	8 (36)	**0,021**	0,569

n=25, não foi possível monitorar as crises de 1 criança do grupo Controle (crises acompanhadas por EEG). Comparações entre os grupos e ao longo do tempo avaliada pela técnica de Equações de Estimação Generalizadas (GEE) com distribuição binomial (p<0,05).

O uso de fármacos antiepilépticos (FAEs) apresentou redução significativa no grupo Caso em comparação ao grupo Controle apenas na quantidade de Carbamazepina (p=0,040), nenhum outro medicamento representou diferença entre os grupos. A redução na quantidade total de fármacos foi significativa ao longo do tempo em ambos os grupos, representando 51% de redução no grupo caso e 26% de redução no grupo Controle, porém sem diferença entre os grupos.

Ao longo do tempo, o uso do Topiramato foi reduzido no grupo Caso (p<0,001) bem como a Vigabatrina (p=0,038) e o Nitrazepam (p=0,038) no grupo Controle (**Tabela 6**). Todos os pacientes inclusos utilizavam pelo menos 2 FAEs em ambos os grupos. O Valproatro foi o FAE de uso mais frequente, sendo utilizada por 60% pacientes do grupo Caso e 62% dos pacientes do grupo Controle.

Tabela 6 – Frequência e dosagem de fármacos antiepilépticos (mg) utilizados pelos participantes segundo grupo e tempo de intervenção. Instituto da Criança – HC-FMUSP, São Paulo, 2012-2017.

FAEs	Grupo Caso					
	T0 (n=25)		T1 (n=24)		T2 (n=20)	
	n (%)	Posologia (mg)	n (%)	Posologia (mg)	n (%)	Posologia (mg)
Valprotato	15 (60)	588 (596)	14 (56)	503 (334)	11 (55)	435 (380)
Clobazam	9 (36)	24 (18)	7 (28)	23 (18)	7 (35)	26 (19)
Topiramato	10 (40)	155 (104)	7 (28)	100 (65)[a]	3 (15)	183 (76)[a]
Lamotrigina	11 (44)	117 (110)	9 (36)	105 (119)	4 (20)	138 (88)
Nitrazepam	6 (24)	14 (7)	6 (24)	16 (7)	5 (25)	20 (18)
Vigabatrina	3 (12)	750 (791)	2 (8)	875 (177)	2 (10)	750 (354)
Clonazepam	3 (12)	6 (8)	2 (8)	6 (4)	2 (10)	5.5 (3.5)
Levetiracetam	3 (12)	1317 (1037)	2 (8)	1000 (707)	2 (10)	688 (442)
Oxcarbamazepina	5 (20)	931 (672)	5 (20)	924 (632)	3 (15)	650 (312)
Fenobarbital	7 (28)	69 (64)	4 (16)	68 (37)	3 (15)	83 (29)
Etossuximida	3 (12)	967 (907)	1 (4)	600	---	---
Fenitoína	---	---	---	---	---	---
Pimidona	---	---	---	---	---	---
Carbamazepina	5 (20)	356 (181)	1 (4)	120[a,**]	---	---
Total (mg)	---	1150 (859)*	---	768 (573)[a]	---	563 (601)[a]
FAEs	**Grupo Controle**					
	T0 (n=26)		T1 (n=26)		T2 (n=23)	
	n (%)	Posologia (mg)	n (%)	Posologia (mg)	n (%)	Posologia (mg)
Valprotato	16(62)	1016 (795)	16(62)	777 (396)	16 (61,5)	591 (425)
Clobazam	14(54)	24 (22)	14(54)	21 (16)	14 (53,8)	31 (16)
Topiramato	10(39)	193 (127)	10(39)	153 (133)	10 (38,5)	315 (387)
Lamotrigina	9(35)	147 (74)	9(35)	144 (76)	9 (34,6)	142 (102)
Nitrazepam	6(24)	2 (4)	6(24)	2 (4)	6 (23,8)	1 (4)[a]
Vigabatrina	4(15)	1125 (595)	4(15)	1125 (595)	5 (19,2)	200 (274)[a]
Clonazepam	5(19)	5 (7)	5(19)	5 (3)	5 (19,2)	2 (4)
Levetiracetam	5(19)	1660 (1029)	5(19)	1150 (894)	5 (19,2)	1050 (1304)
Oxcarbamazepina	4(15)	1080 (831)	4(15)	825 (826)	3	1000 (917)
Fenobarbital	4(15)	60 (49)	4(15)	60 (49)	4 (15,4)	70 (48)
Etossuximida	3(12)	1000 (661)	3(12)	500 (500)	3 (11,5)	417 (382)
Fenitoína	1(4)	300	1(4)	300	1 (3,8)	300
Pimidona	1(4)	1000	1(4)	750	1 (3,8)	0
Carbamazepina	1(4)	400	1(4)	400	---	---
Total (mg)	---	1417 (1014)	---	1047(801)[a]	---	1050 (976)[a]

Comparações entre os grupos e ao longo do tempo avaliada pela técnica Equações de Estimação Generalizadas (GEE). Valores apresentados em média e desvio padrão. *Diferença significativa entre caso vs controle no período basal (T0),** Diferença significativa entre caso vs controle na posologia total T1-T0 (p=0,040), [a]Diferença significativa intragrupo T1 vs T0 ou T2 vs T0 (p<0,05).

5.3 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA E COMPOSIÇÃO CORPORAL

Para a classificação do estado nutricional, segundo o ZIMC/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 a classificação do estado nutricional tenha mudado significativamente no grupo Caso, esta variação não foi significativa entre ambos os grupos, exceto na avaliação da soma das dobras (**Tabela 7**).

Para a classificação da soma das dobras cutâneas 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). O grupo caso apresentou mudança na classificação da primeira categoria em 9 pacientes após T2 em comparação ao grupo Controle que se manteve semelhante ao período basal (p=0,047) (**Tabela 7**).

Tabela 7 – Classificação do estado nutricional conforme grupo e tempo de intervenção. Instituto da Criança – HC-FMUSP, São Paulo, 2012-2017.

Variáveis	Grupo Caso			Grupo Controle			Valor de p caso vs controle	
	T0 (n=25) n (%)	T1 (n=24) n (%)	T2 (n=20) n (%)	T0 (n=26) n (%)	T1 (n=23) n (%)	T2 (n=23) n (%)	p (Δ%) T1-T0	p (Δ%) T2-T0
Segundo ZIMC/I								
Magreza ou Eutrofia	17 (68)	14 (58,3)	10 (50)[a]	13 (50)	16 (61.5)	13 (56,5)	0,170	0,150
Risco de Sobrepeso ou Sobrepeso	8 (32)	9 (37,5)	9 (45)	6 (23)	3 (11.5)	6 (26,1)	0,365	0,875
Obesidade ou Obesidade Grave	---	1 (4.2)	1 (5)	7 (27)*	7 (27)	4 (17,4)	---	---
Segundo soma dobras (DCS+DCT)								
Desnutrição, risco de desnutrição ou normalidade	19 (76)	13 (54.2)[a]	10 (52,6)	13 (52)	9 (34.6)[a]	13 (56.5)	0,704	**0,047**
Risco de Obesidade	2 (8)	7 (29.2)[a]	4 (21,1)	5 (20)	8 (30.8)	5 (21.7)	0,260	0,345
Obesidade	4 (16)	4 (16.7)	5 (26,3)	7 (28)	9 (34.6)	5 (21.7)	0,670	0,140

Comparações entre os grupos e ao longo do tempo avaliada pela técnica de Equações de Estimação Generalizadas (GEE) com distribuição binomial ($p<0,05$). *Diferença significativa entre caso vs controle no período basal (T0), [a]Diferença significativa intragrupo T1 vs T0 ou T2 vs T0 ($p<0,05$).

Os dados de avaliação antropométrica e de composição corporal por bioimpedância estão apresentados na **Tabela 8**, sendo observadas mudanças significativas em vários parâmetros em ambos os grupos ($p<0,05$).

Tabela 8 – Caracterização antropométrica e composição corporal por bioimpedância elétrica conforme grupo e tempo de intervenção. Instituto da Criança – HC-FMUSP, São Paulo, 2012-2017.

Variáveis	Grupo Caso			Grupo Controle			Valor de p caso vs controle	
	T0 n=25	T1 n=24	T2 n=20	T0 n=26	T1 n=26	T2 n=23	p (Δ) T1-T0	p (Δ) T2-T0
Peso (Kg)	21,3 (10,5)	22 (11,5)	22 (10,9)	25,7 (16,4)	29,6 (22,1)	29,7 (21,9	0,302	0,466
Estatura (cm)	110 (21,6)	112 (21,8)[a]	111 (21)[a]	116,5 (24,2)	118,3 (23,9)[a]	119 (24,2)	0,226	0,532
IMC (Kg/m^2)	16,6 (2,4)	16,5 (2,4)	17 (2,5)	19 (5,5)	18,7 (6)	18,3 (5,9)	0,645	0,085
ZE/I	0,07 (1,8)	-0,47 (1,2)	-0,67 (1,3)	-0,23(1,3)	-0,34(1,2)	-0,58 (1,2)	0,390	0,410
ZIMC/I	0,21 (1,7)	0,17 (1,5)	0,62 (1,6)	0,93(1,5)	0,61(1,8)	0,39 (1,7)	0,323	**0,038**
R (Ω)	742 (121)	754 (184)	847 (163)[a]	729 (141,6)	760 (143,6)	776 (155,9)[a]	0,726	**0,048**
Xc (Ω)	57,9 (10)	56,7 (10)	66,9 (31)	58,8 (12,8)	68,1 (17,1)[a]	65,2 (28,7)	**0,002**	0,809
AF◦	4,6 (1)	4,3 (1,1)	4,5 (1,5)	4,7 (1,1)	5,4 (1,5)[a]	4,6 (1,3)	**<0,001**	0,860
% MCC	40,9 (4,4)	39,1 (3,3)	38 (3,1)	38,3 (5,5)	39,4 (7,1)	38,3 (5,8)	**0,001**	**<0,001**
% ME	43,9 (4,6)	43,2 (3,5)	41 (4,8)[a]	41,5 (5)	39,5 (6,7)	41,3 (4,8)	0,279	**0,023**
% MM	84,8 (8,5)	82,3 (6,4)	78 (8)[a]	79,8 (10)	79,7 (1,1)	79,6 (9,9)	0,111	**0,001**
% MG	15,2 (8,5)	17,7 (6,4)	22,2 (8)	20,2 (10)	20,1 (11)	20,4 (9,9)	0,094	**0,001**
% AI	72 (8,8)	72,3 (9,7)	72 (8,8)	69,3 (8,6)	70,8 (9,8)	68,7(8,8)	0,856	0,342
% AE	28 (8,9)	27,7 (9,7)	28 (8,8)	31,4 (9,1)	30,2 (11,8)	31,3 (8,8)	0,580	0,970
% ACTmm	80,3 (4,7)	79,7 (4,5)	78,2 (4)[a]	78,2 (6)	77,9 (6)	78,2 (5,5)	0,782	**0,001**
% ACTpeso	68,5 (10,1)	65,8 (8,1)[a]	61 (8,5)[a]	62,9 (12)	63,2 (12,9)	62,7 (11,4)	0,073	**<0,001**

Comparações entre os grupos e ao longo do tempo avaliada pela técnica de Equações de Estimação Generalizadas (GEE) (p<0,05). *Diferença significativa entre caso vs controle no período basal (T0), [a]Diferença significativa intragrupo T1 vs T0 ou T2 vs T0 (p<0,05). 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. IMC: índice de massa corporal; ZE/I: escore Z de estatura para idade; ZIMC/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.

Em comparação ao grupo Controle o grupo Caso apresentou aumento significativo no ZIMC/I e na Resistência (Ω) após 6 meses de DC (p=0,038; p=0,048, respectivamente). Além desses parâmetros houve diferença significativa entre os grupos em relação a reactância, ângulo de fase e % massa corporal celular (%MCC) após os 3 meses de DC. Após os 6 meses a diferença do % de MCC permaneceu significativa entre os grupos indicando redução no grupo Caso (p<0,001). O grupo Caso também apresentou redução de 8% no % de massa magra e aumento de 46% no % de massa gorda em comparação ao grupo Controle, bem como redução no % de água na massa magra e no % de água corporal total do peso (**Tabela 8**).

5.4 ADESÃO A DIETA CETOGÊNICA

5.4.1 Dieta Cetogênica

A prescrição energética não apresentou diferença significativa entre os grupos ao longo do tempo. Houve diferença significativa no grupo Controle após 3 e 6 meses (grupo controle T1prescrito=1633Kcal versus T1ingerido=1496Kcal, p=0,021; T2prescito=1577 Kcal versus T2ingerido=1449Kcal, p=0,012), enquanto o grupo Caso não apresentou diferença significativa ao longo do tempo (**Figura 8**).

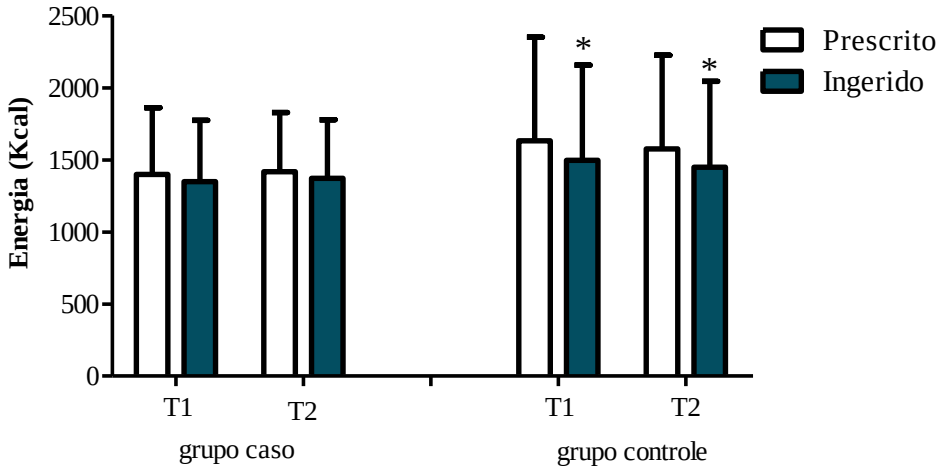


Figura 8: Prescrição e ingestão de energia segundo grupo e tempo de intervenção. *Diferença significativa intragrupos pela análise de GEE p<0,05.

Em relação à prescrição de lipídeos também não houve diferença significativa entre os grupos ao longo do tempo. Houve diferença significativa no grupo Caso apenas após 3 meses (T1prescrito=140g versus T1ingerido=129g, p=0,033); enquanto no grupo Controle houve diferença no T1 (163g versus 144g, p=0,004) e T2 (157g versus 141g, p=0,001) (**Figura 9**).

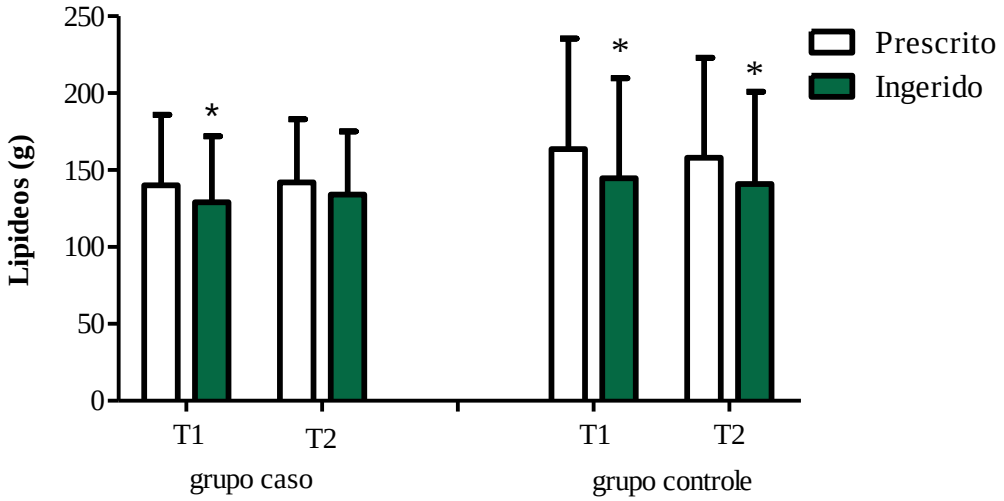


Figura 9: Prescrição e ingestão de lipídeos segundo grupo e tempo de intervenção. *Diferença significativa intragrupos pela análise de GEE p<0,05.

5.4. 2 Cetonúria e β-hidroxibutirato

Em relação à cetonúria observou-se que a maioria dos pacientes, exceto 2 do grupo Caso e 1 do grupo Controle, apresentaram estabilidade da cetose após introdução da DC com maior proporção de gordura (4:1). Portanto, apenas 3 pacientes apresentaram estabilidade com a dieta 3:1.

O aumento na produção de corpos cetônicos foi confirmado pelo monitoramento da concentração de β-hidroxibutirato plasmático cujos valores aumentaram significativamente com a DC em ambos os grupos em comparação ao período basal T0 ($p<0,001$). Os valores médios no grupo Caso foram: T0=0,9, T1=1,6 e T2=3,0 mmol/L, e no grupo Controle: T0=0,7, T1=2,7 e T2=3,1 mmol/L. Entretanto, na comparação entre os grupos a concentração foi menor no grupo Caso após 3 meses de DC em comparação ao grupo Controle (1,6 versus 2,7 mmol/L, $p<0,001$). Após 6 meses de DC não houve diferença significativa entre os grupos.

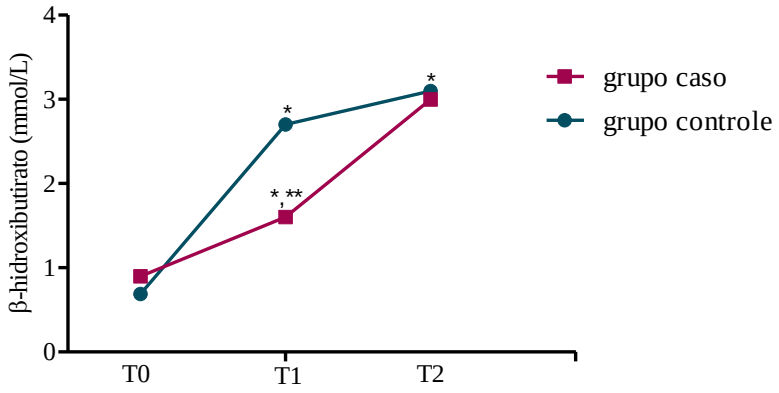


Figura 10: Detecção de β-hidroxibutirato. Comparações entre os grupos e ao longo do tempo avaliadas pela técnica de Equações de Estimação Generalizadas (GEE) ajustados por sexo, idade e dosagem total de fármacos antiepilépticos. Valores apresentados em média. *Diferença significativa em relação ao T0, ** Diferença significativa entre os grupos ($p<0,05$).

5.5 AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR

A média de energia (Kcal) em comparação ao grupo Controle foi significativamente menor no grupo Caso após 3 meses (p=0,033) e após 6 meses de DC não apresentou diferença significativa. Conforme característico da prescrição dietética houve redução ao longo do tempo para o consumo de proteínas, carboidratos, fibras e açúcares, além do aumento significativo no consumo de gorduras totais, sendo essas mudanças semelhantes entre os grupos. O consumo de colesterol apresentou diferença entre os grupos, sendo 52% superior no grupo Controle (p<0,05) (**Tabela 9**).

O consumo de ácidos graxos saturados (AGS), poli-insaturados (AGP) e monoinsaturados (palmitoil e oleico) foram diferentes entre os grupos. O grupo Caso apresentou consumo inferior entre 46-40% de AGS em relação ao grupo Controle (p<0,001, após 3 e 6 meses, respectivamente). O aumento de ácidos graxos teve como principal contribuinte o aumento de ácido graxo palmítico, sendo 42% superior no grupo Controle no T1 e T2 (p=0,005; p=0,012).

Tabela 9 – Caracterização do consumo de energia, macronutrientes, ácidos graxos e fibras, segundo grupo e tempo de intervenção. Instituto da Criança – HC-FMUSP, São Paulo, 2012-2017.

Variáveis	Grupo Caso (n=25)			Grupo Controle (n=26)			Valor de p caso vs controle	
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	p (Δ) T1-T0	p (Δ) T2-T0
	n=25	n=24	n=20	n=26	n=26	n=23		
Energia (Kcal)	1533 (561)	1348 (426)	1370 (408)	1323 (340)	1496 (662)	1450 (596)	**0,033**	0,098
Proteínas (g)	63 (29)	21 (9)[a]	21 (9)[a]	53 (16)	24 (14)[a]	22 (11)[a]	0,063	0,172
Carboidratos (g)	211 (105)	24 (13)[a]	19 (6,5)[a]	177 (48)	28 (9)[a]	22 (8)[a]	0,120	0,100
Açúcares (g)	84 (80)	10 (12)[a]	5,6 (3,4)[a]	63 (31)	5,3 (3,1)[a]	5 (2,3)[a]	0,310	0,200
Gordura Total (g)	51 (21)	129 (43)[a]	134 (41)[a]	46 (17)	145 (65)[a]	141 (60)[a]	0,136	0,339
Colesterol (mg)	160 (107)	301 (198)[a]	388 (166)[a]	140 (64)	496 (311)[a]	487 (232)[a]	**0,004**	**0,050**
Fibras (g)	11 (6)	3,4 (1,3)	2,9 (0,8)[a]	12 (4,6)	3,2 (1,2)[a]	3,1 (1,4)[a]	0,528	0,663
Ácidos graxos trans (g)	0,94 (1,2)	0,32 (0,1)[a]	0,34 (0,2)[a]	0,63 (0,7)	0,32 (0,4)	0,4 (0,6)	0,243	0,228
AGS (g)	15,8 (4,9)	35,9 (13,3)[a]	39,8 (12,4)[a]	15 (7)	58 (30)[a]	57 (29)[a]	**<0,001**	**<0,001**
16:0 Palmítico (g)	4,2 (3)	9,5 (7)[a]	9,7 (7,7)[a]	4,2 (2,8)	16,5 (11)[a]	17 (12)[a]	**0,005**	**0,012**
18:0 Esteárico (g)	1,6 (1)	4,6 (3,6)[a]	4,8 (4,2)[a]	1,8 (1,4)	8,1 (5,7)[a]	8,4 (6,2)[a]	**0,009**	**0,026**
AGP (g)	5,8 (3,4)	21,8 (8,5)[a]	21 (8,6)[a]	4,8 (4,1)	12,1 (7)[a]	12 (6,6)[a]	**<0,001**	**<0,001**
18:2 Linoleico (g)	4,3 (2,7)	15 (6,3)[a]	14,8 (6,3)[a]	3,6 (2,7)	10,5 (6,5)[a]	10,2 (5,8)[a]	**0,049**	**0,039**
18:3 Linolênico (g)	0,6 (0,8)*	6 (2,3)[a]	5,7 (2)[a]	0,4 (0,2)	1,4 (1)[a]	1,3 (0,8)[a]	**<0,001**	**<0,001**
20:4 Araquidônico (g)	0,08 (0,09)*	0,12 (0,09)	0,15 (0,1)[a]	0,05 (0,04)	0,2 (0,2)[a]	0,2 (0,1)[a]	**<0,001**	**<0,001**

Continua

Variáveis	Grupo Caso (n=25)			Grupo Controle (n=26)			Valor de p caso vs controle	
	T0 n=25	**T1** n=24	**T2** n=20	**T0** n=26	**T1** n=26	**T2** n=23	**p (Δ) T1-T0**	**p (Δ) T2-T0**
20:5 EPA (mg)	5,6 (17)	3 (11,8)	38 (46)[a]	4,3 (15)	13,6 (23)	7,8 (18,7)	0,089	**0,021**
22:6 DHA (mg)	29 (66)	21,8 (22)	39 (50)	13,1 (18)	57,6 (69)[a]	39,3 (59)[a]	**0,012**	**0,460**
ômega 3 (g)	0,9 (1,3)	6,1 (2,3)[a]	5,8 (2,2)[a]	0,8 (1,3)	1,2 (0,7)	1,2 (0,7)	**<0,001**	**<0,001**
ômega 6 (g)	4,6 (3)	15 (6,4)[a]	15 (6,4)[a]	3,9 (3)	10,7 (6,6)[a]	10,4 (6)[a]	0,056	**0,042**
ômega 6/ômega 3	8 (3)	2,4 (0,3)[a]	2,7 (1)[a]	13,4 (38)	8,9 (2,2)	8,8 (2,4)	0,94	0,97
AGM (g)	12,3 (9,4)*	54,8 (24)[a]	53,2 (23,8)[a]	9,8 (6,6)	38 (24)[a]	38 (24)[a]	**0,031**	0,067
16:1 Palmitoil (g)	0,4 (0,3)	0,9 (0,8)[a]	1 (1)[a]	0,7 (0,6)	2 (1,4)[a]	2,1 (1,6)[a]	**0,008**	**0,029**
18:1 Oleico (g)	9,1 (7,9)	52 (23)[a]	50 (22)[a]	7,3 (5,2)	35 (22)[a]	35 (22)[a]	**<0,001**	**<0,001**

Comparações entre os grupos e ao longo do tempo avaliada pela técnica de Equações de Estimação Generalizadas (GEE) ($p<0,05$). *Diferença significativa entre caso vs controle no período basal (T0), [a]Diferença significativa intragrupo T1 vs T0 ou T2 vs T0 ($p<0,05$). Valores apresentados em média e desvio padrão referentes ao consumo alimentar ajustados pelo MSM. AGS: ácidos graxos saturados; AGP: ácidos graxos poli-insaturados; AGM: ácidos graxos monoinsaturados; EPA: ácido graxo eicosapentaenoico; DHA: ácido graxo docosaexaenoico.

Em relação aos AGPs, embora não significante, a razão ômega 6/ômega 3 foi 70% menor no grupo Caso em relação ao grupo Controle. Essa redução pode ser atribuída especialmente ao consumo superior de ômega 3 pelo grupo Caso ($p<0,001$) já esperado pela mudança na qualidade de ácidos graxos nesta intervenção.

O AGM Oleico foi significativamente diferente entre os grupos após 3 e 6 meses ($p<0,001$, T1 e T2), sendo o consumo superior em 43% no grupo Caso.

Destaca-se que embora não houve diferença entre os grupos, o grupo Caso apresentou redução significativa de ácidos graxos trans ao longo do tempo ($p=0,006$; $p=0,008$, respectivamente). Todos os parâmetros referentes ao consumo de ácidos graxos estão apresentados na **Tabela 9**.

A **Tabela 10** 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 para o ajuste posterior pelo MSM.

As vitaminas lipossolúveis apresentaram aumento significativo para vitamina A, vitamina K e vitamina E ao longo do tempo em ambos os grupos, sem diferença signiticativa entre os grupos, exceto a vitamina E que foi superior no grupo Caso em cerca de 96% após os 3 meses de DC e 128% após os 6 meses ($p<0,001$ em T1 e T2). Já as vitaminas do complexo B não apresentaram mudança significativa entre os grupos, mas apresentaram algumas mudanças significativas ao longo do tempo. Não foi observada diferença para os antioxidantes α e β-caroteno, bem como para o licopeno.

O consumo de cálcio apresentou diminuição significativa ao longo da intervenção, sendo a redução semelhante entre os grupos, aproximadamente 57% no grupo Caso e 54% no grupo Controle após 6 meses de DC. O sódio também apresentou redução ao longo do tempo, sem diferenças entre os grupos, sendo 75% inferior ao T0 no grupo caso e 70% inferior ao T0 no grupo Controle.

Tabela 10 – Caracterização do consumo de micronutrientes (vitaminas, antioxidantes e minerais) segundo grupo e tempo de intervenção. Instituto da Criança – HC-FMUSP, São Paulo, 2012-2017.

Variáveis	Grupo Caso (n=25)			Grupo Controle (n=26)			Valor de p caso vs controle	
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	p (Δ) T1-T0	p (Δ) T2-T0
	n=25	n=24	n=20	n=26	n=26	n=23		
Vitamina A (mg RE)	665 (462)	1116 (234)[a]	1162 (289)[a]	544 (410)	1065 (410)[a]	1242 (379)[a]	0,630	0,190
Vitamina D (μg)	35 (112)	5,3 (1)	5,5 (1,4)	16,7 (70)	2,9 (2,9)	4,6 (4,8)	0,550	0,490
Vitamina E (mg)	4 (4)	19 (4,3)[a]	18,3 (4,5)[a]	3 (2,2)	8,3 (9,4)[a]	9,3 (5,3)[a]	**<0,001**	**<0,001**
Vitamina K (μg)	56 (63)	151 (43)[a]	158 (64)[a]	41 (47)	86,9 (57)[a]	121 (127)[a]	**0,0160**	0,447
Vitamina B1 (mg)	0,9 (0,6)	1,4 (0,3)[a]	1,4 (0,4)[a]	0,9 (0,5)	1,2 (0,7)	1,4 (0,7)	0,298	0,975
Vitamina B2 (mg)	1,2 (0,9)	1,7 (0,3)[a]	1,7 (0,4)[a]	1 (0,6)	1,2 (0,7)	1,5 (0,7)[a]	0,259	0,804
Vitamina B3 (mg)	15 (11)	19 (4)	19 (4,9)	10,6 (6)	14,7 (9)	19 (9,4)[a]	0,963	0,273
Vitamina B6 (mg)	1,3 (0,9)	1,6 (0,3)	1,6 (0,3)	1 (0,4)	1,2 (0,7)	1,4 (0,7)[a]	0,813	0,779
Vitamina B12 (μg)	3,5 (3,5)	3,5 (0,7)	3,9 (1,2)	2,2 (1,6)	3,4 (2,2)[a]	3,7 (2,2)[a]	0,299	0,199
Vitamina C (mg)	190 (326)*	83 (24)	70 (15,5)	63 (46)	49,9 (20)	64 (31,7)	0,154	0,065
Folato (μg)	141 (83)	287 (49)[a]	286 (56)[a]	157 (102)	135 (122)	187, 4 (134)	**<0,001**	**0,001**
α-caroteno (μg)	1803 (5876)	2085 (2950)	2436 (2835)	535 (864)	497 (737)	515,1 (539)	0,826	0,679
β-caroteno (μg)	2036 (3693)	2060 (1172)	1875 (1314)	1255 (1370)	1557 (909)	1992 (1329)	0,732	0,314
Licopeno (μg)	962 (1172)	859 (1103)	1210 (2392)	1463 (1493)	685 (317)	869 (651)	0,122	0,189
Cálcio (mg)	822 (636)	348 (119)[a]	360 (139)[a]	845 (508)	332 (339)[a]	385 (265)[a]	0,824	0,970

Continua

Variáveis	Grupo Caso (n=25)			Grupo Controle (n=26)			Valor de p caso vs controle	
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	p (Δ) T1-T0	p (Δ) T2-T0
	n=25	n=24	n=20	n=26	n=26	n=23		
Ferro (mg)	22 (33)	10 (1,7)	10,3 (2,2)	13,5 (13,7)	7,6 (5)	8,4 (4,2)	0,389	0,329
Zinco (mg)	9,3 (7,8)	9,1 (1,4)	9,5 (1,9)	8,3 (6,6)	6,5 (5,2)	8,2 (5)	0,536	0,894
Selënio (mg)	54 (31)*	45 (11)	52 (15)	41 (21)	51,8 (36)	45,3 (26)	**0,037**	0,504
Sódio (mg)	1866 (767)	593 (344)[a]	465,6 (265)[a]	1695 (722)	619 (394)[a]	524 (279)[a]	0,280	0,210

Comparações entre os grupos e ao longo do tempo avaliada pela técnica de Equações de Estimação Generalizadas (GEE) ($p<0,05$). *Diferença significativa entre caso vs controle no período basal (T0), [a] Diferença significativa intragrupo T1 vs T0 ou T2 vs T0 ($p<0,05$). Valores apresentados em média e desvio padrão referentes ao consumo alimentar ajustados pelo MSM.

5.6 PERFIL BIOQUÍMICO

O aumento na concentração de CT e LDL foi inferior no grupo Caso em 221% e 454%, respectivamente, após 6 meses de DC em relação ao grupo Controle (**Tabela 11**). Da mesma forma foi observado aumento significativo, 333% maior no grupo Controle em comparação ao grupo Caso sob a concentração de HDL (p=0,040), porém no período T2 não foi observada mudança significativa.

Assim como a HDL, no período T1, a concentração de APOB foi superior no grupo Controle, em 150% (p=0,019).

Quando as razões entre as lipoproteínas foram avaliadas a Não-HDL manteve-se significativamente menor no grupo Caso ao longo do tempo em comparação ao grupo Controle, em 393% (p=0,001) e 195% (p=0,004), respectivamente. As razões CT/HDL, LDL/HDL e APOB/APOA foram diferentes entre os grupos, representando redução no grupo Caso, apenas no período T1 (p=0,038, p=0,023 e p=0,001, respectivamente). E a relação LDL/APOB foi significativamente superior no grupo Controle apenas no período T2 (p=0,019).

Tabela 11 – Perfil bioquímico segundo grupo e tempo de intervenção. Instituto da Criança – HC-FMUSP, São Paulo, 2012-2017.

Variáveis	Grupo Caso			Grupo Controle			Valor de p caso vs controle	
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	p (Δ)	p (Δ)
	n=25	n=24	n=20	n=26	n=26	n=23	T1-T0	T2-T0
CT (mg/dL)	163 (34)	181 (55)[a]	186 (62)[a]	156 (28)	242 (85)[a]	230 (81)[a]	**<0,001**	**0,017**
TG (mg/dL)	72 (28)	84 (35)[a]	108 (51)[a]	81 (37)	103 (49)[a]	119 (88)[a]	0,290	0,930
LDL-C (mg/dL)	104 (32)*	119 (49)[a]	115 (50)[a]	91 (21)	160 (75)[a]	152 (70)[a]	**<0,001**	**0,004**
HDL-C (mg/dL)	53 (16)	56 (14)[a]	54 (21)[a]	48 (13)	61 (19)[a]	58 (17)[a]	**0,040**	0,190
APO A-I (mg/dL)	148 (36)*	186 (47)[a]	171 (6)[a]	119 (17)	143 (34)	140 (30)	0,240	0.71
APO B (mg/dL)	96 (27)	116 (49)[a]	120 (39)[a]	89 (15)	139 (55)[a]	138 (59)[a]	**0,019**	0,098
CT/HDL-C	3.5 (1,8)	3,4 (1)[a]	3,8 (1,5)	3,5 (1,4)	4,3 (2,0)[a]	4,4 (2,6)	**0,038**	0,339
LDL-C/HDL-C	2,3 (1,5)	2,2 (0,9)[a]	2,4 (1,2)[a]	2,1 (1,1)	2,9 (1,7)[a]	2,9 (2)[a]	**0,023**	0,1632
Não-HDL-C	110 (34)	126 (51)[a]	132 (59)[a]	107 (24)	181 (86)[a]	172 (83)[a]	**<0,001**	**0,004**
TG/HDL-C	1,8 (1,8)	1,6 (0,9)	2,5 (1,8)	1,9 (1,7)	1,9 (1,4)	2,6 (3,2)	0,62	0,94
HDL/APO A-I	0,4 (0,1)	0,3 (0,1)	0,3 (0,1)	0,4 (0,1)	0,4 (0,1)	0,4 (0,1)	**0,036**	0,136
LDL/APOB	1,1 (0,2)	1,1 (0,4)	1,0 (0,3)	1,0 (0,2)	1,1 (0,2)[a]	1,1 (0,1)[a]	0,261	**0,019**
APOB/APO A-I	0,6 (0,2)	0,6 (0,2)	0,8 (0,3)[a]	0,8 (0,2)	1 (0,4)[a]	1 (0,6)[a]	**0,001**	0,140
AGNE (mmol/L)	0,75 (0,4)	1,1 (0,5)[a]	1,1 (0,5)[a]	0,82 (0,9)	1,1 (0,5)[a]	1,6 (0,5)[a]	0,645	0,126
TBARS (µmol/mL)	21,3 (3,8)	21,1 (6)	20,9 (6)	22,9 (6)	23,2 (7)	22,8 (5,6)	0,830	0,930
LDL grande (%)	39,4 (14)	47,9 (22)[a]	50,2 (22)[a]	44 (12,5)	87,5(40,9)[a]	71,9(27,2)[a]	**<0,001**	**0,038**
LDL pequena (%)	3,44 (3)	10,3 (6,4)[a]	8,7 (6,6)[a]	1 (1,2)	9,2(10,2)[a]	17,3(22,8)[a]	0,598	**0,021**
LDL (nm)	26,8 (3,4)*	26,4 (3,8)[a]	26,6 (3,8)[a]	27,3(1,8)	27(3,3)[a]	26,7(5,8)[a]	0,138	**0,036**

Continua

Variáveis	Grupo Caso			Grupo Controle			Valor de p caso vs controle	
	T0 n=25	T1 n=24	T2 n=20	T0 n=26	T1 n=26	T2 n=23	p (Δ) T1-T0	p (Δ) T2-T0
HDL grande (%)	31,8 (9,4)	29,5 (6,9)	27,3 (8)[a]	27,3(7,7)	29,4(9)	30,4(10)	0,181	**0,017**
HDL intermediária (%)	48,2 (6,2)	42,1 (4,4)[a]	42,5 (5,5)[a]	51,9(6,5)	47,3(6,9)[a]	50,8(7,5)	0,415	**0,050**
HDL pequena (%)	20 (7,5)	28,3 (5,2)[a]	30,2 (6,2)[a]	20,7(6,6)	23,3(8,4)[a]	18,8 (8,4)	**0,006**	**<0,001**

Comparações entre os grupos e ao longo do tempo avaliada pela técnica Equações de Estimação Generalizadas (GEE) ajustados por sexo, idade e dosagem total de fármacos antiepilépticos. Valores apresentados em média e desvio padrão. *Diferença significativa entre caso vs controle no período basal (T0), [a]Diferença significativa intragrupo T1 vs T0 ou T2 vs T0 ($p<0,05$).

A concentração de AGNEs no plasma foi numericamente superior no grupo Controle no período T2, porém não houve diferença significativa entre os grupos (p>0,05). Perfil semelhante foi observado com o marcador de peroxidação lipídica, TBARS, entretanto não houve mudança significativa comparando-se o grupo Caso com o grupo Controle (**Tabela 11**).

Os resultados nas mudanças das subfrações de LDL indicaram aumento das partículas grandes de LDL em 411% e 158%, após 3 e 6 meses, no grupo Controle em comparação ao grupo Caso (p=0,001, p=0,038, respectivamente). O % de partículas pequenas de LDL também apresentou aumento significativo superior em 208% no grupo Controle em comparação ao grupo Caso. E consequentemente, o tamanho médio da LDL (nm) apresentou diferença entre os grupos com redução superior no grupo Controle em 200% (**Tabela 11**).

As subfrações de HDL também apresentaram mudanças entre os grupos e ao longo do tempo. O grupo Caso apresentou redução significativa no % de partículas grandes de HDL em 14% em comparação ao grupo Controle que apresentou aumento dessas partículas em 11% após os 6 meses de DC (p=0,017). De modo contrário, as partículas pequenas de HDL apresentaram aumento no grupo Caso de 10% no % de HDL pequenas, enquanto o grupo Controle apresentou redução de 2% na quantidade dessas subfrações indicando diferença significativa entre os grupos (p<0,001).

Além desses resultados associados a variáveis contínuas, observamos também mudança na variável categórica relacionada a qualidade da partícula de LDL que representa a classificação pela média do tamanho de LDL. No grupo Caso, já havia 40% dos pacientes classificados como fenótipo não-A, enquanto no grupo Controle 100% dos participantes apresentavam fenótipo A no T0, no T1 83,3% dos pacientes foram classificados em fenótipo não-A no grupo Caso e no grupo Controle 30,7% dos participantes migraram para fenótipo não-A, no T2 houve redução e 75% dos pacientes foram classificados em fenótipo não-A e aumento do fenótipo não-A no T2, sendo 52,1% dos participantes no grupo Controle.

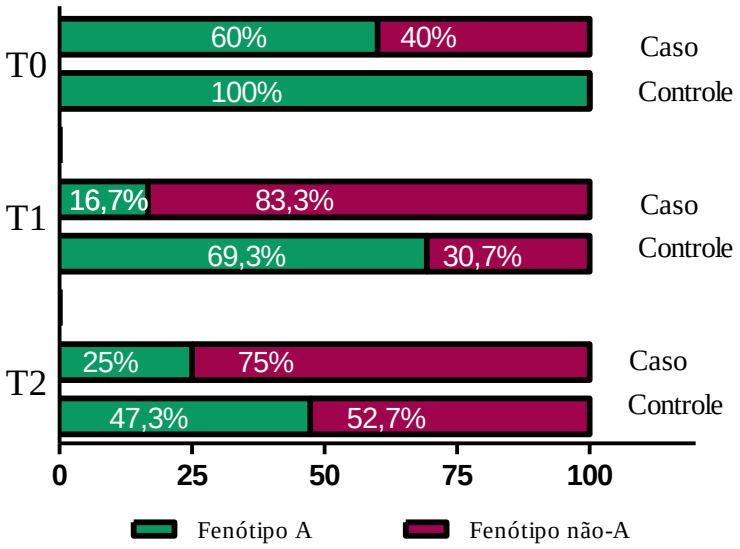


Figura 11: Mudança de fenótipo segundo grupo e tempo de intervenção. Instituto da Criança – HC-FMUSP, São Paulo, 2012-2017.

Considerando os parâmetros para dislipidemia pela Academia Americana de Pediatria (2011), mudanças significativas entre os grupos foram observadas sob o ponto de corte de LDL-C ≥ 130 mg/dL, sendo a incidência maior no grupo Controle após 3 e 6 meses de DC (p=0,021;p=0,05, respectivamente). Resultados semelhantes foram observados sob a incidência no ponto de corte por não HDL-C ≥ 145 mg/dL, o grupo Caso teve 2 novos casos de dislipidemia e o grupo Controle 11 casos novos após 6 meses (p=0,033).

Não foram observadas diferenças entre os grupos adotando-se os pontos de corte de CT e TG, entretanto ambos apresentaram aumento significativo após 6 meses de DC na incidência de hipertrigliceridemia (p<0,05), e apenas o grupo Controle apresentou mudanças ao longo do tempo na incidência de hipercolesterolemia (p<0,05) (**Tabela 12**).

Tabela 12 – Frequência de dislipidemia segundo parâmetros da Academia Americana de Pediatria segundo grupo e tempo de intervenção. Instituto da Criança – HC-FMUSP, São Paulo, 2012-2017.

Variáveis	Grupo Caso (n=25)			Grupo Controle (n=26)			Valor de p caso vs controle	
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	p T1-T0	p T2-T0
	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)		
CT ≥ 200 mg/dL	6 (24)	9 (39,1)	7 (30)	3 (11,5)	13 (50)[a]	12 (52,2)[a]	0,074	0,119
TG ≥ 100 mg/dL ou ≥ 130 mg/dL[b]	2 (8)	6 (26,1)	10 (50)[a]	5 (19,2)	6 (23,1)	11 (47,8)[a]	0,460	0,394
LDL-C ≥ 130mg/dL	4 (16)	11 (47,8)[a]	6 (30)	1 (3,8)	16 (61,5)[a]	10 (43,5)[a]	**0,021**	**0,05**
não HDL-C ≥ 145 mg/dL	4 (16)	10 (43,5)[a]	6 (30)[a]	2 (7,7)	16 (61,5)[a]	13 (56,5)[a]	**0,049**	**0,033**

[b]TG≥ 100 mg/dL: 0 a 9 anos; TG≥ 130 mg/dL: 10 a 19 anos. Comparações entre os grupos e ao longo do tempo avaliada pela técnica de Equações de Estimação Generalizadas (GEE) com distribuição binomial e ajustados por sexo, idade e dosagem total de FAEs($p<0,05$).
*Diferença significativa entre caso vs controle no período basal (T0), [a]Diferença significativa intragrupo T1 vs T0 ou T2 vs T0 ($p<0,05$).

6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos corroboram com a hipótese inicial do trabalho de que o grupo Caso apresentaria melhor perfil dos parâmetros cardiometabólicos e maior potencial terapêutico em comparação ao grupo Controle. Entretanto, alguns parâmetros não apresentaram mudanças significativas entre os grupos, ou essas diferenças foram observadas apenas em um dos períodos avaliados, período de resposta mais agudo a DC (3 meses de DC: T1) ou período mais crônico (6 meses de DC: T2).

Em relação ao perfil lipídico clássico observamos menor aumento nas concentrações de CT e LDL no grupo Caso em comparação ao grupo Controle em ambos os períodos avaliados. Este aumento na concentração de CT foi 2,2 vezes maior no grupo Controle e na concentração de LDL 4,5 vezes maior que no grupo Caso.

Perfil lipídico semelhante ao observado no grupo Controle foi descrito por diversos autores (LIU et al., 2003; KWITEROVICH et al., 2003; GROSBECK et al., 2006; NIZAMUDDIN et al., 2008; TUMAS et al., 2010; ZAMANI et al., 2015, DOKSOZ et al., 2015). Entretanto, esses estudos não descreveram a composição de ácidos graxos da dieta cetogênica utilizada na intervenção, exceto o estudo de LIU et al., de 2013. Esse fato dificulta comparações entre esses resultados e os observados no presente estudo.

Outra fração de lipoproteínas crescentemente analisada, a não-HDL, 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 (AAP, 2011). Esta fração, em nosso estudo mostrou-se significativamente menor no grupo Caso ao longo do tempo em comparação ao grupo Controle.

Diferente desses parâmetros, os resultados das relações das lipoproteínas, CT/HDL, LDL/HDL e APOB/APOA não foram homogêneos ao longo do tempo sendo menores no grupo Caso apenas após 3 meses de DC, exceto a LDL/APOB que foi superior no grupo Controle apenas após os 6 meses de DC. Estes resultados devem

estar associados ao aumento superior no grupo Controle da concentração de HDL e APOB no período mais agudo da DC.

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, em ambos os grupos e aparentemente superior no grupo Controle, nossos resultados não mostraram diferença significativa entre os grupos ou nas comparações intragrupo.

Em nossa hipótese inicial também esperava-se encontrar uma concentração maior de APOA-I nos pacientes do grupo Caso e embora este parâmetro não tenha apresentado diferença entre os grupos a comparação intragrupo mostrou que houve aumento ao longo do tempo apenas no grupo Caso. Em nosso estudo, as frações de lipoproteínas e concentração de apolipoproteínas, bem como a presença de dislipidemia na epilepsia refratária não foi critério de inclusão, mas acreditamos que os resultados encontrados sinalizaram um perfil mais cardioprotetor no grupo Caso como foi observado por LIU et al., (2013).

LIU et al., (2013) observaram que crianças dislipidêmicas podem receber a DC, otimizando a oferta de gorduras poli-insaturadas e reduzindo a quantidade de gorduras saturadas. Neste estudo a qualidade das gorduras refletiu na redução significativa do CT e LDL, normalizando o perfil lipídico dessas crianças.

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, MICHA e MOZAFFARIAN, 2009). Desta forma, é provável que os resultados encontrados em nosso trabalho sejam decorrentes do aumento significativo dos AGS ao longo do tempo em ambos os grupos, especialmente pela redução significativa de ácido graxo palmítico no grupo Caso em cerca de 40% comparada ao grupo Controle, decorrentes da DC modificada prescrita e consumida.

Os modelos binomiais apresentaram incidência significativa superior nas dislipidemias por LDL ≥ 130 mg/dL e na fração não-HDL ≥ 145 mg/dL no grupo Controle. Nota-se que ambos os grupos parecem reduzir o número de crianças e adolescentes dislipidêmicos após os 6 meses de DC, entretanto 2 novos casos foram observados no grupo Caso versus 9 novos casos no Grupo Controle pelo ponto de corte da LDL e 2 novos casos no grupo Caso versus 11 novos casos no Grupo Controle segundo ponte de corte da não-HDL. Destaca-se que apesar do aumento superior de CT no grupo Controle não foram observadas diferenças significativas na incidência de hipercolesterolemia entre os grupos.

Similarmente aos nossos resultados, 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). Apesar deste trabalho não apresentar a composição de ácidos graxos da DC, supõe que esses desfechos sejam associados a DC clássica visto que não há nenhuma informação sobre o uso de AGP ou AGM para melhora da qualidade do perfil dietético.

A concentração plasmática das lipoproteínas, o perfil lipídico clássico, não são completamente preditoras do risco cardiometabólico ou cardiovascular, pois as lipoproteínas são estruturas heterogêneas compostas por múltiplas frações. Essas estruturas variam quanto ao tamanho de partícula, densidade e composição química e alguns mecanismos e 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 havia trabalhos com descrição do perfil estrutural das lipoproteínas em crianças ou adolescentes submetidos a DC. Portanto, nossas pesquisas são pioneiras em descrever o impacto da DC na concentração e tamanho de partículas lipoproteicas em crianças e adolescentes com epilepsia refratária submetidas ao tratamento com DC. Desta forma, resultados parciais do grupo Controle foram recentemente publicados (LIMA PA et al., 2017) sendo estes desfechos comparados agora com os resultados do grupo Caso.

Os resultados obtidos em nosso estudo mostraram impacto negativo da DC sobre as características físicas da LDL em ambos os grupos. Entretanto, o grupo Caso apresentou aumento inferior cerca de 2,1 vezes menos das partículas pequenas de LDL em comparação ao grupo Controle, e aumento do tamanho médio de LDL, 2 vezes maior no grupo Caso, evidenciando um perfil menos aterogênico nas crianças e adolescentes submetidas a DC modificada. Desta forma, pode-se supor que a DC com maior conteúdo de AGS e menor conteúdo de AGP e AGM influencia o maior aumento da concentração de LDL e que este aumento está relacionado ao aumento de partículas pequenas de LDL e redução no tamanho médio desta partícula, portanto um perfil mais aterogênico.

A relação entre aterogenicidade e LDL pequenas foi reforçada pelo estudo de VERHOYE et al., (2009), pois as partículas menores além de apresentarem transporte mais efetivo na circulação para o espaço subendotelial também são mais susceptíveis a oxidação, tem maior afinidade por proteoglicanos e maior % de APOB glicada.

As formações destas partículas podem estar associadas especialmente ao aumento de TG, pois altas concentrações de TG estão fortemente associadas a formação de partículas pequenas de LDL, não apenas das concentrações plasmáticas de TG, mas do conteúdo de TG na partícula(SBC, 2013; HIRAYAMA et al., 2012, DIFFENDERFER et al., 2014).

O aumento de TG é um estimulo positivo para a ativação da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) capaz de promover a transferência de colesterol da HDL para lipoproteínas ricas em APOB, especialmente LDL (DIFFENDERFER et al., 2014). Este processo aumenta a atividade da lipase hepática que induz a hidrólise de LDL, contribuindo para partículas pequenas de LDL (BARTER et al., 2003).

A qualidade da LDL também está associada à classificação do fenótipo, onde a média do 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; SNISKY 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 A ≥ 25,5 nm e o fenótipo B a um ponto de corte < 25,5 nm. Enquanto que a determinação por ressonância magnética utilizada em diversos estudos (WESTMAN et al., 2006; OTVOS et al., 2011) atribuiu fenótipo A ≥ 20,6 nm e fenótipo B para um diâmetro < 20,6 nm.

A técnica de eletroforese em gel utilizada no presente estudo (Lipoprint, Quantrimetrix®) atribuiu fenótipo não-A para partículas de LDL < 26,8 nm, considerando a média do tamanho de LDL de todas as partículas (grandes e pequenas). Diferenças foram observadas no período basal, pois enquanto o grupo Controle iniciou a intervenção com 100% dos pacientes de fenótipo A, 40% do grupo Caso apresentavam fenótipo não-A. No T1 houve aumento dos pacientes com fenótipo não-A para 83,3% no grupo Caso e no grupo Controle para 30,7%, e no T2, uma redução no % de indivíduos do fenótipo não-A para 75% no grupo Caso e aumento no grupo Controle para 52,7% com fenótipo não-A.

As subfrações de HDL também apresentaram mudanças significativas entre os grupos. O grupo Caso apresentou aumento de 51% no % de HDL pequenas enquanto o grupo Controle redução em cerca de 9% neste parâmetro. Embora após no T1 o grupo Controle também aumentou a quantidade dessas partículas, o aumento foi significativamente superior no grupo Caso. Este resultado foi oposto ao observado no % de HDL grandes, visto que essas partículas reduziram significativamente em comparação ao grupo Controle.

A relação do tamanho da HDL e o risco cardiovascular ainda apresentam controvérsias na literatura. Segundo BARTER et al., (2003) e PIRILLO et al., (2013) as partículas grandes de HDL são mais competentes no transporte reverso de colesterol por envolverem um transportador e um receptor (SR-BI e ABCG1) enquanto as pequenas apresentam apenas o receptor ABCA1. Entretanto, as partículas pequenas de HDL apresentam maior propriedade antioxidante e anti-inflamatória protegendo a oxidação da LDL na camada subendotelial removendo lipídeos oxidados e inibindo a expressão de moléculas de adesão na camada endotelial (KONTUSH e CHAPMAN, 2010; CAMONT et al., 2011). Além dessas propriedades, as partículas pequenas de HDL inibem a apoptose celular, a produção intracelular das espécies reativas ao oxigênio (ROS) e apresentam atividade anticoagulante (CAMONT et al., 2011).

As mudanças 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 não observamos diferença entre o grupo Caso e Controle, entretanto houve aumento significativo de AGNEs ao longo do tempo em ambos os grupos, e numericamente o grupo Controle parece apresentar uma tendência de maior concentração de AGNEs na fase crônica da DC (T2), sendo 95% maior que o período basal enquanto o grupo Caso 47%.

A peroxidação lipídica avaliada por produtos derivativos da oxidação plasmática, o TBARS não apresentou diferença significativa entre os grupos. Portanto, os resultados parecem demonstrar que as modificações oxidativas na DC foram pouco influenciadas mesmo quando o perfil de gorduras foi modificado.

Embora as mudanças oxidativas estejam associadas a um perfil mais aterogênico, sendo esperada maior concentração desses marcadores no grupo Controle, é importante lembrar dos nutrientes com potencial antioxidante, destacando-se o α-tocoferol, que representa o principal antioxidante da LDL, atuando na proteção das lipoproteínas frente aos radicais livres com consequente inibição de receptores *scanvergers*, e inibição na geração de LDL oxidada (TUCKER 2005). Portanto é provável que a Vitamina E tenha exercido algum efeito sob a concentração de TBARS dos pacientes.

Nossos resultados demonstraram diferença significativa entre os grupos na quantidade de Vitamina E (mg), superior em 65% (T1) e 56% (T2) no grupo Caso, com aumento significativo em ambos os grupos ao longo do tempo. Entretanto, o efeito da Vitamina E sob os biomarcadores oxidativos permanece controverso. O estudo de MAFRA et al., (2009) mostrou redução na concentração de LDL(-), partícula minimamente oxidada, 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 LDLoxidada.

Apesar de não terem sido encontrados resultados positivos em todos os marcadores avaliados no grupo Caso os AGP e AGM bem como a redução de AGS podem ter desempenhado papel fundamental na concentração dos biomarcadores, especialmente no CT, LDL, e tamanho de partículas.

Diversos mecanismos envolvendo os ácidos graxos poli-insaturados, especialmente ômega-3, na modulação das vias que influenciam a concentração de colesterol das lipoproteínas e conferem efeito cardioprotetor já foram descritos, dentre estes podemos citar: aumento da fluidez das membranas dos hepatócitos, afetando a atividade dos receptores de LDL, e da quantidade de receptores hepáticos tipo B/E para LDL; mudança na estrutura física das LDL, decorrente do fato de as moléculas de ácidos graxos poli-insaturados dos fosfolípides apresentarem configuração *cis*, ocupando mais espaço na estrutura da lipoproteína, restringindo volume necessário para o colesterol esterificado, formação de LDL com menor teor de ésteres de colesterol por diminuir sua transferência da HDL para VLDL, mediada pela proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP) e a redução da concentração de triacilglicérios, pelo fato de estimularem a hidrólise de apo B-100 (MOZAFFARIAN e WU, 2011).

Além dos ácidos graxos poli-insaturados, os monoinsaturados também apresentam benefícios sob a concentração de lipoproteínas, especialmente por estimular a secreção de VLDL e partículas de IDL contendo apoE e apoC-III. Estas apolipoproteínas regulam o metabolismo de lipoproteínas facilitando a ligação aos receptores de LDL (ZHENG et al., 2008).

Assim, é provável que estes mecanismos estejam associados à resposta positiva observada no grupo Caso que apresentou redução significativa ao longo do tempo na razão omega6/ômega 3 e aumento superior ao grupo Caso de ômega 3 e ácido linolênico (18:3) em comparação ao grupo Controle.

Além da resposta sistêmica observada, a DC apresentou impacto positivo na resposta clínica com redução significativa das crises epilépticas em ambos os grupos. Embora a concentração de β-hidroxibutirato tenha sido inferior no grupo Caso em comparação ao grupo Controle após 3 meses de DC, o grupo Caso apresentou redução de crises superior ao grupo Controle neste período (77.3% versus 61.7%). Esta diferença também foi observada nas estratificações em percentual, apresentando maior

frequência de crianças e adolescentes que reduziram as crises em mais de 90%. Após os 6 meses essa diferença perdeu a significância e ambos os grupos apresentaram redução de cerca de 72% das crises, sendo a concentração de β-hidroxibutirato semelhante.

Segundo YOON et al., (2014) os ácidos graxos poli-insaturados aumentam a eficácia terapêutica da DC, pois induzem proteínas desacopladoras e a regulação oxidativa do metabolismo energético, estimulando a biogênese mitocondrial, além de estabilizarem a função sináptica, o que favorece o controle das crises. FUEHRLEIN et al., (2004) verificaram que a DC baseada em ácidos graxos poli-insaturados aumentou 5.2 mg/dL a concentração de β-hidroxibutirato em comparação a DC com ácidos graxos saturados, sugerindo que a DC baseada em ácidos graxos poli-insaturados pode ser superior a DC clássica. Em nosso trabalho esses resultados não foram tão expressivos, e talvez o teor de PUFAs precise ser ainda maior que o utilizado na DC modificada para que esta resposta seja encontrada.

O uso de fármacos antiepilépticos no período avaliado representou redução significativa na quantidade total em ambos os grupos e embora não tenha sido encontrada diferença entre os grupos, o grupo Caso apresentou redução de 51% na quantidade total de FAEs enquanto a redução foi de 26% no grupo Controle.

O efeito positivo da DC na redução de FAEs apresentou redução especialmente de vigabatrina e nitrazepam no grupo Controle. Esses FAES atuam facilitando a ação ou inibindo o catabolismo do GABA (neurotransmissor inibitório) no sistema nervoso central. No grupo Caso a redução foi especialmente de topiramato e carbamazepina, o topiramato atua no bloqueio dos canais de sódio de alta voltagem, aumento do influxo de cloretos GABA-mediado e produzindo efeitos modulatórios no receptor $GABA_A$ enquanto a carbamazepina além de atuar no bloqueio dos canais de sódio de alta voltagem, atua na redução da liberação de glutamato bloqueando potenciais de ação com bloqueio de descargas repetitivas de alta frequência (YACUBIAN et al., 2014). Assim uma possível explicação para a redução desses FAEs pode estar associada à eficácia da DC na modulação do GABA, glutamato e canais de membrana conforme demonstrado em diversos estudos (CHENG et al., 2004; DAHLIN et al., 2005; MCNALLY et al., 2012).

As diferentes etiologias da epilepsia encontradas nas crianças e adolescentes inclusos nos dois grupos de intervenção apresentam perfil semelhante ao descrito em prévios estudos da literatura (FISHER et al., 2005; GITAÍ et al., 2008; LOWENSTEIN e HELBIG, 2013). E embora os grupos apresentem semelhanças no % de etiologia desconhecida, os dados reforçam a natureza heterogênea da epilepsia intragrupo e intergrupos, fato que deve ser considerado na comparação da eficácia das DC clássicas e modificadas.

Outro aspecto avaliado no presente estudo se refere ao impacto da DC no estado nutricional. Nossos resultados mostram que em ambos os grupos não houve comprometimento na estatura (ZE/I), mas o grupo Caso apresentou aumento significativo no ZIMC/I em comparação ao grupo Controle após 6 meses de DC. No entanto, considerando este indicador antropométrico, não houve diferença entre os grupos na classificação do estado nutricional. O estudo de LIU et al., 2003, mostraram que 14 crianças recebendo DC clássica apresentaram ganho significativo na estatura após 4 meses de DC. Esse perfil foi verificado para o percentil de estatura para idade (pE/I) e para percentil de índice de massa corporal para idade (pIMC/I).

De modo contrário, VINING et al., em 2002 observaram redução do ZP/I após 3 meses de dieta e uma discreta redução no ZE/I, principalmente para crianças de 7 a 10 anos. Posteriormente, NEAL et al. (2008) monitorando 75 crianças submetida a DC (3 meses) mostraram redução no ZP/I e ZIMC/I, mas não identificaram alterações no ZE/I.

Apesar do segmento nutricional e não termos encontrado mudança significativa para o 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 (de 0,07 para -0,47 e -0,67 no grupo Caso e -0,23, para -0,34 e -0,58 no grupo Controle).

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 (peso, estatura e IMC) foi monitorado mensalmente após o terceiro mês e o valor calórico da dieta ajustado ambulatoriamente de acordo com a necessidade do paciente. Além deste

fator, os estudos encontrados na literatura que avaliam o impacto da DC no estado nutricional são referentes a DC clássica, provavelmente sendo os nossos resultados até o momento os primeiros sob o aspecto da investigação da DC com mudança no perfil de gorduras no estado nutricional e composição corporal.

Coerentemente ao aumento do ZIMC/I no grupo Caso observamos diferença significativa na redução de pacientes classificados na categoria de Desnutrição, risco de desnutrição ou normalidade pela soma das dobras, embora nas demais categorias não foram observadas diferenças entre os grupos.

Em relação ao impacto da DC na composição corporal, verificamos alterações significativas nos percentuais de massa magra e massa gorda entre os grupos indicando redução de 8% na massa magra e aumento de 46% na massa gorda no grupo Caso. Esse desfecho foi diferente do esperado na nossa hipótese inicial, entretanto, observamos redução significativa na água corporal desses indivíduos, tanto na água corporal total da massa magra como na água corporal total do peso, o que provavelmente influenciou o aumento da resistência e alteração desses parâmetros.

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. Entretanto esses resultados são referentes a DC clássica de composição mais próxima a do grupo Controle.

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 nossos estudos parecem ser pioneiros na composição corporal por bioimpedância elétrica no contexto clínico da DC e epilepsia refratária. A partir da análise da composição corporal foi possível determinar o ângulo de fase dos pacientes sob DC. Nossos resultados mostraram aumento no AF, no %MCC e na reactância apenas no grupo controle. Em conjunto, esses parâmetros poderiam ser considerados como indicativo de melhora de prognóstico clínico com o uso da DC, conforme proposto por KYLE (2004b). Apesar dessa possibilidade, verificamos que neste grupo após o sexto mês de DC esses valores retornam próximos ao T0 e a resistência aumenta significativamente.

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 (grupo Caso=32% e grupo Controle 34,6%) o que dificulta um melhor conhecimento dos mecanismos envolvidos nas respostas clinicas e metabólicas frente a intervenções distintas. 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). Além disso, a possibilidade de se comparar desfechos sob uma única etiologia inviabiliza estudos clínicos na epilepsia refrataria.

Outra limitação pode 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 sinalizam efeitos cardioprotetores na DC modificada.

Portanto, os resultados apresentados até o momento, confirmam a eficácia clínica da DC modificada e reforçam a importância que a qualidade das gorduras da dieta é fundamental para o desenvolvimento, prevenção e tratamento das doenças cardiovasculares, tais ácidos graxos monoinsaturados (w-9) e ácidos graxos poli-insaturados (w-3 e w-6). De modo inverso, o colesterol, ácidos graxos *trans* e ácidos graxos saturados estimulam a aterogênese através do aumento na concentração de colesterol na LDL (WANG et al.,2016).

A terceira limitação pode ser atribuída à avaliação ao longo do tempo da dosagem e tipos de FAEs antes do período da intervenção. Crianças e adolescentes indicados para a dieta cetogênica 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 ajuste nas análises estatísticas.

A quarta limitação em complemento as limitações citadas, são as diferenças das variáveis observadas no período basal entre os grupos. Embora a maioria das variáveis

bioquímicas, antropométricas e clinicas não tenham sido diferentes, essas pequenas diferenças podem influenciar nos desfechos finais. Por este motivo, de forma a minimizar esta limitação, a comparação entre os grupos baseou-se na comparação do valor da mudança, ou seja, comparação dos deltas (Δ) do T1-T0 e T2-T0 entre os grupos.

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 dieta cetogênica. Acredita-se também que os biomarcadores do risco cardiometabólico possam ser melhorados com maior % de substituição de AGS por AGP e AGM.

7. CONCLUSÃO

A dieta cetogênica foi efetiva no tratamento da epilepsia refratária reduzindo o número de crises e o uso de fármacos antiepilepticos em ambos os grupos. A DC modificada apresentou maior potencial terapêutico apenas após 3 meses de DC e pareceu apresentar tendência de redução superior dos FAEs após 6 meses de DC. As mudanças promovidas no metabolismo lipídico apresentaram menor impacto no grupo Caso.

As principais alterações no metabolismo lipídico clássico e oxidativo associadas ao desenvolvimento da aterosclerose foram o menor aumento da concentração de CT, LDL e tendência de menor aumento de AGNEs no grupo Caso. E as mudanças nas características físicas mostraram redução na concentração de LDL pequenas e aumento no tamanho médio da LDL no grupo Caso em comparação ao grupo Controle.

Em relação ao monitoramento do crescimento e desenvolvimento, a dieta cetogênica não interferiu significativamente no estado nutricional, entretanto, houve aumento de massa gorda e massa magra no grupo Caso e resultados sugestivos de desaceleração da velocidade do crescimento em ambos os grupos.

O efeito da dieta cetogênica nas variáveis avaliadas por bioimpedância necessitam de maior acompanhamento, visto que houve mudança nos parâmetros de água corporal no grupo Caso.

Concluímos que os resultados encontrados mostram impacto negativo da DC no metabolismo lipídico e oxidativo de crianças e adolescentes, entretanto, a mudança do perfil de gorduras contribuiu para melhora das concentrações de marcadores de risco cardiometabólico, e embora muitas outras variáveis lipídicas devam ser investigadas, além do maior período de acompanhamento, estratégias voltadas para

melhora da qualidade da dieta cetogênica devem ser priorizadas e implantadas no tratamento destes pacientes.

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

5. 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.

6. 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.

7. 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.

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

9. 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.

10. 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.

11. 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.

12. 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.

13. 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.

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

15. 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.

16. 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.

17. 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.

18. 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.

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

20. 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.

21. 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.

22. 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.

23. 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.

24. 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.

25. 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.

26. 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.

27. 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.

28. 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.

29. 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.

30. 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.

31. DOKSOZ O, GUZEL O, YILMAZ U, ISGUDER R, CELEGEN K, MESE T, UYSAL U. The short-term effect of ketogenic on carotid intima –media thickness and elastic properties of the carotid artery and the aorta in epileptic children. **J Child Neurol**, v. 30(12):1646-50.

32. 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.

33. 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.

34. 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.

35. 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.

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

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

38. 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.

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

40. FUEHRLEIN, B.S.; RUTENBERG, M.S.; SILVER, J.N.; WARREN, M.W.; THERIAQUE, D.W.; DUNCAN, G.E.; STACPOOLE, P.W.; BRANTLY, M.L. Differential metabolic effects of saturated versus polyunsaturated fats in ketogenic diets. J Clin Endocrinol Met, v.89, n.4, p.1641-5, 2004.

41. 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.

42. 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, p. 181-201, 2003.

43. GROESBECK, D.K.; BLUML, R.M.; KOSSOFF, E.H. Long-term use of the ketogenic diet in the treatment of epilepsy. **Dev Med Child Neurol**, v.48, n.12, p.978-981, 2006.

44. 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.

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

46. 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.

47. 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.

48. 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.

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

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

51. 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.

52. IVANOVA, E.; BOBRYSHEV, Y.V.; OREKHOV, A.N. LDL electronegativity index: a potential novel index for predicting cardiovascular disease. **Vasc Health Risk Manag**, v.28, n.11, p.525-32.

53. 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.

54. KAPETANAKIS, M.; LIUBA, P.; ODERMARSKY, M.; LUNDGREN, J.; HALLBOOK, T. Effects of ketogenic diet on vascular function. **Eur J Paediatr** Neurol, v.18, n.4, p.489-94, mar. 2014.

55. KELISHADI, R.; HASHEMI, M.; MOHAMMDIFARD, N.; ASGARY, S.; KHAVARIAN N. Association of changes in oxidative and proinflammatory states with changes in vascular function after a lifestyle modification trial among obese children. Clin Chem, v.54,n.1, p.147-53, nov.2008.

56. 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.

57. 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.

58. 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.

59. 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.

60. 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.

61. 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.

62. 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.

63. 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.

64. 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.

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

66. LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, v.420, n.6917, p.868-74, 2002.

67. LIBBY, P.; RIDKER, P., HANSSON, G.K.. Leducq Transatlantic Network on Atherothrombosis. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. **J Am Coll Cardiol**, v.54, n.23, p.2129-38, 2009.

68. LIMA, P.A.; SAMPAIO, L.P.B.; DAMASCENO, N.R.T. Neurobiochemical mechanisms of a ketogenic diet in refractory epilepsy. **Clinics**, v.69, n.10, p.699-705, 2014.

69. LIMA, P.A.; PRUDENCIO, M.B.; MURAKAMI, D.K.; SAMPAIO, L.P.B.; FIGUEIREDO NETO, A.M.; DAMASCENO, N.R.T. Effect of classic ketogenic diet treatment on lipoprotein subfractions in children and adolescents with refractory epilepsy. **Nutrition**, v.33,p.271-277, 2017.

70. 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.

71. 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.

72. 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.

73. 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.

74. 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.

75. 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.

76. 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.

77. 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.

78. 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.

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

80. 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.

81. 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.

82. 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.

83. MICHA, R.; MOZAFFARIAN, D. Trans fatty acids: effects on metabolic syndrome, heart disease and diabetes. **Nat Rev Endocrinol**, v.5,n.6,p.335-44,2009.

84. 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.

85. MOZAFFARIAN, D.; WU, J.H. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. **J Am Coll Cardiol**, v. 58, 2047-2067, 2011.

86. 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.

87. 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.

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

89. 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.

90. 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.

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

92. 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.

93. 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.

94. 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.

95. 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.

96. 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.

97. 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.

98. 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.

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

100. 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.

101. QUEHENBERGER, O.; DENNIS, E,A. The human plasma lipidome. **N Engl J Med**. 2011 Nov 10; 365(19):1812-23. doi: 10.1056/NEJMra1104901.

102. 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.

103. QUINTÃO, E.C.R.; NAKANDAKARE, E.R..; PASSARELLI, M. Aterosclerose. In: QUINTÃO, E.C.R.; NAKANDARE, E.R.; PASSARELLI, M. **Lípides: do metabolismo à aterosclerose**. São Paulo: Sarvier, 2011, p.89-168.

104. REBOLLEDO, O.R.; MARRA, C.A.; RASCHIA, A.; et al. Abdominal Adipose Tissue: Early Metabolic Dysfunction Associated to Insulin Resistance and Oxidative Stress Induced by an Unbalanced Diet. Horm Metab Res 2008;40:794-800.

105. 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.

106. 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.

107. 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.

108. 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.

109. SCHEFFER, I.E.; BERKOVIC, S.F.; CAPOVILLA, G.; CONNOLLY, M.B.; GUILHOTO, L.; HIRSCH, E.; SOLOMON, M.L.; NORDLI, D.; YUE-HUA, Z.; ZUBERI, S.M. The Organization of the Epilepsies: Report of the ILAE Comission on Classification and Terminology, 2013.

110. SEGARRA, A,B.; RAMIREZ, M.; BANEGAS, I. et al. Dietary fat influences testosterone, cholesterol, aminopeptidase A, and blood pressure in male rats. **Horm Metab Res** 2008;40:289-91.

111. 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.

112. 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.

113. 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.

114. 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.

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

116. 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.

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

118. 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.

119. 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.

120. 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.

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

122. 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.

123. 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.

124. 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.

125. 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.

126. 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.

127. 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.

128. 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.

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

130. 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.

131. WANG, Q.; AFSHIN, A.; YAKOOB, M.Y.; SINGH, G.M.; REHM, C.D.; KHATIBZADEH, S.; et al. Impact on nonoptimal intake of saturated, polyunsaturated, and trans fat on global burdens of coronary heart disease. J Am Heart Assoc., v. 20, n.5., 2016.

132. 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.

133. WENK, M,R. The emerging field of lipidomics. **Nat Rev Drug Discov**. 2005 Jul;4(7):594-610.

134. 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.

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

136. 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.

137. 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.

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

139. 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.

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

141. 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.

142. YACUBIAN, E.M.T; CONTRERAS-CAICEDO G.; RIOS-POHL L. Tratamento Medicamentoso das Epilepsias, Leitura Medica LTDA, SP, 2014.

143. YOON, J.R; LEE, E.J.; KIM, H.D.; LEE, J.H., HOON-CHUL, J. Polyunsaturated fatty acid-enriched diet therapy for a child with epilepsy. **Brain & Development**, v. 36, p.163-166, 2014.

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

145. 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.

146. ZAMANI, G.R.; MOHAMMADI, M.; ASHRAFI, M.R.; KARIMI, P.; MAHMOUDI, M.; BADV, R.S.; TAVASSOLI, A.R.; MALAMIRI, R.A. The effects of classic ketogenic diet on serum lipid profile in children with refractory seizures. **Acta Neurol Belg**, v. 20, 2016.

147. ZHANG, H.,J.; ZHOU, F.; JI, B.P. et al. Effects of Fructose and/or Fat in the Diet on Developing the Type 2 Diabetic-like Syndrome on CD-1 Mice. **Horm Metab Res**, v.41, p.40-5, 2009.

148. ZHENG, C.; KHOO, C.; FURTADO, J.; IKEWAKI, K.; SACKS, F.M. Dietary monounsaturated fat activates metabolic pathways for triglyceride-rich lipoproteins that involve apolipoproteins E and C-III. **Am J Clin Nutr**, v.88, n.2, p.272-81, 2008.

ANEXOS

Anexo 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

O estudo: **Dieta cetogênica clássica e modificada: avaliação do potencial terapêutico e impacto sobre o perfil oxidativo, lipidômico, inflamatório e tamanho de lipoproteínas em crianças e adolescentes com epilepsia refratária"** tem como objetivo avaliar a influência da dieta cetogênica na composição das lipoproteínas (gorduras presentes no sangue), no estado nutricional das crianças (crescimento e desenvolvimento), no metabolismo hepático e na qualidade de vida. 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. Para avaliação da saúde hepática será realizado exame de ultrassonografia de abdômen total. Na qualidade de responsável pela criança, o Sr (a) responderá um questionário sobre nível sócio-econômico, informações clínicas e incapacidade funcional e cognitiva (questionário de qualidade de vida). 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 (Doutoranda)
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 Comitê de Ética

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 3 – Aprovação no Clinical Trials (National Institute of Health)

https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02644239



22/03/2016 Impact of Ketogenic Diet on Lipoproteins in Refractory Epilepsy - Full Text View - ClinicalTrials.gov

ClinicalTrials.gov
A service of the U.S. National Institutes of Health

Impact of Ketogenic Diet on Lipoproteins in Refractory Epilepsy (Ketonutri)

This study is currently recruiting participants. (see Contacts and Locations)
Verified December 2015 by University of Sao Paulo

Sponsor:
University of Sao Paulo

Information provided by (Responsible Party):
Patricia Azevedo de Lima, University of Sao Paulo

ClinicalTrials.gov Identifier:
NCT02644239

First received: October 13, 2015
Last updated: December 28, 2015
Last verified: December 2015
History of Changes

Full Text View | Tabular View | No Study Results Posted | Disclaimer | How to Read a Study Record

Purpose

The ketogenic diet is a non-pharmacological treatment prescribed especially for children and indicated in most specialized centers for patients with refractory epilepsy. The composition of the ketogenic diet is based on high-fat, low-carbohydrate, moderate protein content, and the production of ketone bodies is the probable mechanism involved in the control of seizures. The relationship between the treatment of the ketogenic diet and changes in oxidative characteristics, physical and lipid are not well established. Some studies show a significant increase in total cholesterol and triglycerides in children being treated with ketogenic diet, but other studies have shown that changes in lipid profile in the long term do not appear to be significant, beyond the influence of these changes on coronary heart disease are unknown. The studies performed in the last two decades have shown that besides the changes in the lipid profile, oxidative modification of lipoproteins are essential for the initiation and progression of atherosclerosis and physical properties of lipoproteins also appear to be involved in this process, suggesting that the particle size of lipoproteins, through the analysis of subfractions can provide more details of the cardiovascular risk. Thus, this projetct aims to compare the effects of the classical ketogenic diet with the ketogenic diet modified with lower content of saturated fatty acids and a higher content of monounsaturated and polyunsaturated, the oxidative changes of LDL, lipidomic profile, the concentration of antioxidants in production inflammatory cytokines and the subfractions of LDL and HDL in children and adolescents with refractory epilepsy, the clinical effect on controlling epilepsy.

Condition	Intervention
Epilepsy Cardiovascular Disease Non-alcoholic Fatty Liver Disease Quality of Life	Dietary Supplement: ketogenic diet

Anexo 4 - Dieta Cetogênica Clássica – grupo controle

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		

***Toucinho fresco pode ser substituído por Maionese industrializada**

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)
Abacaxi	19
Abacate	15
Ameixa fresca	10
Caqui	6
Carambola	12
Figo maduro	7
Goiaba	6
Kiwi	8
Maçã	7

TIPO	QUANT. (g)
Mamão	13
Manga	7
Melancia	20
Melão	17
Mexerica	10
Morango	12
Pêra	8
Pêssego	11
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)
Abóbora	31
Abobrinha	39
Berinjela	35
Brócolis	23
Cenoura	26
Chuchu	29
Couve-flor	27

TIPO	QUANT. (g)
Couve manteiga	21
Espinafre	33
Nabo	43
Quiabo	21
Repolho	33
Vagem	29
Palmito conserva	48

HORTALIÇAS GRUPO II

TIPO	QUANT. (g)
Acelga	20
Agrião	24
Alface	35
Almeirão	25
Chicória	23
Escarola	25

TIPO	QUANT. (g)
Azeitona verde	34
Rúcula	24
Pepino	36
Pimentão	18
Rabanete	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)
Abacaxi	18
Abacate	14
Ameixa fresca	10
Caqui	5
Carambola	12
Figo maduro	7
Goiaba	6
Kiwi	8
Maçã	45

TIPO	QUANT. (g)
Mamão	13
Manga	7
Melancia	19
Melão	17
Mexerica	9
Morango	12
Pêra	8
Pêssego	11
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 5 - Dieta Cetogênica Modificada – grupo caso

PROTOCOLO DE PESQUISA FSP-USP

DIETA CETOGÊNICA 4:1

NOME: **DATA:**

REFEIÇÃO	ALIMENTOS	QUANTIDADE		SUBSTITUTOS
Café da manhã	Creme de leite	88	g	não tem
	Ovo	18	g	não tem
	Fruta	**ver lista**		ver lista
	Óleo de canola	1	ml	ou azeite
Almoço	Carne	**ver lista**		ver lista
	Hortaliça grupo I	**ver lista**		ver lista
	Hortaliça grupo II	**ver lista**		ver lista
	Formulação alimenticia	40	g	não tem
	Azeite	1	ml	não tem
	Limonada ou suco de maracujá sem açúcar	1 copo		
Merenda	Creme de leite	88	g	não tem
	Ovo	18	g	não tem
	Fruta	**ver lista**		ver lista
	Óleo de canola	1	ml	ou azeite
Jantar	Carne	**ver lista**		ver lista
	Hortaliça grupo I	**ver lista**		ver lista
	Hortaliça grupo II	**ver lista**		ver lista
	Formulação alimenticia	40	g	não tem
	Azeite	1	ml	não tem
	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.

PROTOCOLO DE PESQUISA FSP-USP

LISTA DE ALIMENTOS PERMITIDOS - QUANTIDADES E SUBSTITUTOS

FRUTAS

TIPO	QUANT. (g)	TIPO	QUANT. (g)
Abacaxi	35	Mamão	24
Abacate	27	Manga	13
Ameixa fresca	19	Melancia	36
Caqui	10	Melão	32
Carambola	23	Mexerica	18
Figo maduro	13	Morango	23
Goiaba	12	Pêra	14
Kiwi	15	Pêssego	21
Maçã	14	Uva	12

CARNES (dê preferência aos alimentos em negrito)

TIPO	QUANT. (g)	ACRESCENTAR	
Carne de Vaca	17	-----	
Frango	15	3	ml de óleo
Carne de Porco	18	1	ml de óleo
Costela porco s/osso	17	-----	
Sardinha enlatada, a óleo	13	-----	
Salsicha	16	-----	
Lingüiça mista	14	-----	
Peixe	15	2	ml de óleo
Presunto (sem capa de gordura)	17	-----	
Sardinha fresca	12	2	ml de óleo

HORTALIÇAS GRUPO I

TIPO	QUANT. (g)	TIPO	QUANT. (g)
Abóbora	40	Couve manteiga	27
Abobrinha	50	Espinafre	42
Berinjela	45	Nabo	55
Brócolis	30	Quiabo	27
Cenoura	34	Repolho	42
Chuchu	38	Vagem	38
Couve-flor	35	Palmito conserva	61

PROTOCOLO DE PESQUISA FSP-USP

HORTALIÇAS GRUPO II

TIPO	QUANT. (g)	TIPO	QUANT. (g)
Acelga	16	Azeitona verde	27
Agrião	19	Rúcula	19
Alface	28	Pepino	29
Almeirão	20	Pimentão	14
Chicória	19	Rabanete	20
Escarola	20	Tomate	22

Substituição de 2 refeições do creme de leite ou toucinho fresco/maionese industrializada pela **formulação alimentícia rica em ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados**;

A formulação alimentícia na versão salgada deve ser utilizada em substituição a maionese industrializada ou toucinho e na versão doce em substituição ao creme de leite.

Substituição do óleo de soja de adição/cozimento por **óleo de canola e azeite de oliva**,

Estimulo ao **consumo de carnes não processadas**

Anexo 6 - Cálculo comparativo da dieta cetogênica clássica e modificada com estimativa na mudança do perfil de ácidos graxos.

Tipos de Dieta	Gord. Sat. (g)	Mono (g)	Polins. (g)	Colesterol (mg)	Omega3 (g)	Omega6 (g)	Relação w6 w3
DIETA CLÁSSICA - grupo controle							
A	69,97	36,68	14,3	606,1	1,49	12,82	
B	55,73	10,23	8,03	544,97	0,95	7,09	
C	73,25	32,59	15,69	594,62	1,69	14	
D	73,18	35,36	13,11	594,62	1,35	11,76	
Média	**68,0325**	**28,715**	**12,7825**	**585,0775**	**1,37**	**11,4175**	**8,333941606**
DIETA MODIFICADA – grupo caso							
E	50,59	51,97	22,93	520,35	7,41	15,52	
F	51,04	52,5	21,57	520,35	6,77	14,8	
Média	**50,815**	**52,235**	**22,25**	**520,35**	**7,09**	**15,16**	**2,138222849**
Redução ou Aumento pela modificação da Dieta	**-25,31**	**81,91**	**74,07**	**-11,06**	**417,52**	**32,78**	**-74,34**

LEGENDA – DIFERENTES COMBINAÇÕES

A	Café da Manhã/Merenda: Óleo de soja ; Almoço e Jantar: Toucinho e Azeite de Oliva
B	Café da Manhã/Merenda: Óleo de soja ; Almoço e Jantar: Maionese Industrializada e Azeite de Oliva
C	Café da Manhã/Merenda: Óleo de soja ; Almoço e Jantar: Toucinho, Embutidos e Óleo de Soja
D	Café da Manhã/Merenda: Óleo de soja ; Almoço e Jantar: Toucinho, Embutidos e Azeite de Oliva
E	Café da Manhã/Merenda: Óleo de canola ; Almoço e Jantar: Maionese Doutorado e óleo de canola (sem embutidos)
F	Café da Manhã/Merenda: Óleo de canola ; Almoço e Jantar: Maionese Doutorado e Azeite de Oliva (sem embutidos)

Anexo 7- 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)						
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 8 – Modelo de Registro Alimentar

Formulário 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: _____

MANUSCRITO 1 (não submetido)

Impact of KD rich in SFA and KD rich in PUFA on lipoprotein size and lipid profile: a case control study in children and adolescents with refractory epilepsy

Patricia Azevedo de Lima[1], Mariana Baldini Prudêncio[2], Giovanna Fernandes Ricciarelli[2] Cristina Takakura[3], Leticia Pereira de Brito Sampaio[3], Antônio Martins Figueiredo Neto[4], Nágila Raquel Teixeira Damasceno[2]

[1]*Post-Graduate Program in Applied Human Nutrition, University of Sao Paulo; Av. Prof. Lineu Prestes, 580; 05508-000, Sao Paulo, SP, Brazil, Phone number: +55(11) 3061-7865; email: patricia.azlima@yahoo.com.br*

[2] *Department of Nutrition, School of Public Health, University of Sao Paulo; Av. Dr. Arnaldo, 715; 01246-904, Sao Paulo, SP, Brazil. Phone number: +55(11) 3061-7865; email: mari_prud@hotmail.com; nagila@usp.br*

[3] *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; Phone number: +55(11) 2661-8500; email: leticiapbs@me.com; cristina.takakura@hc.fm.usp.br*

[4]*Experimental Physics Department, Institute of Physics, University of Sao Paulo;Rua do Matão, Travessa R, 187; 05314-970, São Paulo, SP, Brazil; +55(11)3091-6830; email: afigueiredo@if.usp.br*

ABSTRACT

Objective: To compare the impact of the classic ketogenic diet (KD) rich in saturated fatty acids (SFA) with the KD rich in polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and Monounsaturated fatty acids (MUFAs) on low density lipoprotein (LDL) and high density lipoprotein (HDL) subfractions in children and adolescents with refractory epilepsy. **Methods:** This prospective study recruited epileptic children and adolescents of either sex, whose epilepsy was refractory to treatment with multiple drugs; to be included; the patients had to have an indication for treatment with the KD. The control group received classical KD and the case group received modified KD with a reduction of at least 20% saturated fatty acids (SFA) and a reduction of the w6/w3 ratio (rich in PUFAs and MUFAs) by at least 50% compared to classic KD. For both groups, the following biochemical parameters were analyzed at baseline and after 3 and 6 months of the KD: classical lipid profile, concentration of non-esterified fatty acids (NEFAs), thiobarbituric acid reactive substances (TBARs), low density lipoprotein (LDL) and high density lipoprotein (HDL) subfractions, size LDL, and apolipoprotein profile (APOA-I and APOB). **Results:** The increase in total cholesterol (TC) and LDL levels was lower in the case group, non-HDL remained significantly lower in the case group compared to the control group and the LDL/APOB ratio was higher in the control group after 6 months of KD. The percentage of small LDL particles showed a 208% higher in the control group than case group. Consequently, the LDL size showed a greater reduction in the control group. Small HDL subfractions was higher in the case group than control group after 6 months. **Conclusions:** PUKAs KD treatment contributed to the improvement of cardiometabolic risk markers (TC, LDL and small LDL), and consequently the more cardioprotective profile.

Key words: ketogenic diet, epilepsy, lipoprotein size, LDL size, dyslipidemia

INTRODUCTION

The Ketogenic diet (KD is a non-pharmacological treatment especially prescribed to children and adolescents with refractory epilepsy (KOSSOFF et al., 2009). Approximately 30% of patients treated with antiepileptic drugs are drug resistant, and the prevalence of epilepsy is around 0.7% according to the World Health Organization (2012).

The epilepsy is associated with multiple structural and neurochemical dysfunctions, such as trauma, infectious diseases, congenital malformations, and genetic abnormalities (FISHER et al., 2014) with antiepileptic drugs being the basis of treatment, and the ketogenic diet being indicated as coadjuvant treatment.

The composition of the KD is based on the high fat (about 90% fat), low carbohydrate and moderate protein, being the catabolism of fats the primary source of energy and, consequently, responsible for the production of ketone bodies involved in the therapeutic mechanism of seizures control (LEE and KOSSOFF, 2011; LIMA PA, 2014). In addition to the clinical benefits associated with a significant reduction of seizures, the number and quantity of required antiepileptic drugs are generally decreased initiating the KD (KOSSOFF et al., 2009).

Despite the benefits of the KD control epilepsy be unquestioned in the literature, KD is associated with the development of adverse effects, with dyslipidemia being the main clinical manifestation from 14 to 59% of patients (LIU et al., 2003, KWITEROVICH et al., 2003, NIZAMUDDIN et al., 2008; LEE e KOSSOFF, 2011).

In addition to changes in the lipid profile, previous studies have shown that oxidative change in lipoproteins as well as the increase of small LDL particles are

essential for the initiation and progression of atherosclerosis in adults and children (OTVOS et al., 2011; DIFFENDERFER et al., 2014).

In 2017, LIMA PA et al., observed that small LDL increased and LDL phenotype became worse; 52.1% of the patients had a atherogenic phenotype after 6 months of the classic KD to refractory epilepsy. However, previously in obese adults (non-epileptic), WESTMAN et al., (2006) showed that the reduced amount of carbohydrates in KD favored the reduction of TG levels and increase the formation of large particles of HDL and LDL, when compared to a diet with low fat.

Regardless of the fat source from long chain triglycerides (TCL) or medium chain triglycerides (TCM) are the main of the KD, the main fatty acids present in the KD are the saturated fatty acids (SFA) that influence negatively in the lipide profile (LIU et al., 2003), while monounsaturated and polyunsaturated fatty acids are more associated with a cardioprotective role due to the positive impact on lipoprotein metabolism (LIU et al., 2013). However, the studies that describe the effects of the different type of fats used in the KD in the cardiometabolic risk and the modifications on quality of the lipoproteins are lacking.

Thus, considering this background, the goal of this study was to compare the impact of the classic KD, rich in SFA with KD, rich in PUFA and monounsaturated fatty acids (MUFAs) on LDL and HDL subfractions in children and adolescents with refractory epilepsy.

MATERIALS AND METHODS

Study design and participants

This prospective study was conducted from June 2012 to January 2017 at the Brazilian Reference Center - Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. The Control group was collected from June 2012 to March 2014 and the Case group was collected from June 2015 to January 2017.

Children and adolescents of both sexes, aged 1–19 years, with epileptic seizures, independent of the etiology, refractory to multiple drugs and for whom KD was indicated were included. The patients following criteria for entry into study: no diabetes mellitus and hypothyroidism or hyperthyroidism because the primary study focus on lipid metabolism, patients receiving hormone replacement therapy, using lipid-lowering drugs, or who had diabetes mellitus, hypothyroidism, hyperthyroidism, or Down syndrome were excluded.

Patients from both groups participated in three measurements: baseline, which was the period after the decision that treatment was indicated but before the start of the KD; after 3 months of KD treatment; and after 6 months of KD treatment. The guardians responsible for the children provided written, informed consent. The study was approved by the Ethic Committees (Nº 0068012.1.0000.5421).

Ketogenic Diet

The Control group received the classic KD based on 4 meals being the fat source of 2 meals the fresh bacon or mayonnaise and other 2 meals having the milk cream as a

source of fat. In addition to other food groups: meats, vegetables, fruits. The use of soybean oil and olive oil was recommended for this group.

The Case group received the modified KD based on 4 meals being the source of fat of 2 meals the food formulation rich in PUFAs and MUFAs replacing meals with fresh bacon/mayonnaise or 2 meals with milk cream. The other food groups remain in the diet (meat, vegetables and fruits). The use of canola oil and olive oil was recommended for this group. Patients in the Case group also received a cookbook with recipes rich in PUFAs and MUFAs. This modification of KD was characterized by a reduction of at least 20% of SFA, >50% increase of MUFAs, >50% increase of PUFAs and a reduction of the omega6/omega3 ratio in 50% compared to the classic diet used by the Control group.

The caloric prescription was adjusted for ideal body weight according to the body mass index (BMI) z-score (WHO 2006,2007). The diet was introduced without fasting, and the children and adolescents were followed as outpatients. Patients started treatment with a diet of 2:1 fat: carbohydrate and protein, and the proportion was increased weekly until it reached 4:1. To evaluate the adherence to the KD, ketosis levels were monitored using ketone bodies in urine (Accu-chek/Keto-diabur test, Roche®, Switzerland) and plasma (Ranbut kit, Randox Laboratories Limited®, United Kingdom). All these approaches were applied in both groups.

Blood Sample Collection

At baseline, 3 months and 6 months of KD, blood samples were collected in EDTA tubes after a 12-h fast in both groups. To preserve the plasma samples (obtained at 3000 rpm and 4°C for 15 min), the protease inhibitors aprotinin (10 µg/mL), benzamidine (10 µM), and phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF; 5 µM), and the

antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT; 100 μM) were added. Plasma was stored at -80° C until the analytical procedures.

Ketone bodies

The ketone bodies were determined through the β-hydroxibutirate levels using the kinetic enzymatic method, the Ranbut® kits (Randox Laboratories Limited, United Kingdom).

Lipid and Apolipoproteins

Plasma total cholesterol (TC), HDL-C, LDL-C, and triacylglycerol (TG) were measured using enzymatic and colorimetric methods and standard protocols (Roche Diagnostics GmbH®, D-68298 Mannheim). The apolipoproteins APOA-I and APOB were determined using the immunoturbidimetric method with APOA-I® and APOB® kits (Randox Laboratories Limited, United Kingdom).

LDL and HDL subfractions

The LDL subfractions, HDL subfractions and mean LDL particle size were determined from plasma using the Lipoprint system (Quantrimetrix®). This method uses linear electrophoresis on a non-denaturing polyacrylamide gel to separate and quantify lipoprotein subfractions. LDL subfractions were identified according to the size of and concentration in each particle (LDL-1 to LDL-7). LDL-1 and LDL-2 were large particles, and LDL-3 to LDL-7 were small particles.. Ten subfractions were identified for HDL (HDL-1 to HDL-10), which were combined as follows: large (HDL-1 to HDL-3), intermediate (HDL-4 to HDL-7), and small (HDL-8 to HDL-10) HDL particles.

Non-esterified fatty acids

The non-esterified fatty acids (NEFAS) were determined by the enzymatic colorimetric method, using the NEFAS® Kit (Randox Laboratories Limited, UK). Values were expressed as mmol/L.

Lipid peroxidation TBARS

Plasma lipid peroxidation was evaluated by the levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), using the method described by OHKAWA et al., (1979). To the plasma (75ul) was added 1 ml of reactive solution with thiobarbituric acids (0.046M), trichloroacetic acid (0.92M) and hydrochloric acid (0.25M), and then incubated in a boiling water bath with stirring constant (100°C) for 30 minutes. The samples were centrifuged at 4°C for 15 minutes at 8000g and 200ul of the supernatant was the read at 535nm. The quantification was performed through the standard curve (0.2 to 2.0µmol / ml) of 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP). Values were expressed as µmol TBARs/ml plasma.

Statistical Analysis

The changes between the Case group and the Control group in the variables associated with the lipid profile, apolipoproteins, NEFAS, TBARs and lipoprotein subfractions were analyzed using the generalized estimated equation (GEE) method using a Gaussian distribution and gamma with link function, inverse, and identity. Models were adjusted for sex, age, and total antiepileptic drug (AED) dose (mg) for all three measurement periods. Adjustment for the latter was performed because previous studies suggested a positive association between AED use and cholesterol metabolism

(CHUANG et al., 2012). These comparisons were conducted using intention to treat analysis, and the analyses were performed using R software, version 3.0.2.

Chi-square tests (χ^2) were used to compare categorical variables (age groups and sex), conducted using SPSS version 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) The significance level for all analyses was $p<0.05$.

RESULTS

Of the 51 patients who attended the group meeting, 41 children and adolescents were eligible to case group, while in the control group 52 patients that attended the group meeting, 38 children and adolescents were eligible. Between the baseline and 3 months of KD, 16 patients from the case group and 12 patients from control group were excluded. And between the 3 months and 6 months of KD, 5 patients were excluded from the case group and 3 patients from the control group. Therefore, for the analysis of the results, 25 patients from the case group and 26 patients from control group who were enrolled in the study group by the third month were considered. The main reason for exclusion in both groups was lack of adherence, followed by other comorbities, family problems, and lack of clinical response.

The average age of the patients in the case group was 5.2 years (1 to 15 years) and the control group was 6.5 years (1.3 to 18 years) (p=0.251). Most the patients were boys in both groups: case group n=19 boys and n=6 girls, control group n = 20 and n=6 girls (p = 0.938), and the proportion of each race was not significantly different (Case group: White: 48%; non-White: 52% and Control group: White: 65.4%; non-White: 34.6%, p=0.438). The etiology of epilepsy was heterogeneous in both groups, including genetic syndromes (e.g., GLUT-1 deficiency), West syndrome, Doose syndrome and epilepsies

of malformation; the etiology for 32% of the children and adolescents of case group was unknown while in the case group the unknown profile was 35%.

The average number of seizures/day was reduced after 6 months, however was not significant difference between groups after 6 months (case group: 15.4 seizures to 4.3 and control group:12 seizures to 3.4, p=0.266). The reduction in DAEs was significant over time in both groups, representing 51% in case group and 26% in control group, but with no difference between the groups (p=0.702).

The increase of the ketone bodies was confirmed by the monitoring of plasma β-hydroxybutyrate levels, whose values increased significantly with KD in both groups compared to baseline (p<0.001). The average in case group were: baseline=0.9, 3 months=1.6, and 6 months=3.0 mmol/L, and in the control group were: baseline=0.7, 3 months=2.7 and 6 months=3.1 mmol/L. However, the comparison between the groups, the levels was lower in case group after 3 months compared to the control group (1.6 versus 2.7 mmol/L, p<0.001). After 6 months of KD there was no significant difference between the groups.

The average energy (Kcal) of case group was significantly lower compared to the control group after 3 months (p=0.033) and after 6 months of KD there was no significant difference. As a characteristic of KD prescription, there was a reduction over time of proteins, carbohydrates, fibers and sugar, as well as a significant increase in total of fat consumption in both groups. The cholesterol intake showed a difference between the groups, being 152% higher in Control group after 3 months (p=0.004) and 52% higher after 6 months (p=0.050) (**Table 1**).

The SFAs, PUFAs and MUFAs intake were different among the groups. The case group showed a lower intake between 46-40% of SFA than control group ($p<0.001$), after 3 and 6 months. The increase in SFA had the main contributor of palmitic fatty acid, being 42% higher in the control group in 3 months and 6 months ($p=0.005$, $p=0.012$).

Although there was no difference between groups, the omega 6/omega 3 ratio was 70% lower in the case group than control group. This reduction can be attributed especially to the higher intake of omega 3 by the case group ($p<0.001$) already expected by the change in fatty acids quality in this intervention. Oleic fatty acids were significantly different between the groups after 3 and 6 months ($p<0.001$), and the intake was higher in 43% in case group than control group. It should be noted that although there was no difference between the groups, the case group showed a significant reduction of trans fatty acids over time ($p=0.006$, $p=0.008$, respectively). All parameters related to the intake of fatty acids are showed in **Table 1**.

The increase in TC and LDL levels was lower in the case group at 221% and 454%, respectively, after 6 months of KD compared to the control group (**Table 2**). Similarly, a significant increase of 333% higher in the control group compared to the case group under HDL levels ($p=0.040$), but after 6 months no significant change was observed. After 3 months, APOB levels was higher in control group in 150% ($p=0.019$) (**Figure 1**).

When non-HDL ratios were evaluated, non-HDL remained significantly lower in the case group over time than in the control group, at 393% ($p=0.001$) and 195% ($p=0.004$), respectively (**Figure 1**). The TC/HDL, LDL/HDL and APOB/APOA-I ratios were different between the groups, representing reduction in the case group, only after 3

months of KD (p=0.038, p=0.023 and p=0.001, respectively). And the LDL/APOB ratio was significantly higher in the control group only after 6 months of KD (p=0.019).

The results the changes of the LDL subfractions indicated an increase of the LDL large particles in 411% and 158% after 3 and 6 months, in the control group compared to the case group (p=0.001, p=0.038, respectively) (**Figure 2**). This result was favored especially by the higher increase of the LDL-1 (after 3 months) and LDL-2 subfractions in the control group compared to the case group (**Table 3).**

The percentage of small LDL particles also showed a significant increase of 208% in the control group compared to the case group. As a consequence, the average of LDL size presented a difference between the groups with the highest reduction in the control group by 200% (**Table 3**). This result was mainly due to the higher increase of the LDL-3 and LDL-4 (small LDL particles) subfractions in the control group compared to the case group (**Table 3**).

The HDL subfractions also showed changes between groups and over time. The case group showed a significant reduction in the percentage of large particles of HDL in 14% compared to the control group, which showed an increase of these particles in 11% after 6 months of KD (p=0.017). Conversely, small HDL particles showed an increase in the case of 10% of group of small HDL, while the control group showed a 2% of reduction in the amount of these subfractions indicating significant difference between groups (p<0.001) (**Figure 2**). These outcomes were due to the observed changes in HDL subfractions. The HDL-3, HDL-4 and HDL-5 subfractions were higher in the case group than control group, as well as in the small subfractions, HDL-9 and HDL-10. Therefore, was no difference between the groups in the subfractions HDL-1 and HDL-4 (**Table 4**).

The concentration of NEFAs in plasma showed a higher tendency in control group after 6 months, but there was no significant difference between the groups ($p>0.05$). Similar profile was observed with the lipid peroxidation biomarker, TBARs, however this increase was not significant when comparing the case group with control group (**Figure 3**).

DISCUSSION

The KD had a positive impact on the clinical response with a significant control of seizures in both groups and the response was similar between groups after 6 months. Already some of the lipid profile parameters and the LDL and HDL subfractions were different between the case and control group. The negative impact of classic KD (rich in SFA) was higher than KD rich in PUFAs and MUFAs on the qualitative aspects of lipoproteins.

The relationship between small LDL and atherogenicity can be explain because the smaller particles besides presenting more effective transport in the subendothelial space are also more susceptible to oxidation, have a greater affinity for proteoglycans and glycated APOB (VERHOYE et al., 2009, OTVOS et al., 2011).

The increase in the percentage of small LDL particles and the reduction in LDL size were higher in control group than in the case group. The generation of these particles may be especially associated with TG increase, since high concentrations of TG as strongly associated with the formation of small LDL particles, not only TG plasma concentrations but TG content in the particles (HIRAYAMA et al., 2012, DIFFENDERFER et al., 2014).

The increase in TG is a positive stimulus for the activation of esterified cholesterol transfer protein (CETP) capable of promoting cholesterol transfer from HDL to APOB-rich lipoproteins, especially LDL (DIFFENDERFER et al., 2014). This process increases the activity of hepatic lipase that induces the hydrolyses of LDL, contributing to small particles of LDL (BARTER et al., 2003).

The results obtained in our study showed a negative impact of KD on the physical characteristics of LDL in both groups. However, the case group showed a 2.1 fold lower increase in the small LDL particles compared to the control group and an increase in the mean LDL size, 2 times higher in the case group, showing a less atherogenic profile in children and adolescents submitted to PUFAs KD. Thus, we can be assumed that KD with higher SFA and lower PUFAs and MUFAs influence the greater increase of LDL levels and that this increase is related to the increase of small particles of LDL and reduction in the average size of this particle, therefore a more atherogenic profile.

HDL subfractions also showed significant changes between groups. The case group showed a 51% of increase in the percentage of small HDL whiles the control group reduced by 9% in this parameter. Although after the 3 months, the control group also increased the amount of these particles, the increase was significantly higher in the case group. This result was opposite to that observed in the percentage of large HDL, these particles reduced significantly in comparison to the control group.

The relationship between HDL size and cardiovascular risk are still controversial in the literature. According to BARTER et al., (2003) and PIRILLO et al., (2013), large HDL particles are more competent in reverse cholesterol transport because they involve a carrier and a receptor (SR-BI and ABCG1) whereas small ones present only the ABCA1 receptor. However, small HDL particles have a higher antioxidant and antiinflamatory

properties, protecting the oxidation of LDL in the subendothelial layer by removing oxidized lipids and inhibiting the expression of adhesion molecules in the endothelial layer (KONTUSH and CHAPMAN, 2010; CAMONT et al., 2011). In addition to these properties, small particles of HDL inhibit cellular apoptosis, the intracellular production of oxygen-reactive species (ROS) and anticoagulant activity (CAMONT et al., 2011). Thus the increase of small HDL particles in case group may be indicative of a cardioprotective effect in response to the increase of small LDL particles.

In the present study, we observed no difference between the case and control group, however, there was a significant increase in NEFAs over time in both groups, and numerically the control group seems to present a trend of higher concentration of NEFAs in the chronic phase of KD (after 6 months), being 95% higher than the baseline period while the case group was 47%.

Lipid peroxidation evaluated by products derived from plasma oxidation, TBARS did not present significant difference between the groups. Therefore, the results seem to demonstrate that the oxidative modifications in KD were little influenced even when the fat profile was modified. However, these results may be associated with the effect of vitamin E supplementation, since patients in both groups received micronutrient supplementation (data not shown) because KD (rich in SFA or PUFAs) does not provide the adequate amount of vitamins and minerals.

In relation to the classic lipid profile we observed a smaller increase in TC and LDL levels in the case group compared to the control group. This increase in TC levels was 2.2 times higher in the control group and in the LDL levels 4.5 times higher than case group. An increased fraction of non-HDL lipoproteins, identified as a predictor of the presence of atherosclerosis in both adults and children, is considered a more predictive

factor for persistent dyslipidemia than TC, LDL or isolated HDL (AAP, 2011). This fraction in our study was significantly lower in case group over time compared to the control group.

The results of the TC/HDL, LDL/HDL and APOB/APOA ratios were not homogeneous over time and were lower in the case group only after 3 months of KD, except for LDL/APOB, which was higher in the control group after 6 months of KD. These results should be associated to the higher increase in the HDL and APOB levels control group in the acute period of KD (3 months). In addition to the negative impact of non-HDL, the TG/HDL ratio has also been considered as an atherogenicity index and is associated not only with classical risk factors, but also with emerging risk factors being indicative of a higher cardiometabolic risk in children (QUIJADA et al., 2008; BAILEY et al., 2014). However, although we observed a tendency to increase in both groups and apparently higher in the control group, our results showed no significant difference between the groups or intragroup comparisons.

Although no positive results were found in all biomarkers, especially in lipid profile, the KD rich in PUFAs and MUFAs, as well as the reduction of SFA must have played a fundamental role in the levels of biomarkers, and consequently a more cardioprotective profile.

Several mechanisms involving polyunsaturated fatty acids, especially omega-3, in the modulation of the pathways that influence the cholesterol concentration of lipoproteins and confer cardio protective effect have already been described: increased fluidity of the hepatocyte membranes, affecting activity of LDL receptors, and the amount of hepatic B/E type receptors for LDL; changes in the physical structure of LDL, due to the fact that polyunsaturated fatty acids molecules of the phospholipids have a cis

configuration, occupying more space in the lipoprotein structure, restricting the volume required for esterified cholesterol, formation of LDL with lower esters content cholesterol by lowering their transfer from HDL to VLDL, mediated by the cholesterol ester transfer protein (CETP) and the reduction of triacylglycerol concentration, by stimulating apo B-100 hydrolysis (MOZAFFARIAN and WU, 2011).

Thus, it is likely that these mechanisms are associated with the positive response observed in the group that presented a significant reduction over time in the omega 6/omega 3 ratio and a higher increase in the group of omega 3 and linolenic acid (18:3) compared to group control.

Our study has limitations related to sample size and follow-up time. However, this difficulty is also observed in the literature, since the prevalence of epilepsy is low (0.5% to 1%) and the prevalence of refractory epilepsy is still lower (20% to 30%). Despite this possibility, the results found have great clinical relevance, since they signal cardio protective effects in the PUFAs KD.

Therefore, the results showed a negative impact of KD on the lipid and oxidative metabolism of children and adolescents. However, the change in the fat profile contributed to an improvement in the concentrations of cardiometabolic risk markers and although many other lipid variables should be investigated, in addition to the longer follow-up time, strategies aimed at improving the quality of the KD should be prioritized and implanted in the treatment of these patients.

CONFLICT OF INTEREST

We declare that there are no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the financial support from the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP # 2011/13616-4, 12/03775-0, 2012/20789-5 and 14/26094-4), National Institute for Science and Technology of Complex Fluids (INCT-FCx-USP), and Group for Research on Complex Fluids (NAP-FCx-USP).

Table 1 – Characterization of energy consumption, macronutrients, fatty acids and fibers according to the group and time of intervention.

	Case group (n=25)			**Control group (n=26)**			**p change (Δ)**	
Variáveis	**baseline**	**3 mo**	**6 mo**	**baseline**	**3 mo**	**6 mo**	**baseline-3mo**	**baseline-6mo**
	n=25	n=24	n=20	n=26	n=26	n=23		
Energy (Kcal)	1533 (561)	1348 (426)	1370 (408)	1323 (340)	1496 (662)	1450 (596)	**0.033**	0.098
Protein (g)	63 (29)	21 (9)[a]	21 (9)[a]	53 (16)	24 (14)[a]	22 (11)[a]	0.063	0.172
Carbohydrate (g)	211 (105)	24 (13)[a]	19 (6.5)[a]	177 (48)	28 (9)[a]	22 (8)[a]	0.120	0.100
Sugar (g)	84 (80)	10 (12)[a]	5.6 (3.4)[a]	63 (31)	5.3 (3.1)[a]	5 (2.3)[a]	0.310	0.200
Total Fat (g)	51 (21)	129 (43)[a]	134 (41)[a]	46 (17)	145 (65)[a]	141 (60)[a]	0.136	0.339
Cholesterol (mg)	160 (107)	301 (198)[a]	388 (166)[a]	140 (64)	496 (311)[a]	487 (232)[a]	**0.004**	**0.050**
Fiber (g)	11 (6)	3.4 (1.3)	2.9 (0.8)[a]	12 (4.6)	3.2 (1.2)[a]	3.1 (1.4)[a]	0.528	0.663
Trans Fatty (g)	0.94 (1.2)	0.32 (0.1)[a]	0.34 (0.2)[a]	0.63 (0.7)	0.32 (0.4)	0.4 (0.6)	0.243	0.228
SFA (g)	15.8 (4.9)	35.9 (13.3)[a]	39.8 (12.4)[a]	15 (7)	58 (30)[a]	57 (29)[a]	**<0.001**	**<0.001**
16:0 Palmitic (g)	4.2 (3)	9.5 (7)[a]	9.7 (7.7)[a]	4.2 (2.8)	16.5 (11)[a]	17 (12)[a]	**0.005**	**0.012**
18:0 Stearic (g)	1.6 (1)	4.6 (3.6)[a]	4.8 (4.2)[a]	1.8 (1.4)	8.1 (5.7)[a]	8.4 (6.2)[a]	**0.009**	**0.026**
PUFAs (g)	5.8 (3.4)	21.8 (8.5)[a]	21 (8.6)[a]	4.8 (4.1)	12.1 (7)[a]	12 (6.6)[a]	**<0.001**	**<0.001**
18:2 Linoleic (g)	4.3 (2.7)	15 (6.3)[a]	14.8 (6.3)[a]	3.6 (2.7)	10.5 (6.5)[a]	10.2 (5.8)[a]	**0.049**	**0.039**
18:3 Linolenic (g)	0.6 (0.8)*	6 (2.3)[a]	5.7 (2)[a]	0.4 (0.2)	1.4 (1)[a]	1.3 (0.8)[a]	**<0.001**	**<0.001**
20:4 ARA	0.08 (0.09)*	0.12 (0.09)	0.15 (0.1)[a]	0.05 (0.04)	0.2 (0.2)[a]	0.2 (0.1)[a]	**<0.001**	**<0.001**
20:5 EPA (mg)	5.6 (17)	3 (11.8)	38 (46)[a]	4.3 (15)	13.6 (23)	7.8 (18.7)	0.089	**0.021**
22:6 DHA (mg)	29 (66)	21.8 (22)	39 (50)	13.1 (18)	57.6 (69)[a]	39.3 (59)[a]	**0.012**	**0.460**
omega 3 (g)	0.9 (1.3)	6.1 (2.3)[a]	5.8 (2.2)[a]	0.8 (1.3)	1.2 (0.7)	1.2 (0.7)	**<0.001**	**<0.001**
omega 6 (g)	4.6 (3)	15 (6.4)[a]	15 (6.4)[a]	3.9 (3)	10.7 (6.6)[a]	10.4 (6)[a]	0.056	**0.042**
omega 6/omega 3	8 (3)	2.4 (0.3)[a]	2.7 (1)[a]	13.4 (38)	8.9 (2.2)	8.8 (2.4)	0.94	0.97
MUFAs (g)	12.3 (9.4)*	54.8 (24)[a]	53.2 (23.8)[a]	9.8 (6.6)	38 (24)[a]	38 (24)[a]	**0.031**	0.067
16:1 Palmitoleic (g)	0.4 (0.3)	0.9 (0.8)[a]	1 (1)[a]	0.7 (0.6)	2 (1.4)[a]	2.1 (1.6)[a]	**0.008**	**0.029**
18:1 Oleic (g)	9.1 (7.9)	52 (23)[a]	50 (22)[a]	7.3 (5.2)	35 (22)[a]	35 (22)[a]	**<0.001**	**<0.001**

Comparisons between groups evaluated by the Generalized Estimating Equations (GEE) technique. * Significant difference, case versus control at baseline, [a] significant difference intragroup 3mo vs baseline or 6mo vs baseline ($p < 0.05$). Mean and standard deviation values for food consumption adjusted by MSM. SFA: saturated fatty acids; PUFAs: polyunsaturated fatty acids; MUFAs: monounsaturated fatty acids; ARA: arachidonic acid; EPA: eicosapentaenoic fatty acid; DHA: docosahexaenoic fatty acid.

Table 2 – Biochemical and oxidative profile according to the group and time of intervention.

Variables	Case Group			Control Group			p change (Δ)	
	baseline n=25	**3 mo** n=24	**6 mo** n=20	**baseline** n=26	**3 mo** n=26	**6 mo** n=23	**baseline-3mo**	**baseline-6mo**
TC (mg/dL)	163 (34)	181 (55)[a]	186 (62)[a]	156 (28)	242 (85)[a]	230 (81)[a]	**<0,001**	**0,017**
TG (mg/dL)	72 (28)	84 (35)[a]	108 (51)[a]	81 (37)	103 (49)[a]	119 (88)[a]	0,290	0,930
LDL-C (mg/dL)	104 (32)*	119 (49)[a]	115 (50)[a]	91 (21)	160 (75)[a]	152 (70)[a]	**<0,001**	**0,004**
HDL-C (mg/dL)	53 (16)	56 (14)[a]	54 (21)[a]	48 (13)	61 (19)[a]	58 (17)[a]	**0,040**	0,190
APO A-I (mg/dL)	148 (36)*	186 (47)[a]	171 (6)[a]	119 (17)	143 (34)	140 (30)	0,240	0.71
APO B (mg/dL)	96 (27)	116 (49)[a]	120 (39)[a]	89 (15)	139 (55)[a]	138 (59)[a]	**0,019**	0,098
TC/HDL-C	3.5 (1,8)	3,4 (1)[a]	3,8 (1,5)	3,5 (1,4)	4,3 (2,0)[a]	4,4 (2,6)	**0,038**	0,339
LDL-C/HDL-C	2,3 (1,5)	2,2 (0,9)[a]	2,4 (1,2)[a]	2,1 (1,1)	2,9 (1,7)[a]	2,9 (2)[a]	**0,023**	0,1632
Non-HDL-C	110 (34)	126 (51)[a]	132 (59)[a]	107 (24)	181 (86)[a]	172 (83)[a]	**<0,001**	**0,004**
TG/HDL-C	1,8 (1,8)	1,6 (0,9)	2,5 (1,8)	1,9 (1,7)	1,9 (1,4)	2,6 (3,2)	0,62	0,94
HDL/APO A-I	0,4 (0,1)	0,3 (0,1)	0,3 (0,1)	0,4 (0,1)	0,4 (0,1)	0,4 (0,1)	**0,036**	0,136
LDL/APOB	1,1 (0,2)	1,1 (0,4)	1,0 (0,3)	1,0 (0,2)	1,1 (0,2)[a]	1,1 (0,1)[a]	0,261	**0,019**
APOB/APO A-I	0,6 (0,2)	0,6 (0,2)	0,8 (0,3)[a]	0,8 (0,2)	1 (0,4)[a]	1 (0,6)[a]	**0,001**	0,140
NEFAS (mmol/L)	0,75 (0,4)	1,1 (0,5)[a]	1,1 (0,5)[a]	0,82 (0,9)	1,1 (0,5)[a]	1,6 (0,5)[a]	0,645	0,126
TBARS (µmol/mL)	21,3 (3,8)	21,1 (6)	20,9 (6)	22,9 (6)	23,2 (7)	22,8 (5,6)	0,830	0,930

Comparisons between groups evaluated by the Generalized Estimating Equations (GEE). * Significant difference, case versus control at baseline, [a] significant difference intragroup 3mo vs baseline or 6mo vs baseline ($p < 0.05$). Mean and standard deviation values.

Table 3 – Lipoprotein particle concentrations according to the group and time of intervention.

Variables	Case Group			Control Group			p change (Δ)	
	baseline n=25	**3 mo** n=24	**6 mo** n=20	**baseline** n=26	**3 mo** n=26	**6 mo** n=23	**baseline-3mo**	**baseline-6mo**
VLDL, mg/dl	39.8 (11.4)*	42.3 (14)	44.6 (15)	22.8 (8.4)	30.9 (14.4)[a]	33.7 (12.5)[a]	0.195	0.206
IDL-C, mg/dl	15.9 (9.7)	13.4 (6.3)	21.9 (12.1)[a]	13.3 (4.2)	19.5 (10)[a]	20 (11)[a]	**0.01**	0.920
IDL-B, mg/dl	8.5 (3.3)	8.3 (3.4)	10 (5.2)	12.2 (3.6)	17.7 (11.8)	18 (14.7)	**0.02**	0.193
IDL-A, mg/dl	9.9 (4.3)	9 (8.5)	8.9 (4.7)	17.9 (7.3)	25.7 (13)[a]	14.4 (6.5)	0.283	**0.009**
LDL-1, mg/dl	24.6 (9)*	24.4 (13.4)	26.7 (13)	32.8 (8)	53.9 (19)[a]	30.7 (11.6)[a]	**<0.001**	0.497
LDL-2, mg/dl	14.7 (7.5)	23.5 (12.4)[a]	23.7 (11)[a]	11.1 (6)	33.6 (23.8)[a]	33.2 (23)[a]	**0.01**	**0.014**
LDL-3, mg/dl	2.9 (2.2)	7.8 (4.6)[a]	7.1 (5)[a]	1 (1.2)	8.1 (8.7)[a]	13.2 (16)[a]	0.254	**0.017**
LDL-4, mg/dl	0.5 (0.8)	2.4 (1.9)[a]	1.5 (1.6)[a]	0	1.1 (1.6)[a]	3.7 (6.5)[a]	0.084	**0.05**
LDL-5, mg/dl	0	0.2 (0.6)	0.1 (0.3)	0	0	0.4 (0.9)[a]	0.141	0.146
LDL-6, mg/dl	0	0	0	0	0	0	---	---
LDL-7, mg/dl	0	0	0	0	0	0	---	---
LargeLDL (%)	39.4 (14)	47.9 (22)[a]	50.2 (22)[a]	44 (12.5)	87.5(40.9)[a]	71.9(27.2)[a]	**<0.001**	**0.038**
SmallLDL (%)	3.44 (3)	10.3 (6.4)[a]	8.7 (6.6)[a]	1 (1.2)	9.2(10.2)[a]	17.3(22.8)[a]	0.598	**0.021**
LDL size (nm)	26.8 (3.4)*	26.4 (3.8)[a]	26.6 (3.8)[a]	27.3(1.8)	27(3.3)[a]	26.7(5.8)[a]	0.138	**0.036**

Comparisons between groups evaluated by the Generalized Estimating Equations (GEE). * Significant difference, case versus control at baseline, [a] significant difference intragroup 3mo vs baseline or 6mo vs baseline ($p < 0.05$). Mean and standard deviation values.

Table 4 – HDL Lipoprotein particles concentrations according to the group and time of intervention.

Variables	Case Group			Control Group			p change (Δ)	
	baseline n=25	**3 mo** n=24	**6 mo** n=20	**baseline** n=26	**3 mo** n=26	**6 mo** n=23	**baseline -3mo**	**baseline-6mo**
HDL-1, mg/dl	4.6 (2.6)	3.9 (2)	3.6 (2.3)	3.8 (2.1)	5.3 (4.6)	4.1 (4.3)	0.056	0.276
HDL-2, mg/dl	7.9 (4.2)*	8.1 (3.5)	8.1 (3.5)	5.5 (2.2)	7.9 (5)[a]	6.9 (4.7)[a]	0.063	0.055
HDL-3, mg/dl	5 (3.3)	4.9 (2.5)	4.9 (2.5)	3.8 (1.6)	6.2 (3.7)[a]	7.1 (3.4)[a]	**0.007**	**0.027**
HDL-4, mg/dl	6 (3.4)	5.1 (2)	5.1 (2)	4.9 (1.8)	6.8 (3.8)[a]	7.7 (3.3)[a]	**<0.001**	**<0.001**
HDL-5, mg/dl	5.8 (2)	5.1 (1.3)[a]	5.1 (1.3)[a]	5.7 (2)	6.8 (2.5)[a]	7.0 (2.3)[a]	**<0.001**	**<0.001**
HDL-6, mg/dl	9.7 (2.7)	9.3 (2.3)	9.3 (2.3)	10.7 (3.7)	11.1 (3)	10.7 (3)	0.435	0.509
HDL-7, mg/dl	3.5 (1.1)	3.9 (0.8)	3.9 (0.8)	3.8 (1.4)	4 (1.2)	3.5 (1)	0.646	0.288
HDL-8, mg/dl	3.5 (1.2)	4.5 (1.0)[a]	4.5 (1.0)[a]	3.6 (1.4)	4.4 (1.6)	3.6 (1.5)	0.703	0.148
HDL-9, mg/dl	2.3 (0.9)	3.4 (0.9)	3.4 (0.9)	2.8 (1.1)	3.5 (1.1)	2.8 (1.1)	0.279	**0.006**
HDL-10, mg/dl	4.2 (2.2)	7.6 (2.3)	7.6 (2.3)	3.8 (2.2)	6.1 (3.5)	4.1 (2.6)	**<0.001**	**<0.001**
Large HDL (%)	31.8 (9.4)	29.5 (6.9)	27.3 (8)[a]	27.3(7.7)	29.4(9)	30.4(10)	0.181	**0.017**
Interm.HDL(%)	48.2 (6.2)	42.1 (4.4)[a]	42.5 (5.5)[a]	51.9(6.5)	47.3(6.9)[a]	50.8(7.5)	0.415	**0.05**
Small HDL (%)	20 (7.5)	28.3 (5.2)a	30.2 (6.2)[a]	20.7(6.6)	23.3(8.4)[a]	18.8 (8.4)	**0.006**	**<0.001**

Comparisons between groups evaluated by the Generalized Estimating Equations (GEE). * Significant difference, case versus control at baseline, [a] significant difference intragroup 3mo vs baseline or 6mo vs baseline ($p < 0.05$). Mean and standard deviation values.

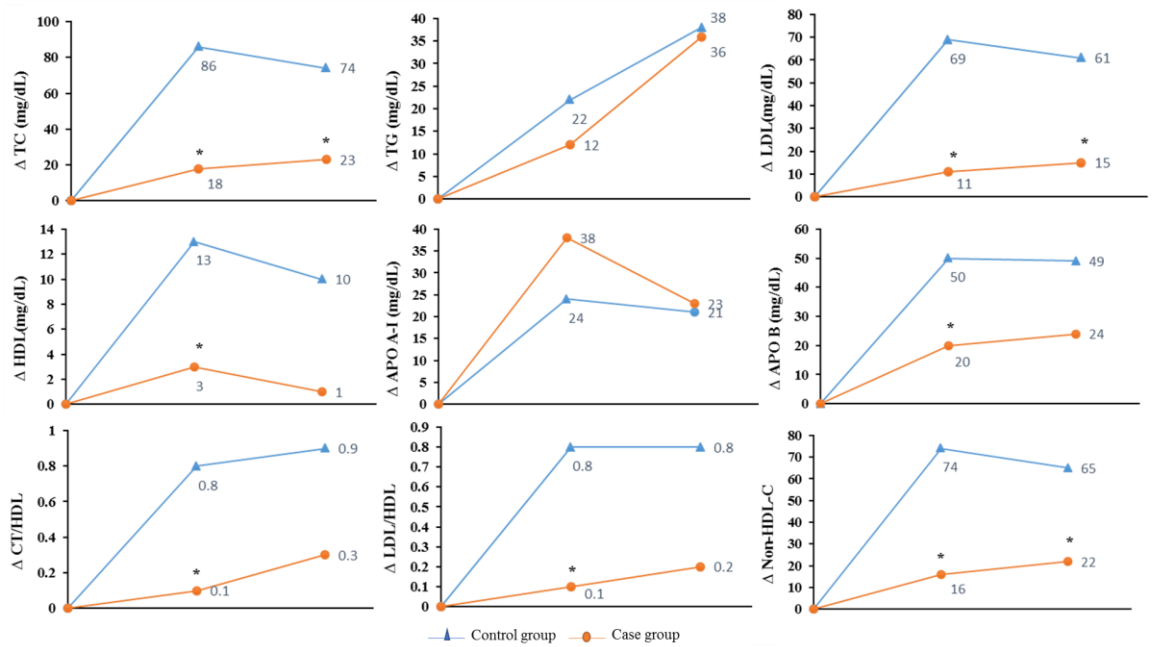


Figure 1 – Comparing changes between groups in the classic lipid profile after 3 and 6 months of KD. Comparisons using generalized estimating equations (GEE) adjusted for sex. age. and total dosage of antiepileptic drugs. Values are expressed as mean and standard deviation. *Significantly different between groups ($p < 0.05$). TC. total cholesterol; TG. triglycerides; LDL-C. low density lipoprotein cholesterol; HDL-C. high density lipoprotein cholesterol; APOA-I. apolipoprotein A1; APOB. apolipoprotein B.

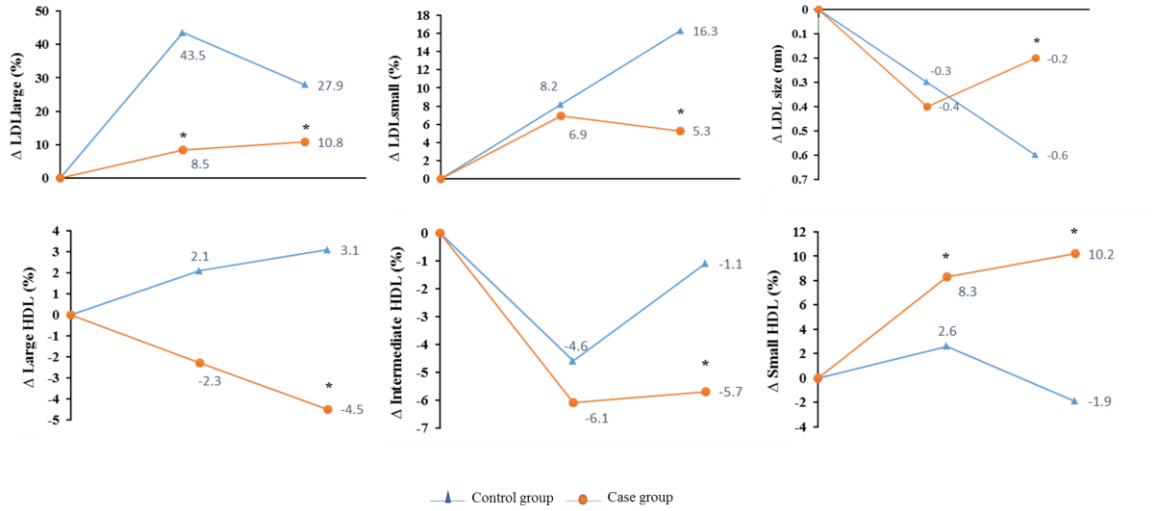


Figure 2. Comparing changes between groups LDL and HDL subfractions after 3 and 6 months of KD. Comparisons using generalized estimating equations (GEE) adjusted for sex. age. and total dosage of antiepileptic drugs. Values are expressed as mean and standard deviation. *Significantly different between groups ($p < 0.05$). LDL. low density lipoprotein; HDL. high density lipoprotein.

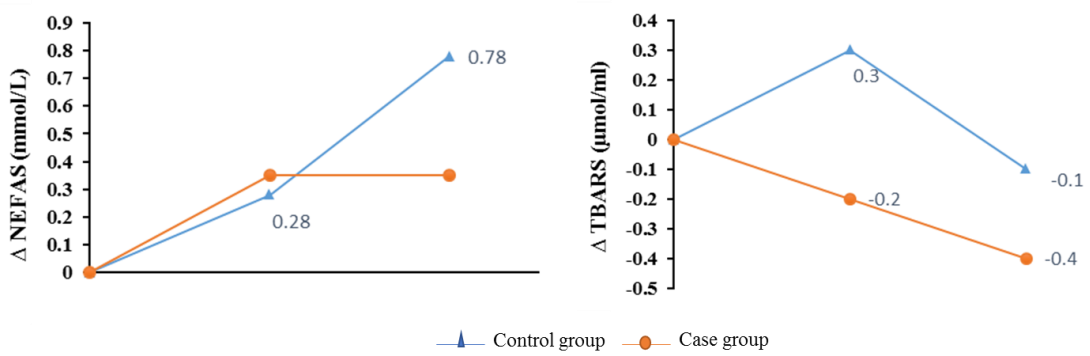


Figure 3. Comparing changes between groups NEFAS and TBARS after 3 and 6 months of KD. Comparisons using generalized estimating equations (GEE) adjusted for sex. age. and total dosage of antiepileptic drugs. Values are expressed as mean and standard deviation. No significantly different between groups ($p > 0.05$). NEFAS: Non-esterified fatty acids; TBARs: thiobarbituric acid reactive substances.

REFERENCES

1. Bailey DP. Savory LA. Denton SJ. Davies BR. Kerr CJ. The triglyceride to high-density lipoprotein ratio identifies children who may be at risk of developing cardiometabolic disease. Acta Paediatr 2014.6:1-5.
2. Barter PJ. Brewer HB. Chapman MJ. Hennekens CH. Rader DJ. Tall AR. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003. 23:160-167.
3. Camont L. Chapman MJ. Kontush A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. Trends Mol Med 2011. 17:594-603.
4. Chuang YC. Chuang HY. Lin TK. Chang CC. Lu CH. Chang WN. Chen SD. Tan TY. Huang CR. Chan SH. Effects of long-term antiepileptic drug monotherapy on vascular risk factors and atherosclerosis. Epilepsia 2012. 53:120-128.
5. de Onis M. Onyango AW. 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. 85:660-667.
6. Diffenderfer MR. Schaefer EJ. The composition and metabolism of large and small LDL. Curr Opin Lipidol 2014. 25:221-226.
7. Expert panel on integrated guidelines for cardiovascular health and risk reduction in children and adolescents National Heart. Lung. and Blood Institute. Expert panel on integrated guidelines for cardiovascular health and risk reduction in children and adolescents: summary report. Pediatrics 2011. 128 Suppl 5:S213-256.
8. Fisher RS. Acevedo C. Arzimanoglou A. Bogacz A. Cross JH. Elger CE. et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. Epilepsia 2014. 55:475-482.
9. Group WMGRS: WHO Child Growth Standards based on length/height. weight and age. Acta Paediatr Suppl 2006. 450:76-85.
10. Hirayama S. Miida T. Small dense LDL: An emerging risk factor for cardiovascular disease. Clin Chim Acta, 2012 . 34:215-224.
11. Kontush A. Chapman MJ. Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: focus on antioxidative activies. Curr Opin Lipidol 2010. 21:312-318.
12. Kossoff EH. Zupec-Kania BA. Amark PE. Ballaban-Gil KR. Christina Bergqvist AG. Blackford R. et al. Optimal clinical management of children receiving the ketogenic diet: recommendations of the International Ketogenic Diet Study Group. Epilepsia 2009. 50:304-317.
13. Lee PR. Kossoff EH. Dietary treatments for epilepsy: management guidelines for the general practitioner. Epilepsy Behav 2011. 21:115-121.
14. Lima PA. Prudencio MB. Murakami DK. Sampaio LPB. Figueiredo Neto AM. Damasceno NRT. Effect of classic ketogenic diet treatment on lipoprotein subfractions in children and adolescents with refractory epilepsy. Nutrition, 2017. 33:271-277.
15. Lima PA. Sampaio LPB. Damasceno NRT. Neurobiochemical mechanisms of a ketogenic diet in refractory epilepsy. Clinics 2014. 69:699-705.
16. Liu YC. 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 2003. 103: 707-712.

17. Liu YM. Lowe H. Zak MM. Kobayashi J. Chan VW. Donner EJ. Can children with hyperlipidemia receive ketogenic diet for medication-resistant epilepsy? J Child Neurol, 2013. 28:479-483.
18. Mozzafarian D. Wu JH. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. J Am Coll Cardiol, 2011. 58: 2047-2067.
19. Ohkawa H. Ohishi N. Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979. 95:351-358.
20. Otvos J. 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 2011. 52:105-113.
21. Pirillo A. Norata GD. Catapano AL. High-density lipoprotein subfractions – what the clinicians need to know. Cardiology 2013. 124:116-125.
22. Quijada Z. Paoli M. Zerpa Y. Camacho N. Cichetti R. Villarroel V. Aratabellabarba 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 2008. 9:464-471.
23. Verhoye E. Langlois MR. Investigators A. Circulating oxidized low-density lipoprotein: a biomarker of atherosclerosis and cardiovascular risk? Clin Chem Lab Med 2009. 47:128-137.
24. Westman EC. Yancy WS. Olsen MK. Dudley T. Guyton JR: Effect of a low-carbohydrate. ketogenic diet program compared to a low-fat diet on fasting lipoprotein subclasses. Int J Cardiol 2006. 110:212-216.
25. Who. Media centre: Epilepsy. Fact sheet n. 999. 2012.

MANUSCRITO 2 (Submetido para Clinical Nutrition)



Clinical Nutrition <eesserver@eesmail.elsevier.com> 12/28/16 às 12:17 PM

Para patricia.azlima@yahoo.com.br

Ms. Ref. No.: YCLNU-D-16-00963
Title: "Cost effectiveness analysis of the classic ketogenic diet and antiepileptic drugs treatment of refractory epilepsy in children and adolescents"
Clinical Nutrition

Dear Dr. Patricia Azevedo de Lima,

Your submission "Cost effectiveness analysis of the classic ketogenic diet and antiepileptic drugs treatment of refractory epilepsy in children and adolescents" has been assigned manuscript number YCLNU-D-16-00963.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: http://ees.elsevier.com/yclnu/

2. Enter your login details

3. Click [Author Login]
This takes you to the Author Main Menu.

4. Click [Submissions Being Processed]

Cost effectiveness analysis of the classic ketogenic diet and antiepileptic drugs treatment of refractory epilepsy in children and adolescents

Patricia Azevedo de Lima[1], Giovanna Fernandes Ricciarelli[2], Mariana Baldini Prudêncio[3], Flavia Mori Sarti[4], Leticia Pereira de Brito Sampaio[5], Nágila Raquel Teixeira Damasceno[6]

[1]Post-Graduate Program in Applied Human Nutrition, University of Sao Paulo; Av. Prof. Lineu Prestes, 580; 05508-000, Sao Paulo, SP, Brazil, Phone number: +55(11) 3061-7865; email: patricia.azlima@yahoo.com.br

[2] Undergraduate Student, School of Public Health, University of São Paulo; Av DrArnaldo, 715; 01246-904, Sao Paulo, SP, Brazil;Phone number: +55(11) 3061-7865; Fax number: +55(11) 3061-7130;E-mail: giovanna.ricciarelli@gmail.com

[3]Post-Graduate Program, Department of Nutrition, School of Public Health, University of Sao Paulo; Av. Dr. Arnaldo, 715; 01246-904, Sao Paulo, SP, Brazil. Phone number: +55(11) 3061-7865; email: mari_prud@hotmail.com;

[4]*School of Arts, Sciences and Humanities, University of São Paulo, Rua Arlindo Bettio 1000, CEP 03828-000, São Paulo, SP, Brazil;*

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

[6]*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; Phone number: +55(11) 2661-8500; email: leticiapbs@me.com;*

ABSTRACT

Background & Aims: To provide evidences on effectiveness in seizures control and investigate cost-effectiveness of treatment with classic ketogenic diet (KD) in children and adolescents with epilepsy. **Methods:** Prospective study recruiting epileptic children and adolescents of both sexes, whose epilepsy was refractory to treatment with multiple drugs. Each patient participated in two measurements: baseline and time 1, which occurred six months after KD. Comparison of costs and outcomes for cost-effectiveness analysis considered results of the intervention at the sixth month in comparison to baseline. Estimation of costs included antiepileptic drugs (AED) and food consumption, considering the usual diet of each patient at baseline and KD consumed by each patient at the sixth month. The effectiveness was calculated by estimating the daily frequency of seizures. A univariate sensitivity analysis was performed in order to verify the impact of potential variations of costs and outcomes in incremental cost-effectiveness ratio (ICER). **Results:** ICER was $3.07, indicating that KD was cost effective. Daily costs of usual diet and KD were not significantly different ($53.3 and $36.9, p=0.76, respectively), while daily costs of AED were different ($28.4 and $21.6, p=0.002). Consequently, global costs considering diet plus AED were higher at baseline in comparison to the time 1 ($81.7 and $58.4, p=0.009). KD group represented 71% of seizure control (p=0.004). In sensitivity analysis, incremental cost-effectiveness ratios (ICERs) ranged from $2.09 to $4.16 in

favor of KD group. **Conclusions:** KD is cost-effective to be adopted in a health public, representing reduction of public spending on antiepileptic drugs, and higher well-being to children and adolescents with epilepsy.

Key Words: cost-effectiveness, ketogenic diet, epilepsy, antiepileptic drugs

INTRODUCTION

Epilepsy is a neurological disorder characterized by seizures that reflect abnormal electrical activity in one or more areas of the brain cortex[1]. The World Health Organization recently estimated that 0.7% of the population has epilepsy, representing 50 million people, with 80% living in developing countries[2].

According STRZELCZYK et al.,[3] epilepsy is a major cost-intensive and worldwide health problem. These costs vary according to the severity of the condition, response to treatment, length of time since diagnosis, and the perspective examined (e.g. health systems, societal or individuals and families doctor)[4]. These studies generally reported significant ongoing costs incurred from drugs and outpatient medical care, with substantially higher costs associated with ongoing seizures, and intellectual and developmental disabilities.

The review study of ALLERS et al.,[4] showed that the annual direct costs of health system per patient in Italy was €1,302 (€0.75=US$1.00) while on Spain was €2,110 for the care of person with epilepsy and the cost of patients attending consultations for epileptic surgery was €2,193. This review highlighted that the majority of epilepsy sufferers are found in low and middle income countries in Africa, Central and South America (>80%).

The majority of epilepsy treatment options is based on antiepileptic drugs however, 20% to 30% of children with epilepsy have seizures refractory to these drugs. For these children and adolescents, the ketogenic diet (KD) has been indicated as a coadjuvant treatment[5], with consensus regarding its benefits for epilepsy control in more than 50% of patients[6].

New antiepileptic drugs (AED) represent costs 100 times higher than phenobarbital and 10 to 20 times of phenytoin and carbamazepine. Treatment cost of AED is only a small part of the global account for epilepsy treatment[7]. Indirect costs related to morbidity, excessive mortality, unemployment, payment of social benefits,

school absenteeism and other social costs add up to high treatment costs, particularly hospitalization, are highly representative of intractable epilepsy and patients with drug-resistant epilepsy can potentially benefit from adoption of KD.

KD is based on high-fat, low-carbohydrate, and moderate protein content distributed in a 4:1 or 3:1 (fat to carbohydrate and protein) ratios. Therefore, fat catabolism is the primary source of energy and responsible for production of ketone bodies, which have considerable involvement in therapeutic mechanisms related with seizure control[8]. In addition to clinical benefits associated with significant reduction in epileptic seizures, number and quantity of required antiepileptic drugs are generally decreased after initiating KD[5]; usually with 2 to 3 years KD duration for majority of patients.

Although there is wide recognition of the KD benefits in many studies, there is limited information on the cost-effectiveness of KD to epilepsy, resulting in disbelief of its usefulness among health professionals, health authorities, families and caregivers.

The aims of the study are to provide evidences on KD effectiveness in control of seizures and investigate cost-effectiveness of KD treatment in children and adolescents with refractory epilepsy.

METHODS

Study design and participants

This prospective study was conducted from June 2012 to March 2014 at the Brazilian Reference Center - Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Children and adolescents of both sexes, aged 1 to 19 years old with epileptic seizures, independent of the etiology, refractory to multiple drugs and for whom KD was indicated were included. Each patient participated in two measurements: baseline (period after the decision that treatment was indicated, but before KD adoption); and time 1 (six months from the beginning of KD intervention).

The guardians responsible for the children provided written informed consent. The study was approved by the Ethic Committees (Nº 0068012.1.0000.5421) and display records in clinical trials (NCT02644239).

Dietary Protocol

The guidance and dietary planning protocol followed the recommendations of the classic KD, and the caloric intake was adjusted for ideal body weight according to the body mass index (BMI) z-score[9,10]. The diet was introduced without fasting, and the children and adolescents were followed as outpatients. Patients started treatment with a diet of 2:1 fat ratios in relation to carbohydrate and protein, and the proportion was increased weekly until reaching 4:1 ratios, according to ketonuria and control of seizures. All food items within classic ketogenic diet were weighed with 1 gram precision before brewing. KD was composed of milk cream, fresh bacon, vegetable oils, red and white meat, eggs, cheese, fruits, gelatin and vegetables. Food records of three days were collected in both evaluation times (basal and time 1).

Antiepileptic drugs (AED)

Children and adolescents participating in the study were taking at least two AED, which were quantified in two measurements: baseline and time 1 (after 6 months of KD). These data were collected through a clinical questionnaire by responsible researchers under confirmation from the neuropediatric responsible.

KD effectiveness (seizure frequency)

The number of seizures was recorded on the dates of occurrence by the children's family, on the week before each assessment (baseline and time 1). The average estimate of daily frequency of seizures was calculated based on the data provided during the children's consultations.

Cost effectiveness

Economic assessment compared costs and outcomes from intervention including KD (AED and KD) in comparison to baseline (AED and usual diet). The AED cost was estimated from data collected at baseline, third month and sixth month of treatment, employing the three food records collected and the medication records from each patient, including type and quantity of each medication.

KD cost was estimated using average of the costs of dietary intakes registered at third and sixth month for each patient, that is, during adoption of KD dietary protocol. Cost of usual diet adopted by patients was estimated using average of the costs of dietary

intakes registered at baseline, that is, previously to KD treatment. Food prices to estimate costs of KD and usual diet were collected from May to July 2016, using official government databases from Brazil and, in absence of government data, using retail market prices. In order to calculate costs of the usual diet, only edible parts of foods were considered. AED prices also were estimated by consulting official government databases and, in absence of government data, using retail market prices.

Inflation rates were applied to prices collected in May and June, using the Brazilian Institute for Geography and Statistics data on Consumers' Prices Index (IPCA). Exchange rate applied was R$3.24=$US1.00 from July 2016, based on data from the Brazilian Central Bank.

The incremental cost-effectiveness ratio (ICER) was calculated using the following equation: ICER= C$1-C$0 ÷ S1-S0; being: C$1 = cost of KD + AED; C$0= cost of usual diet + AED; S1 = number of seizures per day at sixth month of treatment; S0 = number of seizures per day at baseline.

Sensitivity analysis

Uncertainty surrounding input parameter estimates in cost-effectiveness analysis and in results of incremental cost-effectiveness ratio, especially referring to variations in costs and differences in outcomes, is characterized by limitation or absence of evidences available to inform decision making processes involving health. A univariate sensitivity analysis was used to capture potential uncertainty in the input parameters of cost-effectiveness in KD treatment, applying variability of ±10% in costs and ±20% in outcomes (seizures), considering baseline and time 1, in order to verify the possibility of changes in incremental cost-effectiveness ratio.

Statistical analysis

Continuous variables were reported as mean and standard deviation or minimum and maximum. Chi-square test ($\chi 2$) were used to compare categorical variables (sex), and comparisons between of groups were conducted using the paired Student's t-test or Wilcoxon to non-parametric variables, using software SPSS version 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA), and adopting $p<0.05$ as significance level for all analyses.

RESULTS

During June 2012 to March 2014, 26 children and adolescents were followed. One patient was excluded from the sample due to exclusive use of enteral diet extensively hydrolysed. Therefore, 25 patients were enrolled in the protocol study, three patient's drop-out of the treatment after 3 months.

The average age of the patients was 6.7 years (1.4 to 18 years). Of these, 7 were adolescents and 18 were children (28% and 72% p=0.001, respectively). Most patients were male (n=20; 80%) versus female (n=5; 20% p<0.001). The average seizures per day at baseline were higher (mean=10.7; 1 to 85 seizures) than at six months (mean=3.1; 0 to 10 seizures; p=0.004); representing a reduction of >50% in seizures among 68% of patients.

The compliance monitored by ketonuria level was registered, indicating that all patients, except one, showed urinary ketosis stability (>150 mg/dL) after KD introduction with higher proportion of fat (4:1). Therefore, only one patient remained in the 3:1 KD (data not shown).

Approximately 307 types of food were consumed in usual diet and KD, and 14 different AED were prescribed. Each patient used at least 2 AED at baseline. Daily costs of usual diet and KD were not significantly different ($53.3 and $36.9; p=0.76, respectively), while daily costs of AED were reduced in 24% ($28.4 and $21.6; p=0.002). Consequently, global treatment costs considering diet plus AED were higher at baseline in comparison to the sixth month ($81.7 and $58.4; p=0.009) (**Table 1**).

The incremental cost-effectiveness ratio (ICER) was $3.07 per seizure avoided. Sensitivity analysis resulted in variation of the incremental cost-effectiveness ratio ranging from $2.09 to $4.16 in favor of the KD treatment (**Table 2**). Considering a projection of annual treatment, the cost of KD treatment would be approximately $21,316; in comparison to approximately $29,821 of treatment based only on medication. The ICER would be $ 1,121 ranging from $762.85 to $1,518.4.

DISCUSSION

The results of the study showed that KD is cost-effective, being $3.07 the cost of each seizure. Considering sensitivity analysis, ICER may range from 2.09 to 4.16, always in favor of KD adoption. The result is reinforced since there was no difference between costs of usual diet and KD (p=0.76), and KD treatment positively influenced reduction of expenditures with AED on approximately 29%. Moreover, although we have not measured these results, several studies[11,12] point to neuroprotective effects of KD. Differently from AED, which must be taken for the rest of patients' lives and present serious difficulties in controlling epilepsy, KD treatment is usually prescribed only during 2 to 3 years, except in epilepsy by inborn errors of metabolism (i.e. GLUT-1 deficiency).

There are few studies that assess KD costs. In 2015, de KINDEREN et al.[13] evaluated effects of KD in Quality-Adjusted Life Years (QALY), suggesting that KD presents higher effectiveness and lower costs, being thus cost-effective in comparison to vague nerve stimulation (VNS); however, differently from our results, compared to usual care, neither KD nor VNS were cost-effective options, since both were more effective, but also more expensive after 12 months (€3,306; €14,036; €19,992; respectively).

In 2016, de KINDEREN[14] et al. also observed different results in comparison to our study, indicating lower mean costs per patient of €15,245 in usual care (compared to €20,986 in KD) and lower effectiveness in seizure reduction (18.2% in usual care versus 50.0% in KD); however, didn't find any benefits in terms of QALYs after 4 months of follow-up.

The results reporting higher costs of KD[13,14] in comparison to usual treatment may be associated with use of special industrial formulas in KD, due to higher access in developed countries in comparison to developing countries, as Brazil.

Previously, MANDEL et al.,[15] evaluated the costs inpatient to KD treatment for 6 to 12 months and observed similar results to ours. The authors identified global costs of $352,820.20 during baseline; $41,221.91 at KD initiation (6 to 12 before the KD); and $149,436.86 after 6 to 12 months of KD, representing a reduction of medical costs in children with intractable epilepsy.

It is also important to interpret cautiously clinical responses to KD, the majority studies measure the effectiveness of KD through the levels of urinary or blood ketone bodies[11,16], but even at high concentrations there are patients who are non-responders, which may be associated with complexity of etiological origin of epilepsy and existence

of cases that are etiologically more responsive to KD. Considering differences in the population of diverse studies, there may have been different etiologies considered in refractory epilepsy cases.

This study had certain limitations. The small sample size could decrease the statistical power to detect differences, however, considering that the low prevalence of refractory epilepsy (20%-30%) within the 0.5% to 1% of all epilepsy cases, the sample size characterizes the epidemiological profile of this disease. In addition, the reduction of seizures, reduction of AED and costs of baseline versus 6 months of KD confirm the relevance of our study. Because the study design did not collect the frequency of seizures before AED treatment, we could not calculate the percentage of effectiveness due to introduction of medication. Despite this study did not a control group only with AED, monitoring the same patients at baseline and after 6 months offer a relevant opportunity to evaluate the same patients with same disease as each patient was your own control. Moreover, the analysis included just specific direct costs of treatment, and did not include additional expenditures (biological samples testing, supplements of vitamins and minerals, image diagnoses, and health professionals consultations and hospitalization cost).

Despite the limitations, this study presents evidences of cost-effectiveness for KD treatment, which may contribute to reduction in public spending on antiepileptic drugs and increase of patients' welfare. Although there is need for more research, it is likely that there may be an impact on increasing the patients' quality of life and also results in reduction of additional health care costs for patients, governments and health systems, including hospitalization, early retirements and pensions, among others. Our results reinforce that the indication of KD should not be delayed, but may be indicated on the refractory period after the adoption of second drug, or even as first treatment option.

CONFLICT OF INTEREST

We declare that there are no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the financial support from the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP # 2015/24928-8, 12/03775-0, 2012/20789-5 and

14/26094-4) and supported with patients of Daniela Kawamoto Murakami of the Instituto da Criança do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da USP.

Table 1. Characteristics of patients and daily cost of usual diet, ketogenic diet and antiepileptic drugs.

Variables	Baseline n=25	6 mo n=22	Total	p
Sex (%)				
Male	20 (80)	17 (77.3)	37 (75)	<0.001
Female	5 (20)	5 (22.7)	10 (25)	
Age (years)	6.7 (1.4-18.0)	7.3 (2.0-18.6)		
Daily Seizures	10.7 (17.3)	3.1 (3.5)	13.8	
Minimum	1	0	1	0.004
Maximum	85	10	95	
Daily Costs ($)				
Diet	53.3 (43.0)	36.9 (27.7)	90.1 (57.4)	0.76
AED	28.4 (18.5)	21.6 (16.3)	50 (33.3)	0.002
Diet + AED	81.7 (50.9)	58.4 (40.0)	140 (70.9)	0.009

AED = antiepileptic drugs. Daily seizures and Daily are below as mean and standard deviation.

Table 2. Sensitivity analyses of cost-effectiveness.

CER	C$2	C$0	S2	S0
3.07	**58.4 (40)**	**81.7 (50.9)**	**3.1 (3.5)**	**10.7 (17.3)**
	+10%	|	|	|
	↓	|	|	|
2.29	64.3 (44)	81.7(50.9)	3.1 (3.5)	10.7 (17.3)
	-10%	|	|	|
	↓	|	|	|
3.77	53.1 (36)	81.7 (50.9)	3.1 (3.5)	10.7 (17.3)
|	|	**+10%**	|	|
|	|	↓	|	|
4.16	58.4 (40)	89.9 (56)	3.1 (3.5)	10.7 (17.3)
|	|	**-10%**	|	|
|	|	↓	|	|
2.09	58.4 (40)	74.3 (46)	3.1 (3.5)	10.7 (17.3)
|	|	|	**+20%**	|
|	|	|	↓	|
3.33	58.4 (40)	81.7 (50.9)	3.7 (4.2)	10.7 (17.3)
|	|	|	**-20%**	|
|	|	|	↓	|
2.87	58.4 (40)	81.7 (50.9)	2.6 (2.9)	10.7 (17.3)
|	|	|	|	**+20%**
|	|	|	|	↓
2.38	58.4 (40)	81.7 (50.9)	3.1 (3.5)	12.9 (20.9)
|	|	|	|	**-20%**
|	|	|	|	↓
4.09	58.4 (40)	81.7 (50.9)	3.1 (3.5)	8.8 (14.3)

Obs.: ICER = incremental cost-effectiveness ratio; C$1 = cost of KD + antiepileptic drugs; C$0 = cost of usual diet + antiepileptic drugs (control group); S1 = seizures per day in KD treatment; S0 = seizures per day at baseline; ↓ indicate changes in parameters. Values in mean and standard deviation.

REFERENCES

1. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. Epilepsia. 2014;55(4):475-82.

2. Who. Media centre: Epilepsy, Fact sheet n. 999, 2012.

3. Strzelczyk A, Reese JP, Dodel R, Hamer HM. Cost of epilepsy: a systematic review. Pharmacoeconomics. 2008;26(6):463-76.

4. Allers K, Essue BM, Hackett ML, Muhunthan J, Anderson CS, Pickles K, et al. The economic impact of epilepsy: a systematic review. BMC Neurol. 2015;15:245.

5. Kossoff EH, Zupec-Kania BA, Amark PE, Ballaban-Gil KR, Christina Bergqvist AG, 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.

6. Zupec-Kania BA, Spellman E. An overview of the ketogenic diet for pediatric epilepsy. Nutr Clin Pract. 2008;23(6):589-96.

7. Neto, J.G.; Marchetti, R.L. Aspectos epidemiológicos e relevância dos transtornos mentais associados à epilepsia. Rev Bras Psiquiatr. 2005;27(4):323-328.

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

9. Group WMGRS. WHO Child Growth Standards based on length/height, weight and age. Acta Paediatr Suppl. 2006;450:76-85.

10. de Onis M, Onyango AW, 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;85(9):660-7.

11. McNally MA, Hartman AL. Ketone bodies in epilepsy. J Neurochem. 2012;121(1):28-35.

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

13. de Kinderen RJ, Postulart D, Aldenkamp AP, Evers SM, Lambrechts DA, Louw AJ, et al. Cost-effectiveness of the ketogenic diet and vagus nerve stimulation for the treatment of children with intractable epilepsy. Epilepsy Res. 2015;110:119-31.

14. de Kinderen RJ, Lambrechts DA, Wijnen BF, Postulart D, Aldenkamp AP, Majoie MH, et al. An economic evaluation of the ketogenic diet versus care as usual in children and adolescents with intractable epilepsy: An interim analysis. Epilepsia. 2016;57(1):41-50.
15. Mandel A, Ballew M, Pina-Garza JE, Stalmasek V, Clemens LH. Medical costs are reduced when children with intractable epilepsy are successfully treated with the ketogenic diet. J Am Diet Assoc. 2002;102(3):396-8.

16. Eagles DA. Design of dietary treatment: humans versus rodents. Epilepsia 2008;49(Suppl.8):61-3.

MANUSCRITO 3 (Submetido para Epilepsia)

02-Jan-2017
Dear Miss Lima:

Your manuscript entitled "The classic ketogenic diet improves clinical response in refractory epilepsy by reduction of seizures and pharmacological treatment: a prospective study" by Lima, Patricia; Prudêncio , Mariana ; Murakami , Daniela ; Sampaio, Leticia; Ricciarelli , Giovanna ; Damasceno, Nagila, has been successfully submitted online.

Co-authors: Please contact the Editorial Office as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript.

Your manuscript ID is EPI-00856-2016.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence. If there are any changes in your address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at https://mc.manuscriptcentral.com/epilepsia and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to https://mc.manuscriptcentral.com/epilepsia.

Thank you for submitting your manuscript to Epilepsia.

Sincerely,

Epilepsia Editorial Office
epilepsia@epilepsia.com

The classic ketogenic diet improves clinical response in refractory epilepsy by reduction of seizures and pharmacological treatment: a prospective study

Patricia Azevedo de Lima[1], Mariana Baldini Prudêncio[2], Daniela Kawamoto Murakami[3], Leticia Pereira de Brito Sampaio[3], Giovanna Fernandes Ricciarelli[4], Nágila Raquel Teixeira Damasceno[5.]

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

[2] *Post-Graduate Program in Nutrition and Public Health, Department of Nutrition, School of Public Health, University of Sao Paulo; Av. Dr. Arnaldo, 715; 01246-904, Sao Paulo, SP, Brazil*

[3] *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*

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

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

Running title: Epilepsy reduced by a ketogenic diet

Keywords: Seizure, Etiology, Children, Beta-hydroxybutyrate, Anti-epileptic drugs

SUMMARY

OBJECTIVE: To evaluate the impact of a ketogenic diet (KD) on the control of seizures and dose regimen of anti-epileptic drugs (AEDs) in children or adolescents with refractory epilepsy; and to evaluate the impact of etiology of epilepsy in these changes.

METHODS: This prospective study recruited children and adolescents of both sex with refractory epilepsy who had an indication for KD treatment and outpatient status. Subjects were grouped according to genetic (group 1), structural metabolic (group 2), and unknown (group 3) etiology. β-hydroxybutyrate levels, seizure frequency, and AED use were monitored at baseline and after 3 and 6 months of the KD. **RESULTS**: In group 1 (n=6), at least 50% of seizures were reduced in 83% of patients; in group 2 (n=11), in 55% of patients; and in group 3 (n=9), in 67% of patients. There were no significant differences in control of seizures between groups after 3 or 6 months of KD (p=0.383, p=0.171, respectively). A negative correlation between the levels of β-hydroxybutyrate and number of seizures (3 months, r=-0.401, p=0.047; 6 months, r=-0.606, p=0.003) was observed. Use of AEDs was significantly reduced, but only when all patients were considered (26%, p=0.013), and valproate, vigabatrin and nitrazepam were drugs more related with this change. **SIGNIFICANCE:** Overall, after 6 months the KD reduced seizure frequency in 64% of patients, and dose of AEDs in 26% of patients. Epilepsy with a genetic etiology was particularly responsive to the KD, as was unknown epilepsy and epilepsy related to bacterial meningitis, cortical dysplasia, central nervous system (CNS) malformation and heteropathic periventricular epilepsy.

Keywords: Seizures, Etiology, Children, Ketone bodies, Anticonvulsants.

Key point box:

- Total 67% patients with unknown epilepsy etiology responded to a ketogenic diet (>50% seizure reduction).
- Sequelae of bacterial meningitis and heteropathic periventricular epilepsy responded strongly to KD (>90% seizure reduction).
- Ketogenic diet reduced overall anti-epileptic drug dose by 26% after 6 months.

INTRODUCTION

Epilepsy is a neurological disease characterized by seizures related to abnormal electrical activity generated in one or more areas of the cerebral cortex, and can be caused by a range of structural and neurochemical dysfunctions[1,2]. Although adequate treatment and understanding of the prognosis and clinical course of epilepsy is significantly easier when the etiology of the disease is known, though, more than 30% of people have symptomatic epilepsies with unknown origin[3]. In addition, recognizing the specific cause of the disease helps improve the classification of epileptic seizures, epilepsies, and epileptic syndromes[4,5,6]. In 2012, the World Health Organization estimated that 0.7% of the population has epilepsy (about 50 million people), with 80% living in developing countries[7].

The majority of epilepsy treatment options include anti-epileptic drugs (AEDs); however, 20-30% of children with epilepsy have seizures refractory to these drugs. A previous study noticed that after 3 different attempts to use AEDs, 39% of patients remained with uncontrolled seizures[8]. In this context, the ketogenic diet (KD) has been used as a complementary treatment of refractory epilepsy. The therapeutic efficacy of KD is directly dependent of the high fat, adequate protein and low carbohydrate ratio, with best control of seizures usually occurring when proportion of fat to carbohydrate plus protein is 3:1 or 4:1. In KD, fat catabolism is the primary source of energy, with production of ketone bodies seemingly responsible for seizure control[9].

Syndromic epilepsies including West syndrome, Rett syndrome and tuberous sclerosis, and disorders related to metabolic disturbances such as glucose transporter protein I (GLUT-I) deficiency and pyruvate dehydrogenase deficiency (PDHD), are reported to be most responsible to KD treatment[11]; however, other forms of epilepsies are

poorly studied, and many genes associated with epilepsy have not yet to be identified[11].

To address this gap and better understand the relationship between KD and the different forms of epilepsy, this study was designed to evaluate the impact of KD on control of seizures and AED usage in children and adolescents with epilepsy and its etiology identified in the subjects.

MATERIALS AND METHODS

Study design and participants

This was a prospective study conducted from June 2012 to March 2014. Children and adolescents were included from the Brazilian Pediatric Reference Center - Instituto da Criança do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da USP. The study enrolled patients aged 1 to 19 years; patients were seen prior to starting the KD (baseline), and then at three and six months after beginning the diet. Parents or guardians responsible for the children and adolescents went through the process of clarification and gave informed written consent. This study was approved by local Ethic Committees and is registered in Clinical Trials (NCT02644239).

Clinical indication for treatment with KD was the inclusion criteria, patients receiving hormone replacement therapy, using lipid-lowering drugs, or who had hypothyroidism or hyperthyroidism, kidney disease and diabetes were not included. A total of 26 patients met the inclusion criteria. These patients were subdivided into three groups based on the epilepsy etiology as determined by the criteria of Berg et al. (2010): Group 1 (genetic etiology, n=6), Group 2 (structural/metabolic etiology, n=11), and Group 3 (unknown etiology, n=9).

Ketogenic Diet protocol

The dietary planning considered the recommendations of Freeman et al.,[12]. The requirement energy was established according ideal weight after the evaluation of the body mass index (BMI) z-score[13,14]. The protein recommendation was of 0.7 to 1g/Kg body weight[12]. The diet was introduced in outpatients (without fasting) and the increase

of fat proportion was based on monitoring of the ketone bodies in urine. Patients started treatment with a classic ketogenic diet (2:1 ratio), with weekly adjustments until 4:1 fat: carbohydrate and protein ratio (**Table 1**).

The total calories were distributed in 4 meals (breakfast, lunch, snack or evening meal and dinner). The diet was composed of milk cream, eggs, mayonnaise or fresh bacon, olive oil or vegetable oil, cheese, meats and sausages, fruits and vegetables. Therefore, the main source of fat are saturated fatty acids. The drinks allowed were lemon juice and natural passion fruit, artificial juice powder and teas or coffee without sugar. The use of sweeteners without fructose and lactose was an alternative to sugar substitution. Foods rich in carbohydrates and proteins like rice, beans, pasta, crackers were not included at food schedule. Some tubers and roots as potatoes, cassava, beet and yam were included only in 2:1 ratio. During treatment, all foods were daily weighed on a scale with precision of 1g.

Compliance and side effects

Compliance to KD was evaluated daily by increasing in ketone bodies in urine (Accu-chek/Keto-diabur test Roche®) and plasma (Ranbut kit, Randox Laboratories Limited®) at baseline, 3 and 6 months after to start treatment. Side effects of KD such as changes in the gastrointestinal function (i.e., vomiting, diarrhea, constipation, gastritis) or others were monitored. The incidence of dyslipidemia and nutritional status were also monitored. The KD protocol applied not use citrate for the prevention of nephrolithiais.

Epileptic seizures and AED evaluation

The frequency of seizures, estimated from daily records, and the total daily dose of AEDs (mg), were recorded at the baseline and six month of follow-up by physician visits. At the three month follow-up visit, AEDs were adjusted according to the KD Protocol from the Children's Institute that is AEDs adjustments were performed only after 3 months of treatment.

Statistical analysis

For qualitative variables, we used the Chi-square test. The normality of the variables was tested using the Kolmogorov test (parametric variables $p>0.05$, non-parametric variables $p<0.05$). For quantitative non-parametric variables, we used Wilcoxon, Kruskal-Wallis and Spearman correlation tests. Variables are presented as mean and standard deviation (SD), and the minimum and maximum numbers of seizures are also provided. All statistical tests were performed by Statistical Package for the Social Sciences® version 20.0. The significance level for all analyses was $p<0.05$.

RESULTS

Demographics and clinical profile

Of the 26 patients (19 children and 7 adolescents) included, the average age was 6.5 years (range, 1.3 – 18 years); 76.9% were male, 65.4% were Caucasian, and the patient's mother was the diet/food preparer for 92.3% **(Table 2)**. After three months to start KD, three patients drop out of protocol: one ceased due to Doose syndrome (unable to tolerate the KD); one ceased due to cortical dysplasia (unable to respond to the KD); one ceased for unknown reasons. Thus, 23 patients completed the follow-up.

Clinical efficacy

After three months of KD, 64% of the patients demonstrated a >50% reduction in seizures which persisted up to the six months follow-up (68.2%). Seven participants reported being seizure-free at the six months follow-up. The etiologies of epilepsy in these patients were: GLUT-1 deficiency (n=1); Doose syndrome (n=1); cortical dysplasia (n=1); central nervous system malformation (CNS malformation) (n=1), sequelae of bacterial meningitis (n=1); and unknown (n=2). Broken down by etiological groups, Group 1 (genetic) demonstrated reduction in number of seizures in 83% of the patients, Group 2 (structural/metabolic) in 55%, and Group 3 (unknown) in 67% of the patients (**Table 3**).

The short time side effects were especially related to gastrointestinal tract. After

3 months 66.7% of patients in Group 1 had nausea or vomiting and 50% had diarrhea or constipation; Group 2 vomiting in 18.7% and constipation in 18.2% of patients, and in the Group 3, 11% had nausea, 22% had constipation and 33% had other adverse effects as abdominal pain, viral illness and pneumonia. After 6 months only 16.7% had colick infants, 9.1% had vomiting in Group 2 and 11.1% had constipation in Group 3. No patient developed nephrolithiasis, hypoglycemia, dehydration or acidosis and there were no significant changes in nutritional status, however the incidence of dyslipidemia increased in more than 50% of patients.

The average number of seizures was significantly reduced after three and six months of KD [baseline=12 (1-85) seizures/day; after 3 months= 4.6 (0-30), after 6 months 2 = 3.4 (0-10), $p<0.001$, $p=0.002$, respectively]. There was no significant difference in control of seizures between groups after 3 or 6 months of KD ($p=0.383$, $p=0.171$, respectively). **Figure 1** shows the average reduction of seizures according etiological groups.

Levels of β-hydroxybutyrate increased significantly [baseline = 0.69 (0.6); after 3 months = 2.7 (1.5), after 6 months = 3.1 (1.5), $p<0.001$]. There were no differences between groups after 3 months (Group 1=+1.89 (2.3); Group 2=+1.97 (1.5), Group 3=+2.24 (1.08), $p=0.755$) or after 6 months (Group 1=+3.19 (1.4); Group 2=+1.37 (1.4), Group 3=+2.94 (1.42), $p=0.061$). Negative correlation between the levels of β-hydroxybutyrate and number of seizures was observed for all patients ($r=-0.401$, $p=0.047$ after 3 months; $r=-0.606$, $p=0.003$ after 6 months). Except for one patient in Group 1, urinary ketosis was stable (>150 mg/dL) upon introduction of the KD with a higher proportion of fat (4:1).

The daily dose of AEDs showed a significant reduction for vigabatrin (82%), nitrazepam (50%), and valproate (41%); overall, the total dose was reduced 26% (1417 to 1050 mg, $p=0.013$). However, there was no significant difference between groups ($p>0.05$) (**Table 4**).

DISCUSSION

Our results correspond with those of other studies[15-17], especially when considering genetic epilepsies[18,19]. However, improve previous consensus about efficacy of KD, highlighting that 67% of patients with unknown epilepsy did show at least 50% reduction in seizures. This finding was reinforced by the average reduction of 61% seizures/day and 89% seizures/day after three and six months of KD, respectively.

The patients with structural/metabolic epilepsy were less well-controlled than the other groups. Almost half of those (45%) experienced a reduction of seizures below 50%. A case of ischemic encephalopathy was the worst responder, although a previous study reported a good response in such a case[20]. However, two patients (one with sequelae of meningitis and one with heteropathic periventricular epilepsy) had very strong reductions (>90%) and two other patients were seizure-free (one with cortical dysplasia and one with CNS malformation).

Currently, the principal indications of KD are GLUT-1 deficiency syndrome, pyruvate dehydrogenase complex deficiency, infantile spasms (West syndrome), Dravet syndrome and myoclonic-astatic epilepsy (Doose syndrome)[10,21], however our results demonstrate that other epilepsies may benefit from this treatment.

Another important point is that over time, both Group 1 and Group 3 showed significant reduction in seizure control (Group 1: p=0.043, p=0.042; Group 3: p=0.012, p=0.024, respectively after three and six months). However, Group 2 showed changes only after 3 months (p=0.011, p=0.373, respectively after three and six months), and after 6 months these patients showed resistance to KD despite of the high compliance to treatment, confirmed by maintaining of ketosis levels.

Although patients with refractory epilesy, except in the inborn errors of metabolism, remain with KD for 2 to 3 years, after 2 or 3 months of KD sufficient to evaluate the clinical response, being more enhanced until 6 months[21].

The association between levels of β-hydroxibutyrate and seizure control observed in our results confirms previous studies that showed the anticonvulsant effects of KD are maintained by ketone bodies whose modulate neurotransmitters, membrane channels and neuronal excitability[22-24]. Therefore, our positive results cannot exclude the relationship

between individual capacity to generate ketone bodies by liver and epilepsy etiology.

Although no difference in seizure reduction had been observed between the groups, it is important to note that improvement in clinical response were most evident after longer treatment durations. So, it is probable that maximum response of KD needs more than 2 or 3 months of treatment, times generally adopted by physicians to evaluate the efficacy and maintenance of treatment. In addition, our results support the contribution of KD to reduction of AED usage as shown by other authors[11,25]. After 6 months, AED usage was reduced in 26% of the total patients. This reduction is particularly relevant for patients under vigabatrin treatment that it had been associated with retinal toxicity and extrapyramidal symptoms[4,26].

Some studies have evaluated the influence of AEDs on the efficacy of the KD, MORRISON et al.,[27] showed that phenobarbital in combination with KD were less associated a >50% seizure reduction, while zonisamide increased efficacy of KD (90%), and lamotrigine not exerted influence. More recently, van der Louw et al.,[28] observed that lamotrigine reduced KD efficacy, but did not assess the effect of phenobarbital and zonisamide. In our study we did not evaluate these influences because the use of AEDs by children was not paired, making it difficult to compare drugs during the KD.

Our study has some limitations. However, the prevalence of epilepsy is low (0.5 to 1%) and refractory epilepsy is about 20-30%, which is characteristic of this epidemiological profile and also observed in many clinical trials. The study design did not include a control group, we could not establish a causal relationship for the changes and the clinical response to the KD needs to be interpreted with caution because the epileptic syndromes are complex and there may be interaction of AEDs. In addition, our study does not assess cognitive, learning ability and motor development associated with epilepsy, which can be influenced by KD. Nevertheless this study contributes to the understanding of the effects of KD in different forms of epilepsy in developing countries.

Moreover, the KD composition (presence of regional foods, nutrient proportions) and lack of compliance difficult to establish comparisons between studies. Finally, several studies have shown different roles of fatty acids in control of seizures. These studies propose that polyunsaturated fatty acids increased the efficiency of KD or levels of β-hydroxibutirate compared to saturated fatty acids[29,30,31].

In conclusion, our results show that the KD in the treatment of unknown etiological forms of epilepsy can promote good control of seizures, at least in structural/metabolic and genetic epilepsy types. Therefore, treatment with a ketogenic diet should be encouraged regardless of etiology, and research based in this treatment should give more emphasis to other forms of epilepsies.

CONFLICT OF INTEREST

We declare that there are no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge for grants received from the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP # 2012/03775-0, 2012/20789-5, 2014/26094-4, 2015/24928-8).

Table 1 –Ketogenic diet plan and treatment schedule.

Ratio	Fat	Calories	Carbohydrates and Proteins	Kcal per dietary unit	Treatment schedule
2:1	2g x 9 Kcal/g = 18	18	1g x 4 Kcal/g = 4	18 + 4 = 22	1st week
3:1	3g x 9 Kcal/g = 18	27	1g x 4 Kcal/g = 4	27 + 4 = 31	2nd week
4:1*	4g x 9 Kcal/g = 18	36	1g x 4 Kcal/g = 4	36 + 4 = 40	3rd week

Recommendations by FREEMAN et. al. (1994).* The 4:1 ratio was introduced according to the measure of ketonuria.

Table 2 – Demographic characteristics of patients (n=26).

Variables	N	%	p
Sex			**0.006**
Male	20	76.9	
Female	06	23.1	
Race			**0.001**
White	17	65.4	
Non-White	09	34.6	
Diet responsible			**<0.001**
Mother	24	92.3	
Father or Others	02	7.7	

Comparative analysis between categories performed by X^2 test and Fisher's exact test and significant level $p<0.05$.

Table 3 - Epilepsy etiology, classification of seizures and types of epilepsy.

Types of Epilepsy	Classification of Seizures	Control of Seizures	
		After 3 mo (n=26)	After 6 mo (n=23)
Group 1 – Genetic (n=6)			
Doose Syndrome	Myoclonic atonic	>90%	-
Doose Syndrome	Myoclonic atonic	>90%	>90%
Deficiency GLUT-1	Focal	>90%	>90%
Doose Syndrome	Myoclonic atonic	>90%	>90%
Pallister-Killian Syndrome	TCG	50 to 90%	50 to 90%
Chromosome deletion 2	Focal	<50%	<50%
Group 2 – Structural Metabolic (n=11)			
Cortical dysplasia	Tonic, Spasms	<50%	-
CNS malformation	Atypical absence, atonic Myoclonic	50 to 90%	50 to 90%
Hypoxia-Ischemic Encephalopathy	Focal and TCG	<50%	<50%
CNS malformation	Tonic, Spasms	50 to 90%	50 to 90%
Cortical dysplasia	Focal	>90%	>90%
Hypoxia Ischemic Encephalopathy	Tonic	<50%	<50%
Perinatal Stroke	Spasms	<50%	<50%
Sequelae of Bacterial Meningitis	Tonic	>90%	>90%
CNS malformation	Spasms	<50%	>90%
Sequelae of Bacterial Meningitis	Seizures not classified	NM	NM
Heteropathic Periventricular	Focal and TCG	>90%	>90%
Group 3 – Unknown (n=9)			
Unknown	Tonic	<50%	-
Unknown	Tonic	>90%	>90%
Unknown	Spasms	>90%	>90%
Unknown	Myoclonic, Spams	>90%	>90%
Unknown	Typical absence, Tonic, Focal	50 to 90%	50 to 90%
Unknown	Myoclonic Absent	50 to 90%	50 to 90%
Unknown	Atonic Myoclonic	50 to 90%	50 to 90%
Unknown	Tonic	<50%	<50%
Unknown	Spams	<50%	<50%

CNS: central nervous system; TCG: generalized tonic-clonic; NM: Not Measured (Monitoring of seizures by EEG).

Table 4 – Changes in antiepileptic drugs after 6 months of KD according etiologic groups.

Antiepileptic Drugs	Group 1 (n=6)		Group 2 (n=9)		Group 3 (n=11)		Total		p
	Baseline	6 months	Baseline	6 months	Baseline	6 months	Baseline	6 months	
	Posology (mg)		Posology (mg)		Posology (mg)		Posology (mg)		
Valproate	838 (284)	313 (375)	996 (313)	796 (458)	1154 (1304)	571 (366)	1016 (795)	591 (425)*	**0.024**
Clobazam	37 (38)	5 (9)	25 (15)	46 (70)	13 (19)	24 (19)	24 (22)	31 (51)	0.18
Topiramate	250 (218)	500 (500)	233 (76)	75 (66)	118 (24)	356 (431)	1925 (126)	315 (387)	0.18
Lamotrigine	150	0	120 (48)	135 (89)	192 (113)	200 (100)	147 (74)	142 (102)	0.317
Nitrazepam	0	0	18	16	6 (2)	2 (2)	8 (5)	4 (6)*	**0.042**
Vigabatrin	0	0	409 (655)	91 (202)	111 (333)	0	212 (488)	38 (136)*	**0.042**
Clonazepam	6 (9)	3 (5)	4 (4)	2 (3)	0	0	5 (6)	2 (4)	0.068
Levetiracetam	1125 (884)	250 (353)	0	0	2016 (1118)	1583 (1506)	1660 (1029)	1050 (1304)	0.18
Oxcarbamazepine	0	0	1800	1200	840 (831)	600 (1039)	1080 (831)	750 (900)	0.157
Phenobarbital	0	0	300	300	0	0	60 (49)	70 (48)	0.655
Ethosuximide	750	0	1750	750	500	500	1000 (661)	417 (382)	0.18
Phenytoin	0	0	300	300	0	0	300	300	----
Primidone	1000	0	0	0	0	0	1000	0	----
Carbamazepine	0	0	0	0	400	0	400	0	----
Total (mg)	1697 (857)	1491 (230)	1095 (808)	806 (769)*	1623 (1300)	1200 (1298)	1417(1014)	1050(976)*	**0.013**

Comparative analyzes the Wilcoxon test and Kruskal-Wallis, Values expressed as mean and standard deviation, *Significant differences between 6 months vs Baseline ($p<0.05$).

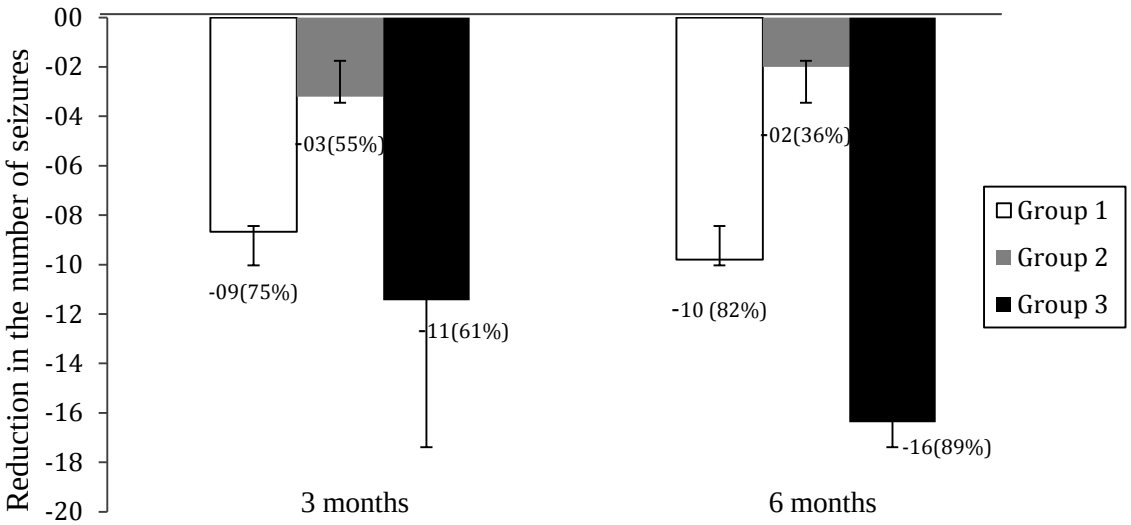


Figure 1 - Reduction in the number (percentage) of seizures according to etiological group and duration of ketogenic diet (KD). No Statistical differences between groups measured by Kruskal-Wallis test after 3 and 6 months of KD (p=0.383, p=0.171, respectively).

REFERENCES

Gitaí DL, Romcy-Pereira RN, Gitaí LL, et al. [Genes and epilepsy I: epilepsy and genetic alterations]. Rev Assoc Med Bras. 2008; 54(3): 272-278.

Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. Epilepsia. 2014;55(4):475-82.

Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). Epilepsia. 2005;46(4):470-2.

Akula JD. Vigabatrin retinal toxicity in children with infantile spasms: An observational cohort study. Neurology. 2015;85(7):655-6.

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(4):676-85.

Shorvon SD. The etiologic classification of epilepsy. Epilepsia. 2011;52(6):1052-7.

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

Kwan P, Brodie MJ. Early identification of refractory epilepsy. N Engl J Med. 2000;342(5):314-9.

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

Kossoff 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):304-17.

Helbig I, Lowenstein DH. Genetics of the epilepsies: where are we and where are we going? Curr Opin Neurol. 2013;26(2):179-85.

Freeman JM, Kelly MT, Freeman JB. The epilepsy diet treatment. New York: Demos; 1994.

Group WMGRS. WHO Child Growth Standards based on length/height, weight and age. Acta Paediatr Suppl. 2006;450:76-85.

de Onis M, Onyango AW, 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;85(9):660-7.

Pires ME, Ilea A, Bourel E, et al. Ketogenic diet for infantile spasms refractory to

first-line treatments: an open prospective study. Epilepsy Res. 2013;105(1-2):189-94.

Taub KS, Kessler SK, Bergqvist AG. Risk of seizure recurrence after achieving initial seizure freedom on the ketogenic diet. Epilepsia. 2014;55(4):579-83.

Hallböök T, Sjölander A, Åmark P, et al. Effectiveness of the ketogenic diet used to treat resistant childhood epilepsy in Scandinavia. Eur J Paediatr Neurol. 2015;19(1):29-36.

Kelley SA, Kossoff EH. Doose syndrome (myoclonic-astatic epilepsy): 40 years of progress. Dev Med Child Neurol. 2010;52(11):988-93.

Becker F, Schubert J, Weckhuysen S, et al. Do Glut1 (glucose transporter type 1) defects exist in epilepsy patients responding to a ketogenic diet? Epilepsy Res. 2015;114:47-51.

Thammongkol S, Vears DF, Bicknell-Royle J, et al. Efficacy of the ketogenic diet: which epilepsies respond? Epilepsia. 2012;53(3):e55-9.

Pasca L, De Giorgis V, Macasaet JA, Trentani C, Tagliabue A, Veggiotti P. The changing face of dietary therapy for epilepsy. Eur J Pediatr. 2016;175(10):1267-76.
Omote H, Miyaji T, Juge N, et al. Vesicular neurotransmitter transporter: bioenergetics and regulation of glutamate transport. Biochemistry. 2011;50(25):5558-65.

McNally MA, Hartman AL. Ketone bodies in epilepsy. J Neurochem. 2012;121(1):28-35.
Ruskin DN, Masino SA. The nervous system and metabolic dysregulation: emerging evidence converges on ketogenic diet therapy. Front Neurosci. 2012;6:33.

Nam SH, Lee BL, Lee CG, et al. The role of ketogenic diet in the treatment of refractory status epilepticus. Epilepsia. 2011;52(11):e181-4.

Schonstedt V, Stecher X, Venegas V, et al. Vigabatrin-induced MRI changes associated with extrapyramidal symptoms in a child with infantile spasms. Neuroradiol J. 2015;28(5):515-8.

Morrison PF, Pyzik PL, Hamdy R, Hartman AL, Kossoff EH. The influence of concurrent anticonvulsants on the efficacy of the ketogenic diet. Epilepsia.

Van der Louw EJ, Desadien R, Vehmeijer FO, van der Sijs H, Catsman-Berrevoets CE, Neuteboom RF. Concomitant lamotrigine use is associated with decreased efficacy of the ketogenic diet in childhood refractory epilepsy. Seizure. 2015;32:75-7.

Xiao Y, Li X. Polyunsaturated fatty acids modify mouse hippocampal neuronal excitability during excitotoxic or convulsant stimulation. Brain Res. 1999;846(1):112-
Yoon JR, Lee EJ, Kim HD, Lee JH, Kang HC. Polyunsaturated fatty acid-enriched

diet therapy for a child with epilepsy. Brain Dev. 2014;36(2):163-6.

Fuehrlein BS, Rutenberg MS, Silver JN, Warren MW, Theriaque DW, Duncan GE, et al. Differential metabolic effects of saturated versus polyunsaturated fats in ketogenic diets. J Clin Endocrinol Metab. 2004;89(4):1641-5.