

# **Terapias dietéticas cetogénicas para el tratamiento de la epilepsia refractaria en la edad pediátrica.**

**EFICACIA, SEGURIDAD Y CAMBIOS A NIVEL  
METABOLÓMICO, TRANSCRIPTÓMICO Y DE  
ESTRÉS OXIDATIVO.**

**Tesis doctoral presentada como compendio de  
publicaciones**

**Universidad Autónoma de Madrid**

**Jana Ruiz Herrero  
Directora: Consuelo Pedrón Giner**

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA



TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS PARA EL  
TRATAMIENTO DE LA EPILEPSIA REFRACTARIA EN LA  
EDAD PEDIÁTRICA.

EFICACIA, SEGURIDAD Y CAMBIOS A NIVEL  
METABOLÓMICO, TRANSCRIPTÓMICO Y DE ESTRÉS  
OXIDATIVO.

TESIS DOCTORAL PRESENTADA COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

JANA RUIZ HERRERO

MADRID, 2021

**Directora**

**Dra. Consuelo Pedrón Giner**

Médico Adjunto de la Sección de Gastroenterología y Nutrición

Hospital Infantil Universitario Niño Jesús

Madrid

*A hombros de gigantes.*

Isaac Newton, 1676.

## AGRADECIMIENTOS

Ha pasado mucho tiempo desde que este trabajo empezó a ser simplemente un pensamiento. En aquel momento, allá por el 2014, pensé que la vida, yo misma y el proyecto, serían exactamente como yo tenía pensado. Pero ha pasado no solo el tiempo, sino muchos otros acontecimientos que fueron cambiándolo todo y me obligaron a ser diferente, a saber esperar, a aprender a anteponer lo importante y a renunciar a veces. En este proceso de aprendizaje lo que más he valorado ha sido las personas que me han acompañado. No podría haber llegado al final de este camino, más largo y tortuoso de lo previsto, sin ayuda, por lo que no puedo dejar de dedicar unas palabras de agradecimiento a esas personas que han ido a mi lado.

A los pacientes y sus familias, sin los que no hubiera sido posible llevar a cabo este trabajo. El objetivo último de esta investigación es avanzar para conocer y manejar mejor una terapia a la que muchos niños llegáis tras mucho sufrimiento, y que supone una última opción cuando debería plantearse mucho antes.

A la Dra. Rosana Muñoz, mi tutora *in extremis*. Gracias por aceptar serlo y colaborar conmigo en este proyecto.

A todo el equipo de enfermería del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, porque a pesar de vuestra carga habitual de trabajo, habéis sacado tiempo para poder extraer nuestras muestras, procesarlas y enviarlas.

Al servicio de Neurología del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, y en especial, al Dr. García Peñas y al Dr. González Gutiérrez-Solana, por vuestras aportaciones en los trabajos publicados, por revisarlos las veces que hiciera falta y por ayudarme con los aspectos neurológicos de este estudio.

A todo el equipo del Dr. Viña del Departamento de Fisiología de la Universidad de Medicina de Valencia, por analizar las muestras de nuestros pacientes.

A mis amigos, mis *cos* y a toda la gente que ha confiado en que podía terminarlo.

Y en especial, gracias a *mis gigantes*, sobre cuyos hombros he ido todo este tiempo, vislumbrando el camino y su final:

A la Dra. Consuelo Pedrón, gracias por animarme a hacer este proyecto. Por tu tiempo, tu paciencia, tu dedicación y tu confianza en mí. Por tu pulcritud corrigiendo todo al mínimo detalle, una y otra vez. Por tu ejemplo de trabajo constante, de aprendizaje continuo y de dedicación incansable. Por tus enseñanzas, de medicina y de vida. Gracias. Mil veces gracias. Por todo. Espero algún día ser para alguien el modelo que eres tú para mí. Ha sido un auténtico honor y placer trabajar a tu lado.

A la Dra. Gloria Olaso, un millón de gracias. Ha sido un gusto compartir este proyecto contigo. Gracias por responderme siempre al momento y por tus explicaciones. Gracias porque haces que parezca fácil lo difícil. Porque no te has venido abajo cada vez que nos han echado para atrás en una revista, al contrario, siempre me has apoyado, has buscado una alternativa y has revisado una y otra vez nuestro trabajo.

A mi familia. A mi padre y a mi hermana, que siempre estáis ahí, respetando mis tiempos y mis silencios. A mi madre. Gracias por cuidarme desde donde estés. Gracias porque estoy aquí porque me inculcaste la perseverancia, el esfuerzo, la dedicación. Porque a través de ti entendí que si quería algo tendría que hacer todo lo posible por conseguirlo y no conformarme.

A Víctor, mi compañero incondicional. No puedo agradecerte todo lo que has hecho por mí. Gracias por entender que este proyecto era importante, por alentarme en cada desánimo, por asesorarme con tu *cráneo privilegiado* que no deja de sorprenderme cada día, por cederme parte de tu tiempo, por anteponerme tantas veces, por conocerme mejor que yo misma y saber lo que necesito en cada momento, por completarme, por hacerme reír a carcajadas, incluso en los momentos en los que debería llorar a mares de pena, por estar aquí, siempre. Por quererme infinito y sin fisuras a pesar de todos mis defectos.

A Sofía y Clara, mis pequeñas grandes gigantes, gracias. Gran parte de la motivación para terminar este proyecto procede de vosotras. Espero ser un ejemplo de que siempre se puede, aunque el camino sea más largo y difícil de lo esperado, con tesón y rodeado de gente buena, siempre podréis. Algún día, más pronto de lo que parece, las gigantes, de verdad, seréis vosotras.

## ABREVIATURAS

ACTH: hormona adrenocorticotropa

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADP: adenosín difosfato

ALT: alanino aminotransferasa

AMPA: ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico

ANOVA: análisis de la varianza

ARN: ácido ribonucleico

ARNi: ARN interferente

ARNm: ARN mensajero

ARNt: ARN de transferencia

ARX: *Aristaless related homeobox*

AST: aspartato amino transferasa

ATP: adenosín trifosfato

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro

BK: *big potassium*

BSA: albúmina de suero bovino

BSN: *bassoon presynaptic cytomatrix protein*

C: gramos de carbohidratos

CACNA1A: canal de calcio dependiente de voltaje subunidad alfa 1A

CACNA1C: canal de calcio dependiente de voltaje subunidad alfa 1C

CACNA1H: canal de calcio dependiente de voltaje subunidad alfa 1H

CAT: ciclo del ácido tricarbóxico

CDH2: cadherina 2

CDKL5: kinasa-like 5 dependiente de ciclina

CHRNA4: receptor colinérgico nicotínico alfa 4



CLIFAHDD: contracturas congénitas faciales y de extremidades con hipotonía y retraso del desarrollo

CNTN2: contactina 2

CNTNAP2: proteína-símil asociada a contactina 2

CoA: coenzima A

DAM: dieta de Atkins modificada

DBIG: dieta de bajo índice glucémico

DC: dieta cetogénica

DCC: dieta cetogénica clásica

DC-TCM: dieta cetogénica con triglicéridos de cadena media

DEXA: absorciometría de rayos X de energía dual

DHA: ácido docosahexaenoico

DLGAP: proteínas asociadas a discos grandes

DNPH: dinitrofenilhidracina

DOC2A: proteína alfa que contiene un dominio doble similar a C2

EEG: electroencefalograma

EPA: ácido eicosapentanoico

ERO: especies reactivas de oxígeno

FAEs: fármacos antiepilépticos

FGF: factor de crecimiento de fibroblastos

FID: *free induction decay*

FIRES: síndrome de epilepsia relacionada con infección febril

G: gramos de grasas

GABA: ácido gammaaminobutírico

GABRG2: receptor GABA tipo A subunidad gamma 2

GAD: glutamildecarboxilasa

GADPH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GGT: gamma glutamil transpeptidasa

GLUT1-DS: *glucose transporter type 1 deficiency syndrome*

GMR3: receptor metabotrópico de glutamato 3 (mGlu3)

GNG10: proteína G subunidad gamma 10

GRIN2B: receptor inotrópico de glutamato tipo NMDA subunidad 2B

GSH: glutatión reducido

GSSG: glutatión oxidado

GTP: guanosín trifosfato

HCTR 1: receptor de hipocretina 1

HCTR: receptor de hipocretina 2

HDL: lipoproteínas de alta densidad (*high density lipoprotein*)

HMG: 3-hidroxi-3-metil-glutaril

HPLC: *high performance liquid chromatography*

HTR6: receptor 6 de 5-hidroxitriptamina

IG: índice glucémico

ILAE: Liga Internacional contra la Epilepsia

K: potencial cetogénico

KA: potencial anticetogénico

KCND2: canal de potasio dependiente de voltaje subfamilia D miembro 2

KCNJ12: canal de potasio rectificador interno sensible a ATP 12

KCNK6: canal de potasio subfamilia K miembro 6

KCNMA1: canal de potasio activado por calcio subfamilia M subunidad alfa 1

KCNQ2: canal de potasio dependiente de voltaje subfamilia Q miembro 2

KCNQ3: canal de potasio dependiente de voltaje subfamilia Q miembro 3

KCNT1: canal de potasio dependiente de sodio subfamilia T miembro 1

KDT: *ketogenic dietary therapies*

LCR: líquido cefalorraquídeo

LDL: *low density lipoproteins* o lipoproteínas de baja densidad

LTP: potenciación a largo plazo

MAOA: monoaminoxidasa A

MDA: *malondialdehyde* o malondialdehído

miARN: micro-ARN

MT: receptor de melatonina

MECP2: proteína de unión a metil CpG 2

MGluR: receptores metabotrópicos de glutamato

NADH: nicotamida adenina dinucleótico en forma reducida

NEDD4: *neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4*

NEGR1: regulador de crecimiento neuronal 1

NMDA: N-metil-D-aspartato

Nrf2: factor nuclear eritroide 2

NRSF: factor silenciador neuronal restrictivo

P: gramos de proteínas

PBS: *buffer* fosfato salino

PBS-T: *buffer* fosfato salino con Teewn

PCA: análisis de componentes principales

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PDH: piruvato deshidrogenasa

PHOX2B: *paired-like homeobox 2*

PPARs: receptores activados por proliferadores de peroxisomas

PRK: proteín kinasa

PRKC: proteín kinasa C

PTPN11: no receptor proteín-tirosín-fosfatasa tipo 11

PUFAs: ácidos grasos poliinsaturados

RBFOX1: proteína de unión al RNA fox 1

RBP: *retinol binding protein* o proteína transportadora de retinol

RIN: número de integridad del ARN

RMA: algoritmo de la razón monótona

RMN: resonancia magnética nuclear

SCN1A: canal de sodio dependiente de voltaje subunidad alfa 1

SCN1B: canal de sodio dependiente de voltaje subunidad beta 1

SCN2A: canal de sodio dependiente de voltaje subunidad alfa 2

SCN3A: canal de sodio dependiente de voltaje subunidad alfa 3

SCN9A: canal de sodio dependiente de voltaje subunidad alfa 9

SD: *standar deviation* o desviación estándar

SD-GLUT1: síndrome de déficit del transportador cerebral de la glucosa tipo 1

SDS: dodecilsulfato sódico

SNC: sistema nervioso central

SLC6A1: transportador de ácido gamma-aminobutírico de la familia 6 miembro 1

SLC9A6: transportador soluble de la familia 9 miembro A6

STXBP1: proteína de unión a syntaxina 1

TBA: ácido 2-tiobarbitúrico

TCL: triglicéridos de cadena larga

TCM: triglicéridos de cadena media

TDC: terapias dietéticas cetogénicas

TrkB: receptor de neurotrofinas (receptor de BDNF)

UCP: proteínas desacoplantes

VLDL: lipoproteína de muy baja densidad

## ÍNDICE

1. PRESENTACIÓN.....	20
2. RESUMEN.....	22
3. ABSTRACT.....	24
4. INTRODUCCIÓN.....	26
4.1 EPILEPSIA REFRACTARIA EN LA INFANCIA.....	26
4.1.1 IMPACTO DE LA LA EPILEPSIA REFRACTARIA EN LA INFANCIA.....	26
4.1.2 FISIOPATOLOGÍA DE LA EPILEPSIA.....	29
4.1.3 EPILEPSIA Y ESTRÉS OXIDATIVO.....	37
4.2 TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA EPILEPSIA REFRACTARIA.....	39
4.2.1 HISTORIA DE LAS TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS.....	39
4.2.2 DEFINICIÓN Y TIPOS DE TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS.....	41
4.2.3 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS.....	43
4.2.3.1 Bioquímica del ayuno y la cetogénesis.....	44
4.2.3.2 Los cuerpos cetónicos como mecanismo de acción de la dieta cetogénica.....	48
4.2.3.3 Implicación de la restricción de glucosa en el efecto de la dieta cetogénica.....	50
4.2.3.4 Papel de los ácidos grasos en el efecto de la dieta cetogénica.....	51
4.2.3.5 Metabolismo energético y biogénesis mitocondrial.....	52
4.2.4 EFICACIA DE LAS TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA EPILEPSIA REFRACTARIA.....	54
4.2.4.1 Eficacia global de las terapias dietéticas cetogénicas.....	54
4.2.4.2 Eficacia de las terapias dietéticas cetogénicas en etiologías de epilepsia particularmente respondedoras.....	58
4.2.4.3 Otras condiciones que implican buena respuesta a las terapias dietéticas cetogénicas.....	61
4.2.5 CONTRAINDICACIONES DE LAS TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS.....	62

4.2.6 EFECTOS ADVERSOS DE LAS TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS.....	63
4.2.6.1 Efectos adversos precoces.....	63
4.2.6.2 Efectos adversos a medio y largo plazo.....	65
4.2.7 REPERCUSIÓN DE LAS TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS SOBRE EL ESTADO NUTRICIONAL Y EL CRECIMIENTO.....	67
4.2.7.1 Repercusión en el desarrollo ponderoestatural.....	67
4.2.7.2 Déficit de vitaminas y micronutrientes.....	70
4.3 APLICACIÓN DE LA TRANSCRIPTÓMICA Y LA METABOLÓMICA EN EL ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LAS TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS.....	74
4.3.1 TIPOS DE ARN, TRANSCRIPTÓMICA Y ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA .....	74
4.3.2 FUNDAMENTOS DE LA METABOLÓMICA.....	77
5. OBJETIVOS.....	78
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	79
7. RESULTADOS.....	93
7.1 PRIMER ARTÍCULO: SAFETY AND EFFECTIVENESS OF THE PROLONGED TREATMENT OF CHILDREN WITH A KETOGENIC DIET.....	94
7.1.1 PRESENTACIÓN DEL ARTÍCULO.....	94
7.1.2 ARTÍCULO PUBLICADO.....	95
7.2 SEGUNDO ARTÍCULO: CLASSIC KETOGENIC DIET AND MODIFIED ATKINS DIET IN SLC2A1 POSITIVE AND NEGATIVE PATIENTS WITH SUSPECTED GLUT1 DEFICIENCY SYNDROME: A SINGLE CENTER ANALYSIS OF 18 CASES.....	110
7.2.1 PRESENTACIÓN DEL ARTÍCULO.....	110
7.2.2 ARTÍCULO PUBLICADO.....	111
7.3 TERCER ARTÍCULO: TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS EN EPILEPSIA: EXPERIENCIA EN 160 PACIENTES DURANTE 18 AÑOS.....	125
7.3.1 PRESENTACIÓN DEL ARTÍCULO.....	125
7.3.2 ARTÍCULO PUBLICADO.....	126
7.4 CUARTO ARTÍCULO: EFFICACY AND SAFETY OF KETOGENIC DIETARY THERAPIES IN INFANCY. A SINGLE-CENTER EXPERIENCE IN 42 INFANTS LESS THAN TWO YEARS OF AGE.....	138

7.4.1 PRESENTACIÓN DEL ARTÍCULO.....	138
7.4.2 ARTÍCULO PUBLICADO.....	139
7.5 QUINTO ARTÍCULO: TRANSCRIPTOMIC PROFILE OF EPILEPTIC CHILDREN TREATED WITH KETOGENIC THERAPIES.....	145
7.5.1 PRESENTACIÓN DEL ARTÍCULO.....	145
7.5.2 ARTÍCULO PUBLICADO.....	146
7.6 OTROS RESULTADOS .....	156
7.6.1 CAMBIOS METABOLÓMICOS INDUCIDOS POR LAS TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS.....	156
7.6.2 ANÁLISIS DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN PACIENTES CON EPILEPSIA REFRACTARIA TRATADOS CON TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS.....	159
8. DISCUSIÓN.....	160
8.1 EFICACIA DE LAS TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS EN LA EDAD PEDIÁTRICA...160	
8.1.1 EFICACIA DE LAS TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS EN EPILEPSIA REFRACTARIA EN LA INFANCIA.....	160
8.1.2 EFICACIA DE LAS TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS EN EL SÍNDROME DE DEFICIENCIA DE GLUT1.....	164
8.1.3 EFICACIA DE LAS TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS EN LACTANTES.....	167
8.1.4 EFICACIA A LARGO PLAZO DE LAS TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS.....	170
8.2 SEGURIDAD DE LAS TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS EN LA EDAD PEDIÁTRICA.....	171
8.2.1 EFECTOS ADVERSOS A CORTO PLAZO.....	171
8.2.2 EFECTOS ADVERSOS A MEDIO Y LARGO PLAZO.....	173
8.2.2.1 Efectos adversos gastrointestinales.....	173
8.2.2.2 Alteración del perfil lipídico y riesgo cardiovascular.....	174
8.2.2.3 Afectación de la salud ósea.....	176
8.2.2.4 Hipercalciuria y litiasis renal.....	178
8.2.2.5 Repercusión en los niveles de vitaminas, minerales y otros nutrientes.....	180
8.2.2.6 Repercusión en el crecimiento.....	183
8.3 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS.....	185

8.3.1 MODIFICACIONES DEL TRANSCRIPTOMA INDUCIDAS POR LAS TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS.....	185
8.3.2 CAMBIOS METABOLÓMICOS INDUCIDOS POR LAS TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS.....	193
8.3.3 REPERCUSIÓN DE LAS TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS EN EL ESTRÉS OXIDATIVO.....	195
9. CONCLUSIONES.....	198
10. ANEXOS .....	200
10.1 PRESENTACIÓN DE PÓSTERES EN REUNIONES CIENTÍFICAS.....	200
10.2 REDACCIÓN DE MATERIAL CIENTÍFICO.....	201
10.3 PARTICIPACIÓN EN CURSOS.....	202
11. BIBLIOGRAFÍA .....	203



---

# 1. PRESENTACIÓN

La epilepsia constituye uno de los principales trastornos neurológicos en la infancia. Aunque la mayoría de los pacientes mejora con el uso de fármacos antiepilépticos (FAEs), se estima que entre un 10 y un 40% de los pacientes pediátricos epilépticos padecen una epilepsia farmacorresistente o refractaria, definida por la Comisión de Clasificación y Terminología de la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE) como aquella que no se controla de forma adecuada con el uso de al menos dos FAEs (combinados o en monoterapia) a las dosis máximas toleradas. Los niños con epilepsia refractaria sufren una grave afectación de su calidad de vida, tanto por la persistencia de las crisis como por las consecuencias que éstas pueden tener sobre el desarrollo cognitivo y la aparición de efectos secundarios relacionados con la politerapia. En estos casos, las terapias dietéticas cetogénicas (TDC) se plantean como una alternativa terapéutica.

Existen varios tipos de TDC que han sido empleados para el tratamiento de la epilepsia refractaria infantil. Sin embargo, no se han encontrado diferencias claras en su perfil de seguridad y eficacia. Todas las variantes conllevan una restricción dietética más o menos rígida y variable en función del tipo de dieta, pero sigue siendo controvertido el efecto sobre el crecimiento y las diferencias entre ellas en cuanto a la repercusión sobre el mismo. Por otro lado, los mecanismos por los que estas dietas tienen un efecto anticonvulsivante y neuroprotector están siendo evaluados desde hace décadas.

En el presente trabajo se ha estudiado la eficacia de diferentes tipos de TDC en el control de las crisis epilépticas en población pediátrica, su perfil de seguridad y su repercusión sobre el estado nutricional y el crecimiento en la infancia. Se ha llevado a

cabo además un estudio sobre los cambios que pueden producir las TDC a nivel transcriptómico, metabolómico y de estrés oxidativo con el fin de arrojar algo de luz sobre los mecanismos de acción de este tratamiento en auge.

---

## 2. RESUMEN

La epilepsia es uno de los principales problemas neurológicos en la infancia y hasta en un tercio de los pacientes puede ser refractaria al tratamiento con medicación antiepiléptica. En estos casos las TDC son una alternativa terapéutica. El presente trabajo evalúa la eficacia y la seguridad de las TDC en niños con epilepsia refractaria y/o déficit del transportador cerebral de la glucosa tipo 1 (SD-GLUT1), tanto a corto como a largo plazo. Además, se han estudiado las modificaciones que tienen lugar a nivel transcriptómico, metabolómico y de estrés oxidativo con el fin de estudiar posibles mecanismos de acción de estas dietas. Para ello se analizó la expresión de ARNm y ARNm<sub>i</sub> de células mononucleares de sangre periférica, así como el perfil metabolómico y los niveles de proteínas oxidadas y malondialdehído (MDA) en plasma en 8 niños, antes de la dieta y tras al menos 6 meses de tratamiento. Se trata de un estudio retrospectivo y prospectivo que recoge los datos clínicos y analíticos de niños epilépticos sometidos a alguna TDC al inicio del tratamiento y a los 3, 6 y 12 meses, y anualmente posteriormente. Se observó que en la cohorte pediátrica de 160 pacientes con epilepsia refractaria que se siguieron durante dos años, lograron una buena respuesta al tratamiento el 41,9%, 37,5%, 28,7% y 16,2% en los diferentes intervalos de tiempo, quedando libres de crisis entre un 14,4% y un 10,6%. En el grupo de 42 lactantes (menores de 2 años) que fueron tratados con TDC los resultados de eficacia fueron algo superiores, observándose una buena respuesta en 50%, 45%, 38% y 17% en los distintos cortes de tiempo, y respondiendo hasta un 63% de los niños con síndrome de West. En el grupo de 26 pacientes que siguieron un tratamiento prolongado durante más de 2 años, la respuesta fue excelente en un 60-75%. En el grupo de 18 niños que iniciaron el tratamiento por

sospecha de SD-GLUT1 más de la mitad de los pacientes experimentó una mejoría significativa de las crisis epilépticas o de sus trastornos del movimiento, sin encontrar diferencias de eficacia en función del tipo de dieta empleado o en función de si se confirmó o no el diagnóstico mediante la determinación de la mutación del gen SLC2A1. Los efectos adversos fueron muy frecuentes, tanto precozmente (durante el primer mes) como a largo plazo. El 48% de los pacientes presentaron efectos secundarios precoces de forma global, siendo este porcentaje algo inferior en el grupo de los lactantes (40%) y de los niños con SD-GLUT1 (33%). Los más frecuentes fueron la hipoglucemia asintomática y problemas digestivos. A largo plazo hasta la mitad de los niños padecieron complicaciones, reduciéndose este porcentaje a lo largo del seguimiento, y siendo las más frecuentes la hipercalciuria, los problemas gastrointestinales y la dislipemia. Se comprobó cierta tendencia a la afectación del crecimiento, especialmente en tratamientos prolongados y en pacientes de menor edad. Las TDC redujeron significativamente los niveles plasmáticos de prealbúmina, proteína transportadora de retinol, vitamina A y magnesio, mientras que mejoraron los niveles de vitamina D, selenio y carnitina. Se observaron cambios metabólicos con descenso de algunos de los aminoácidos glucogénicos y de piruvato, y una ligera elevación de las proteínas oxidadas sin cambios en los niveles de MDA tras la intervención. En el análisis del transcriptoma nuestro estudio reveló modificaciones en la transcripción de 4.630 genes y 230 miARN, modificándose, sobre todo, los genes implicados en la protección contra las crisis epilépticas. Estos genes codifican colectivamente para canales iónicos, receptores de neurotransmisores y proteínas estructurales de sinapsis. Estos resultados respaldan la eficacia clínica de las TDC en la epilepsia refractaria y arrojan luz sobre los posibles mecanismos antiepilépticos y neuroprotectores que aún no han sido completamente dilucidados.

---

## 3. ABSTRACT

Epilepsy is one of the main neurological problems in childhood, and up to a third of patients may suffer from refractory epilepsy. In these cases, ketogenic dietary therapies (KDT) are a therapeutic alternative. The present work evaluates the efficacy and safety of KDT in children with refractory epilepsy and/or glucose transporter type 1 deficiency syndrome (GLUT1-DS), both in the short term and in the long term. Furthermore, the modifications that take place in the transcriptomic and metabolomic profile and oxidative stress have been analyzed in order to study the possible mechanisms of action of these diets. For this, the expression of mRNA and miRNA of peripheral blood mononuclear cells as well as the metabolomic profile and the levels of oxidized proteins and malondialdehyde (MDA) in plasma was analyzed in 8 children, before the diet and after at least 6 months of treatment. This is a retrospective and prospective study that collects the clinical and analytical data of epileptic children treated with a KDT at the beginning of treatment and at 3, 6 and 12 months, and annually thereafter. It was observed that in the pediatric cohort of 160 patients with refractory epilepsy who were followed for two years, 41.9%, 37.5%, 28.7% and 16.2% achieved a good response in the different intervals of time. The percentage of patients who were seizure-free was between 14.4% and 10.6%. In the group of 42 infants (less than 2 years old) who were treated with KDT, the efficacy results were higher, with a good response being observed in 50%, 45%, 38% and 17% in the different time slices, and responding up to 63% of children with West syndrome. In the group of 26 patients who followed a prolonged treatment for more than 2 years, the response was excellent in 60-75%. In the group of 18 children who started treatment for a suspected GLUT1-DS, more than half of the patients experienced a

significant improvement in seizures or in their movement disorders, without differences in efficacy depending on the type of diet used or depending on whether the diagnosis was confirmed or not by determining the SLC2A1 gene mutation. Adverse effects were very frequent, both early (during the first month) and in the long term. Overall, 48% of the patients presented early side effects. This percentage was lower in the group of infants (40%) and children with GLUT1-DS (33%). The most frequent were asymptomatic hypoglycemia and digestive problems. In the long term, up to half of the children suffered complications. This percentage decreased throughout the follow-up, and the most frequent were hypercalciuria, gastrointestinal disturbances and dyslipidemia. A certain tendency to growth impairment was found, especially in prolonged treatments and in younger patients. KDT significantly reduced plasma levels of prealbumin, retinol binding protein, vitamin A, and magnesium, while levels of vitamin D, selenium, and carnitine improved. Metabolomic changes were observed with a decrease in some of the glucogenic amino acids and pyruvate, and a slight elevation of the oxidized proteins with no changes in MDA levels after the intervention. In the analysis of the transcriptome, our study revealed modifications in the transcription of 4,630 genes and 230 miRNAs. We found that the genes involved in the protection against epileptic seizures were among those mainly changed. These genes collectively encode for ion channels, neurotransmitter receptors, and synapse structural proteins. These results support the clinical efficacy of KDT in refractory epilepsy and shed light on possible antiepileptic and neuroprotective mechanisms that have not yet been fully elucidated.

## 4. INTRODUCCIÓN

### 4.1 EPILEPSIA REFRACTARIA EN LA INFANCIA

#### 4.1.1 IMPACTO DE LA EPILEPSIA REFRACTARIA EN LA INFANCIA

La epilepsia constituye uno de los principales trastornos neurológicos en la infancia. Consiste en una alteración cerebral crónica en la que se produce una excesiva y descoordinada descarga de neuronas de la corteza cerebral que se manifiesta clínicamente con la aparición de crisis epilépticas. El concepto de epilepsia ha sido modificado en los últimos años y actualmente se define clínicamente como una enfermedad del cerebro definida por cualquiera de las siguientes condiciones<sup>1</sup>:

1. Al menos dos crisis no provocadas (o reflejas) con más 24 horas de separación.
2. Una crisis no provocada (o refleja) y una probabilidad de presentar nuevas crisis durante los 10 años siguientes similar al riesgo general de recurrencia (al menos el 60%) tras la aparición de dos crisis no provocadas.
3. Diagnóstico de un síndrome de epilepsia.

La epilepsia se considera refractaria o farmacorresistente cuando no se controla con el uso de al menos dos FAEs apropiados para el tipo de crisis o síndrome epiléptico del paciente, utilizados de forma independiente o en combinación, y a las dosis adecuadas<sup>2</sup>. La identificación precoz de estos pacientes es vital para ofrecerles otras estrategias terapéuticas con el fin de evitar el deterioro neurológico o la aparición de efectos secundarios debidos al uso de múltiples fármacos.

La etiología de la epilepsia constituye un factor determinante para la evolución y el pronóstico de la misma, y el conocimiento de la causa del trastorno permite enfocar el

tratamiento de forma adecuada desde el principio, ya que algunas etiologías responden mejor a determinados FAEs o incluso a las TDC.

Por otra parte, las epilepsias pueden organizarse en síndromes epilépticos en función de las peculiaridades clínicas y eléctricas que son compartidas por pacientes que padecen crisis, pudiendo ser éstas secundarias a diferentes etiologías<sup>3</sup>. Esta clasificación se basa en unas características típicas de la epilepsia en cuanto a la edad de inicio (y de remisión en algunos casos), el tipo de crisis y la aparición de un patrón característico en el electroencefalograma (EEG) o en las pruebas de imagen<sup>4</sup>. Esta clasificación es útil para llevar a cabo un enfoque diagnóstico y terapéutico inicial, dado que algunos de estos síndromes presentan mejor respuesta a ciertos FAEs y a las TDC.

La incidencia global de epilepsia es de 61,4 por cada 100.000 habitantes al año según revisiones y metaanálisis publicados a nivel internacional<sup>5</sup>. La incidencia es superior en países en vías de desarrollo y en clases socioeconómicas bajas<sup>6</sup>. En España hay unos 400.000 pacientes con epilepsia, y la incidencia anual es de 31 a 57 casos por 100.000 habitantes<sup>7</sup>. Estos datos son superiores en la edad pediátrica, alcanzando hasta los 3,7 casos por cada 1.000 niños de entre 6 y 14 años<sup>7</sup>. Existen pocos estudios epidemiológicos sobre epilepsia infantil en España, pero los publicados reportan una incidencia anual de unos 60 casos por cada 100.000 niños<sup>8</sup>, lo cual es similar a lo referido en el resto de Europa. La incidencia durante la infancia presenta un pico durante el primer año de vida<sup>8</sup>. El tratamiento principal de la epilepsia se basa en los FAEs, pero se calcula que entre el 8 y el 33% de los pacientes presenta una epilepsia resistente al tratamiento farmacológico<sup>7</sup>.

Algunas condiciones aumentan el riesgo de padecer una epilepsia farmacorresistente: el padecimiento de varios tipos de crisis o de un estatus epiléptico, así



como la persistencia de anomalías del EEG o la presencia de lesiones cerebrales subyacentes son las que más riesgo implican<sup>9</sup>. Se debe tener en cuenta además que la respuesta a los FAEs es dinámica, de modo que en ocasiones se produce refractariedad desde el inicio del tratamiento, y en otros casos tiene lugar una adecuada respuesta inicial con posterior evolución a farmacorresistencia<sup>10</sup>. En el 57% de niños con epilepsia refractaria se consigue la remisión probando con otros FAEs. Sin embargo, en un 68% esa respuesta es transitoria<sup>11</sup>. En general, la probabilidad de quedar libre de crisis va disminuyendo a medida que aumenta el número de FAEs que no logran la mejoría de las crisis (figura 1)<sup>12</sup>.

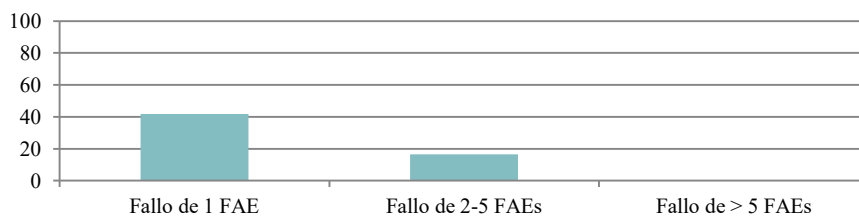


Figura 1. Probabilidad de quedar libre de crisis con el siguiente fármaco antiepiléptico (FAE) en función del número de fármacos empleados previamente. Tomado de referencia 12.

Para el tratamiento de los pacientes con epilepsia refractaria se pueden emplear esquemas de politerapia racional, cirugía de la epilepsia o neuroestimulación en casos seleccionados. Sin embargo, los pacientes en ocasiones no son candidatos a estos tratamientos, o presentan refractariedad o efectos secundarios no tolerables con la politerapia farmacológica. En estos casos, las TDC constituyen una alternativa terapéutica.

#### 4.1.2 FISIOPATOLOGÍA DE LA EPILEPSIA

El cerebro humano es un órgano tremendamente complejo cuyo correcto funcionamiento depende de un adecuado equilibrio entre excitación e inhibición. Los potenciales de acción y de reposo de las neuronas se generan mediante corrientes y canales iónicos. Estos canales se diferencian unos de otros por los iones que los atraviesan y por los mecanismos por los que funcionan (dependientes de voltaje, ligados a receptores, asociados a proteínas G o activados por segundos mensajeros). El potencial de reposo de la membrana neuronal se mantiene gracias a la bomba sodio-potasio ATPasa, que al hidrolizar una molécula de ATP (adenosín trifosfato) a ADP (adenosín difosfato) y fosfato inorgánico, moviliza 3 iones de sodio al exterior celular al tiempo que introduce 2 iones de potasio, permitiendo así que el interior neuronal quede cargado negativamente con respecto al exterior. Los potenciales de acción neuronal se generan por la apertura de canales que permiten la entrada de iones con carga positiva (sodio) a favor del gradiente de concentración. La despolarización abre los canales que permiten la salida de iones con carga positiva (potasio), la repolarización, el cierre de los canales de sodio y la hiperpolarización. Cuando el potencial de acción llega a la zona terminal del axón, las vesículas que contienen los neurotransmisores se fusionan con la membrana, permitiendo la liberación de los mismos al espacio sináptico donde se unen a sus receptores localizados en la neurona postsináptica. Además, la sinapsis se mantiene estable por moléculas de adhesión celular que interrelacionan los espacios pre y postsináptico.

De forma simple, los neurotransmisores pueden tener capacidad excitatoria o inhibitoria. Entre los neurotransmisores excitadores el glutamato es uno de los más importantes (figura 2), así como el ácido gammaaminobutírico (GABA) es el más destacado de los inhibidores (figura 3). Cuando se unen a sus receptores desencadenan la

apertura o cierre de canales de intercambio iónico, produciendo la despolarización neuronal con corrientes de entrada de sodio y calcio, o repolarización con corrientes de entrada de cloro o de salida de potasio. El glutamato tiene dos tipos de receptores, los inotrópicos y los metabotrópicos. Los receptores inotrópicos de glutamato son, a su vez de tres tipos: la familia de los N-metil-D-aspartato (NMDA), los de ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y los de kainato. Al unirse al neurotransmisor sufren un cambio conformacional y permiten el paso de calcio o sodio a través de un poro. Los receptores metabotrópicos no son permeables a iones sino que regulan la transmisión sináptica actuando a través de proteínas intermediarias a las que están ligados. Los receptores metabotrópicos pertenecen a tres familias: mGluRI (incluyen los receptores mGluR1 y 5), II (mGluR2, 3 y 8) y III (mGluR4, 6 y 7)<sup>13,14</sup>. El GABA tiene también varios receptores. El receptor GABA-A es un receptor inotrópico y es responsable de la inhibición rápida, abriendo un canal de cloro que permite su entrada a la célula. El receptor GABA-B es un receptor metabotrópico unido a proteína G que permite la apertura de canales de potasio y el cierre de canales de calcio y actúa a través de segundos mensajeros. El receptor GABA-C es similar al A, ya que se trata de un receptor asociado a un canal activado por ligando que permite el paso de cloro<sup>15</sup>.

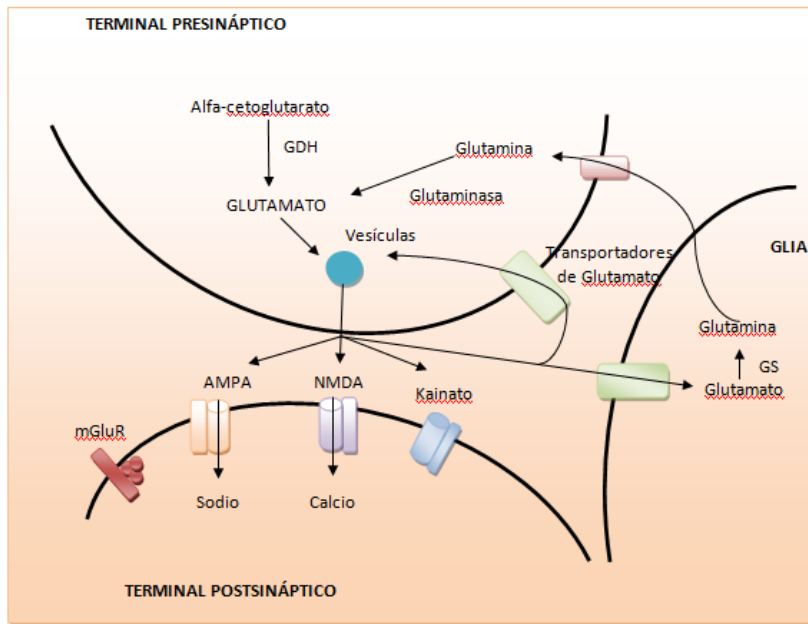


Figura 2. Esquema del metabolismo y los receptores del glutamato. Adaptación propia con modificaciones de referencias 13 y 14.

AMPA: ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico. GDH: glutamato deshidrogenasa. GS: glutamina sintetasa. mGluR: receptor metabotrópico de glutamato. NMDA: N-metil-D-aspartato.

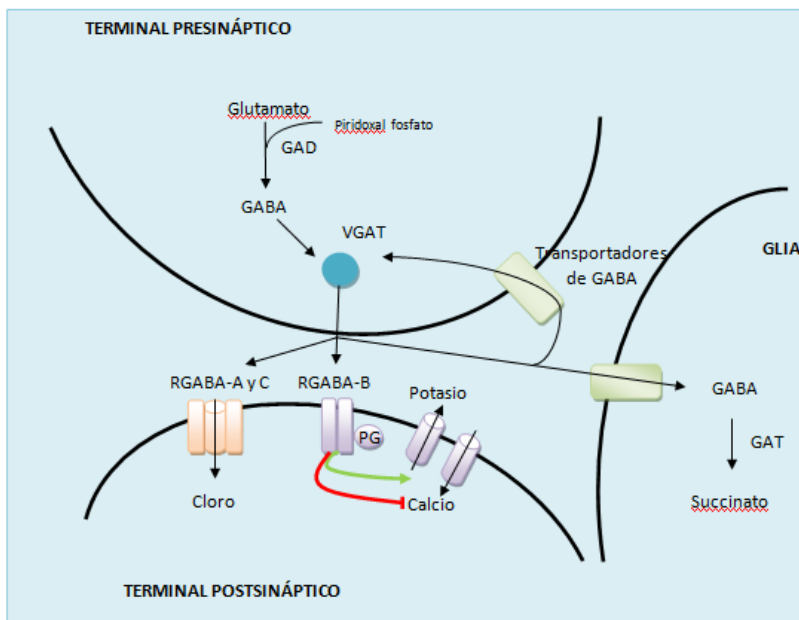


Figura 3. Esquema del metabolismo y los receptores de GABA. Adaptación propia con modificaciones de referencia 15.

GAD: glutamato decarboxilasa. GAT: glutamato transaminasa. VGAT: vesículas transmisoras que contienen GABA.

Los mecanismos involucrados en la epileptogénesis están relacionados con alteraciones en el metabolismo energético, en la homeostasis iónica, y en los neurotransmisores o sus receptores<sup>16,17</sup>.

Entre los canales iónicos relacionados con la epilepsia destacan los canales de potasio dependientes de voltaje. La alteración de estos canales reduce la hiperpolarización de las neuronas, predisponiéndolas a la hiperexcitabilidad. Existen varios tipos de canales de potasio en el sistema nervioso central (SNC) y mutaciones en algunos de ellos se han relacionado con epilepsia. Un ejemplo son los canales KCNQ (canales de potasio dependientes de voltaje subfamilia Q) relacionados con epilepsia neonatal, los KCNT1 (canal de potasio dependiente de sodio subfamilia T miembro 1) relacionados con encefalopatía epiléptica precoz, y los KCND2 (canal de potasio dependiente de voltaje subfamilia D miembro 2) descritos en epilepsias refractarias del lactante<sup>17-19</sup>. Otro canal de potasio relacionado con enfermedades neurológicas es KCNMA1, un canal de potasio dependiente del calcio de la familia conocida como BK (*big potassium*), que se ha relacionado con una mayor excitabilidad neuronal, ya que su alteración puede conducir a una rápida repolarización y, en consecuencia, a un aumento de los potenciales de acción<sup>20</sup>. En ocasiones, las crisis pueden relacionarse con una regulación anormal del flujo sanguíneo en el hipocampo, como ocurre cuando el canal KCNK6 se sobreexpresa en los astrocitos perivasculares de dicha región<sup>21</sup>. Por otro lado, el canal KCNJ12 (canal de potasio rectificador interno sensible a ATP 12), o Kir 2.2, reduce la excitabilidad de la neurona, acercándola a una situación de hiperpolarización. Los canales Kir juegan un papel importante en varias enfermedades neurológicas<sup>22</sup>. Trabajos previos han demostrado que Kir 2.2 está regulado al alza en la epilepsia, por lo que parece que su sobreexpresión se produce para contrarrestar la hiperexcitabilidad de esta patología<sup>23</sup>.

Las alteraciones en los canales de calcio también se han relacionado con epilepsia. Su activación produce el aumento de calcio intracelular, lo que desencadena la liberación de neurotransmisores a nivel presináptico y la despolarización a nivel postsináptico. Están regulados por voltaje y por los receptores GABA<sup>17</sup>. Algunas mutaciones en CACNA1A (canal de calcio dependiente de voltaje subunidad alfa 1A) han sido descritas en encefalopatías epilépticas precoces, en CACNA1H (subunidad alfa 1 H) en ausencias y epilepsias generalizadas, y otras alteraciones se han relacionado con crisis en modelos animales<sup>17,19</sup>. CACNA1C es un canal de calcio dependiente de voltaje de tipo L que se expresa en neuronas y astrocitos. Mutaciones en este gen originan diferentes fenotipos epilépticos<sup>24</sup>.

Los canales de sodio dependientes de voltaje producen potenciales de acción cuando tiene lugar la despolarización parcial de la membrana. En situaciones en las que se altera su inactivación, la membrana se mantiene despolarizada, facilitándose las descargas paroxísicas<sup>17</sup>. Estos canales constan de una subunidad alfa y dos beta. Varias mutaciones en estas proteínas han sido relacionadas con epilepsia. Un ejemplo son las alteraciones en SCN1A (canal de sodio dependiente de voltaje subunidad alfa 1), 1B (subunidad beta 1), 2A (subunidad alfa 2) y 9A (subunidad alfa 9) que se han relacionado con el espectro Dravet y síndromes de crisis febriles plus, entre otros fenotipos epilépticos<sup>18</sup>.

Otro mecanismo relacionado con la epileptogénesis consiste en las alteraciones de los neurotransmisores o sus receptores, especialmente de los sistemas gabaérgico y glutamérgico. Se debe tener en cuenta que, durante la infancia, el cerebro inmaduro tiene tendencia a la hiperexcitabilidad debido a la sobreexpresión de receptores glutamatérgicos y a una función inhibitoria menos eficaz que en el cerebro adulto<sup>16</sup>. Como se ha comentado anteriormente, el GABA actúa fundamentalmente como neurotransmisor

inhibidor. Su síntesis se produce por la acción de la enzima glutamild Descarboxilasa (GAD) sobre el ácido glutámico, utilizando como cofactor fosfato de piridoxal. Cuando se une a su receptor GABA-A tiene lugar una inhibición rápida producida por la apertura de un canal de cloro asociado a este receptor, que permite la entrada de cloro y produce la consecuente hiperpolarización de la neurona. Cuando GABA se une a su receptor GABA-B tiene lugar una inhibición lenta por apertura de canales de potasio<sup>17</sup>. Varios tipos de epilepsia se han relacionado con alteraciones en este sistema. Los pacientes con déficit de piridoxina presentan crisis epilépticas debido a la disminución de la síntesis de GABA, y mejoran con el tratamiento con dicho cofactor<sup>17</sup>. Alteraciones en el gen GABRG2 (subunidad gamma 2 del receptor GABA tipo A) se han descrito en casos de síndrome de Dravet, en síndromes de crisis febriles-plus y en el complejo autismo-epilepsia<sup>18</sup>. Otras alteraciones en el receptor de tipo A se han relacionado con crisis de ausencia y el síndrome de Angelman<sup>17</sup>. Algunas alteraciones en el receptor GABA-B se han descrito también en ausencias y en epilepsias mioclónicas<sup>17</sup>.

El sistema glutamatérgico también está implicado en la epileptogénesis. El glutamato es sintetizado a partir de glutamina o del alfa-cetoglutarico. La glutamina se genera a partir de la acción de la glutamina sintetasa sobre el glutamato que ha sido recaptado de la sinapsis por los astrocitos. Estas células gliales liberan la glutamina que es recaptada por las neuronas. La glutamina, una vez en el interior neuronal, se convierte de nuevo en glutamato por acción de la glutaminasa mitocondrial. Para la síntesis de glutamato a partir de alfa-cetoglutarico es necesaria la acción de las enzimas aspártico-transaminasa, glutámico-deshidrogenasa y ornitina-transaminasa<sup>17</sup>. Una vez sintetizado, el glutamato se almacena en vesículas. Cuando se libera en la sinapsis puede unirse a receptores inotrópicos o metabotrópicos. El receptor NMDA es un sistema complejo con varios sitios de unión para diferentes sustancias que permite el paso de sodio y calcio. La

apertura de estos canales sólo tiene lugar cuando la neurona se encuentra parcialmente despolarizada, ya que se encuentra bloqueado por magnesio que debe ser desplazado para su activación<sup>17</sup>. El receptor AMPA está formado por varias subunidades que conforman un canal de sodio similar al de kainato<sup>17</sup>. Varios estudios en animales y humanos han sugerido que alteraciones en este complejo sistema glutamérgico se asocian a epilepsia. La encefalitis de Rasmussen se ha relacionado con la presencia de anticuerpos contra una de las subunidades del receptor AMPA y las ausencias juveniles con alteraciones en las subunidades de kainato. Se ha descrito una mayor expresión de los receptores mGlu2/3 en el hipocampo de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal y en el hipocampo de ratas recién nacidas con estado epiléptico inducido por kainato<sup>25</sup>, así como que un antagonista de dicho receptor reduce la frecuencia de descargas<sup>25</sup>.

Otros neurotransmisores se han relacionado también con epilepsia. Los sistemas noradrenérgico y serotoninérgico parecen tener un papel inhibitorio, mientras que el sistema colinérgico tiene efecto facilitador de la epileptogénesis<sup>17</sup>. Se han descrito alteraciones en el receptor de acetil colina neuronal (CHRN) en pacientes con epilepsia<sup>19</sup>. Además, existen neuropéptidos que actúan en receptores postsinápticos que son más lentamente recaptados e inactivados, por lo que sus efectos son más prolongados. El neuropéptido Y, la somatostatina y la colecistocinina parecen tener efecto protector frente a la epilepsia<sup>17</sup>. Por otro lado, la orexina y la melatonina, dos sustancias implicadas en los ciclos de sueño-vigilia, también han sido implicadas en la epilepsia. Conviene destacar la interrelación entre las crisis y los trastornos del sueño, ya que la presencia de uno de ellos puede exacerbar el otro<sup>26</sup>. El sistema de la orexina se encuentra muy activo en vigilia y se reduce durante el sueño. Existen evidencias de que los antagonistas de los receptores de orexina (HCTR) pueden reducir las convulsiones en modelos animales<sup>27</sup>. La melatonina reduce la excitabilidad en el hipocampo en modelos animales<sup>28</sup>, y la expresión de sus



receptores MT1 y MT2 aumenta en el hipocampo de ratas epilépticas inducidas por pilocarpina durante el estado epiléptico<sup>29</sup>, probablemente para compensar la hiperexcitabilidad. De hecho, existen estudios en pacientes con epilepsia refractaria en los que la melatonina ha demostrado ser un tratamiento seguro y eficaz<sup>30</sup>.

En ocasiones las crisis pueden desencadenarse por alteraciones en las proteínas estructurales de la unión sináptica. La familia de las DLGAP (*disks large-associated proteins* o proteínas asociadas a discos grandes) regula el *turn-over* de los receptores inotrópicos y metabotrópicos de glutamato, puede ralentizar su desactivación y facilitar la excitabilidad neuronal<sup>31</sup>. Varios estudios en modelos animales indican que la delección del cromosoma donde se codifica el gen DOC2A causa convulsiones<sup>32</sup>. Este gen codifica la proteína alfa que contiene un dominio doble similar a C2 (DOC2A) que es sensible al calcio y regula la fusión de las vesículas con la membrana celular. Por otro lado, la monoaminoxidasa A (MAOA) es la enzima de la membrana mitocondrial externa que degrada los neurotransmisores de tipo amina (noradrenalina, serotonina y dopamina). Su inhibición tiene efectos anticonvulsivos<sup>33</sup>. Las protein kinasas (PRK) también juegan un papel en la epilepsia. Una de ellas, la PRKC está involucrada en muchas vías metabólicas, se ha asociado con la epilepsia<sup>34</sup> y su inhibición tiene efectos anticonvulsivos<sup>35</sup>. Las cadherinas son proteínas transmembrana que median en la adhesión celular y tienen un papel importante en la morfología de la sinapsis y el crecimiento axonal. La cadherina 2 también se ha relacionado con la epilepsia<sup>36</sup>. El regulador de crecimiento neuronal 1 (NEGR1), además de realizar la función que indica su nombre, también está involucrado en la adhesión celular y en la regeneración de axones. Su deficiencia en modelos animales aumenta la susceptibilidad a las convulsiones<sup>37</sup>. La proteína NEDD4 (*neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4*) es una enzima ubicada en el citoplasma que ubiquitina proteínas para ser degradadas por el proteasoma. Se sabe que

media la actividad neuronal y la susceptibilidad a las convulsiones a través de la ubiquitinación de la subunidad GluA1 del receptor AMPA<sup>38</sup>. Utilizando un modelo de ratón, cuyo cerebro es selectivamente deficiente en Nedd4-2, se encontró una elevada susceptibilidad a las convulsiones<sup>38</sup>. La contactina 2 es una proteína de la membrana neuronal necesaria para mantener los canales de potasio activados por voltaje en la región yuxtaparanodal. Existen casos en los que mutaciones en el gen CNTN2 que codifica esta proteína desencadenan epilepsia<sup>39</sup>.

### **4.1.3 EPILEPSIA Y ESTRÉS OXIDATIVO**

En condiciones normales, los organismos generan radicales libres, que son moléculas que portan uno o más electrones libres en su orbital externo, lo que los hace muy reactivos y potencialmente tóxicos si sobrepasan la capacidad antioxidante del organismo. En esos casos tiene lugar el estrés oxidativo, en el que esos radicales libres (especialmente los oxigenados, también llamados especies reactivas de oxígeno (ERO)) reaccionan con los ácidos nucleicos, las proteínas, los lípidos o los hidratos de carbono.

Cuando se superan las barreras antioxidantes los radicales libres pueden atacar a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares y lipoproteínas transformándolos en ácidos grasos peroxidados, los cuales sufren un acortamiento de su cadena lateral liberando MDA, de tal manera que la concentración sérica de MDA es proporcional a los ácidos grasos poliinsaturados oxidados y, por lo tanto, un buen indicador de peroxidación lipídica.

En otras ocasiones, los radicales libres atacan a las proteínas, lo que puede desencadenar un cambio conformacional de las mismas que conlleve una alteración funcional.

Existe evidencia entre la asociación entre estrés oxidativo y la epilepsia, tanto en la generación de las crisis como en los mecanismos de farmacorresistencia. Se han descrito alteraciones en enzimas antioxidantes y aumentos en los marcadores de daño oxidativo como el MDA o las proteínas oxidadas<sup>40</sup>.

## **4.2 TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA EPILEPSIA REFRACTARIA**

### **4.2.1 HISTORIA DE LAS TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS**

En el pasado se han empleado remedios dietéticos para el tratamiento de la epilepsia consistentes en el exceso o la limitación de determinadas sustancias. Sin embargo, el precursor de la dieta cetogénica (DC) fue el ayuno, que ya se empleaba desde antiguo para el tratamiento de esta patología, como consta en el *Corpus hippocraticum* e incluso en la Biblia<sup>41</sup>. No obstante, no fue hasta el año 1911 cuando se constató de manera científica el uso del ayuno con fines terapéuticos, siendo empleado por la pareja de médicos Guelpa y Marie en París para el tratamiento de 20 niños y adultos epilépticos que presentaron una mejoría de sus crisis<sup>42</sup>. Fue también a principios del siglo veinte, concretamente en 1921, cuando en Estados Unidos el Dr. Geyelin documentó la mejoría cognitiva que podría producirse con el ayuno<sup>43</sup>.

En los años veinte, los doctores Cobb y Lennox comenzaron a estudiar los efectos de la inanición, documentando que la mejoría de las crisis tenía lugar a partir del segundo o tercer día<sup>41</sup>. Lennox además constató el cambio que tenía lugar en el metabolismo de un individuo sometido a una escasez de carbohidratos, lo cual forzaba al mismo a la utilización de la grasa. En 1921, Woodyatt se percató de que la acetona y el betahidroxibutirato aparecían en sujetos sanos que eran sometidos a ayuno o a dietas ricas en grasas y pobres en hidratos de carbono<sup>44</sup>. Al mismo tiempo, el Dr. Wilder de la Clínica Mayo postuló que los beneficios del ayuno podrían obtenerse si se lograra un estado de cetonemia por otros medios. Fue entonces cuando acuñó el término “dieta cetogénica” y la propuso para el tratamiento de pacientes epilépticos, sugiriendo que sus efectos serían similares a los del ayuno con la ventaja de poder mantenerlos durante periodos de tiempo

más prolongados<sup>45</sup>. Peterman, de la misma clínica, publicaría en 1925 cómo llevar a cabo el cálculo de esta dieta e insistiría en la necesidad de entrenar a los cuidadores en el uso de la misma y en la necesidad de individualizar cada caso y de un seguimiento estrecho de cada paciente<sup>46</sup>. La dieta que planteaba era muy similar a la conocida actualmente como dieta cetogénica clásica (DCC).

Las décadas de los años 20 y 30 fueron una época de esplendor para la DC, siendo empleada en multitud de pacientes. Sin embargo, con el descubrimiento de nuevos FAEs, se vio relegada posteriormente, empleándose solo en casos aislados, lo que condicionaba que cada vez menos profesionales fuesen expertos en su manejo y se percibiera de forma errónea que la DC no era eficaz.

Con el fin de aumentar la capacidad cetógena de la dieta, en 1971 el Dr. Huttenlocher planteó la suplementación de la dieta con triglicéridos de cadena media (TCM), surgiendo así la dieta cetogénica con triglicéridos de cadena media (DC-TCM)<sup>47</sup>. Unos años más tarde, en 1989 se planteó la reducción de los TCM del 60% al 30% con el objetivo de hacer la dieta más palatable. Esta sería la llamada DC-TCM modificada (o “dieta John Radcliffe” por tener su origen en este hospital de Oxford)<sup>48</sup>.

La decadencia de la DC fue evidente en las siguientes décadas hasta que la difusión en los medios de comunicación estadounidenses de la historia de un niño de 2 años llamado Charlie, hijo de un importante productor y director de cine, que padecía epilepsia intratable, dio paso a la nueva era de la DC. El padre de Charlie había encontrado una guía para padres de niños con epilepsia escrita por el Dr. Freeman del Hospital Johns Hopkins de Baltimor. Este médico y la dietista Millicent Kelly comenzaron a tratar a Charlie con aquella dieta que años atrás se había mostrado tan eficaz y que era tan denostada entonces. Tras el inicio de la dieta, las crisis epilépticas

desaparecieron. Crearon posteriormente la Fundación Charlie, que difunde información tanto para familiares como para profesionales. En Europa se creó una asociación similar denominada Matthew's Friends.

En los últimos años la DC ha experimentado un resurgimiento muy importante y las publicaciones sobre esta terapia han aumentado exponencialmente, tanto para el tratamiento de la epilepsia como para otro tipo de patologías como obesidad, cáncer o Alzheimer, entre otras. A pesar de haber demostrado su eficacia en la epilepsia refractaria, aun sigue siendo una opción terapéutica tardía en muchos niños epilépticos.

#### 4.2.2 DEFINICIÓN Y TIPOS DE TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS

La DC consiste en una dieta rica en grasas, adecuada en proteínas y baja en hidratos de carbono, diseñada para remedar los efectos del ayuno<sup>45</sup>. Las diferentes dietas cetogénicas que se han ido desarrollando se basan en el análisis de la capacidad cetogénica que poseen los distintos principios inmediatos<sup>44,45</sup>. El potencial cetogénico (K) y anticetogénico (KA) se define mediante la siguiente fórmula:

$$K/KA = (0,9G + 0,42P) / (C+0,1G + 0,58P)$$

donde G, P y C corresponden a los gramos de grasas, proteínas y carbohidratos aportados en la dieta. Esta fórmula se basa en que 100 gramos de hidratos de carbono aportan 100 gramos de glucosa, 100 gramos de proteína aportan 42 gramos de ácidos grasos y 58 gramos de glucosa, y 100 gramos de grasas aportan 90 gramos de ácidos grasos y 10 gramos de glucosa.

Existen varios tipos de DC (tabla 1). La **dieta cetogénica clásica** (DCC) aporta un 87-90% de las calorías en forma de grasas y presenta una ratio cetogénica entre 3:1 y 4:1

(es decir, aporta 3 o 4 gramos de grasa por cada gramo conjunto de proteínas y carbohidratos). La mayoría de la grasa aportada son triglicéridos de cadena larga (TCL)<sup>49</sup>. En 1971, Huttenlocher y colaboradores diseñaron la **dieta cetogénica con triglicéridos de cadena media** (DC-TCM)<sup>50</sup>. Se trata de una dieta también muy rica en grasas, pero en la que el aporte de lípidos es mayoritariamente en forma de TCM, cuya absorción y metabolismo son más eficientes, lográndose cetosis adecuadas a pesar de reducir ligeramente el aporte global de grasas de la dieta e incrementar la cantidad ingerida de los otros principios inmediatos. Concretamente, aporta un 71% de la ingesta calórica total como grasa, siendo 11% grasa natural de los alimentos y 60% TCM. De esta forma, su ratio cetogénica es más baja (1,2:1), y su palatabilidad y aceptación suelen ser mejores. Sin embargo, suele asociarse a efectos adversos digestivos con mucha frecuencia que limitan su aplicación. En ocasiones se pueden combinar la DCC con la DC-TCM o se puede realizar una **DC-TCM modificada** que permite un mayor contenido de grasas naturales (41%).

Con el objetivo de mejorar el cumplimiento y la aceptación de unas dietas tan restrictivas se crearon nuevas variantes más permisivas. Así, la **dieta de Atkins modificada** (DAM) permite una ingesta libre de lípidos y proteínas, y solo restringe la cantidad diaria de carbohidratos a 10 gramos al día. Esta dieta fue probada por primera vez en el hospital John Hopkins con buenos resultados, por lo que se ha extendido su uso ya que su tolerancia y aceptación es mejor<sup>51</sup>.

Por último, la **dieta de bajo índice glucémico** (DBIG)<sup>52</sup> es también rica en grasas pero permite una ingesta libre de carbohidratos siempre que estos presenten un índice glucémico (IG) menor de 50. El IG es una medida de la velocidad con que un alimento

produce aumento de la glucemia comparado con la glucosa, cuyo IG es 100. Al ingerir alimentos de bajo IG no se produce cetosis, pero se mantienen glucemias estables.

Tabla 1. Comparación de los tipos de terapias dietéticas cetogénicas. Tomado de la referencia 53.

TIPO DE TDC	Ratio Cetogénica	Grasa alimentos*	TCM*	Proteínas*	Hidratos de carbono*
<b>DCC 4:1</b>	4:1	90	-	10	
<b>DCC 3:1</b>	3:1	87	-	13	
<b>DC-TCM</b>	1,2:1	11	60	10	19
<b>DC-TCM modificada</b>	1,2:1	41	30	10	19
<b>DAM</b>	1:1	60-70	-	20-30	6
<b>DBIG</b>	-	35-40	-	15-20	IG<50

\*Se expresa el porcentaje del valor calórico total de la dieta. DAM: dieta de Atkins modificada. DBIG: dieta de bajo índice glucémico. DCC: dieta cetogénica clásica. DC-TCM: dieta cetogénica con triglicéridos de cadena media. TCM: triglicéridos de cadena media.

### 4.2.3 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS

Las TDC han demostrado tener efectos anticonvulsivantes y neuroprotectores. Sin embargo, tras un siglo de TDC, su mecanismo de acción continúa siendo un tema en estudio. El efecto más investigado de la DC es la producción de cuerpos cetónicos, pero se desconoce si son éstos en sí mismos, o las modificaciones que éstos producen sobre el metabolismo cerebral, los responsables de su efecto. Además, algunos pacientes no alcanzan cetosis, o siguen dietas que no producen cuerpos cetónicos, pero consiguen los beneficios de la dieta. Existen estudios en los que no existe un correlato fuerte entre el control de las crisis y los niveles de cuerpos cetónicos en sangre y orina. Esto hace



sospechar que los cuerpos cetónicos no son el mecanismo de acción exclusivo de la dieta. Además, las crisis epilépticas estimulan la producción de radicales libres y la disfunción mitocondrial. Probablemente las TDC actúen también a este nivel, y a través de otras vías que producen cambios a nivel metabólico o incluso de transcriptómica (figura 4).

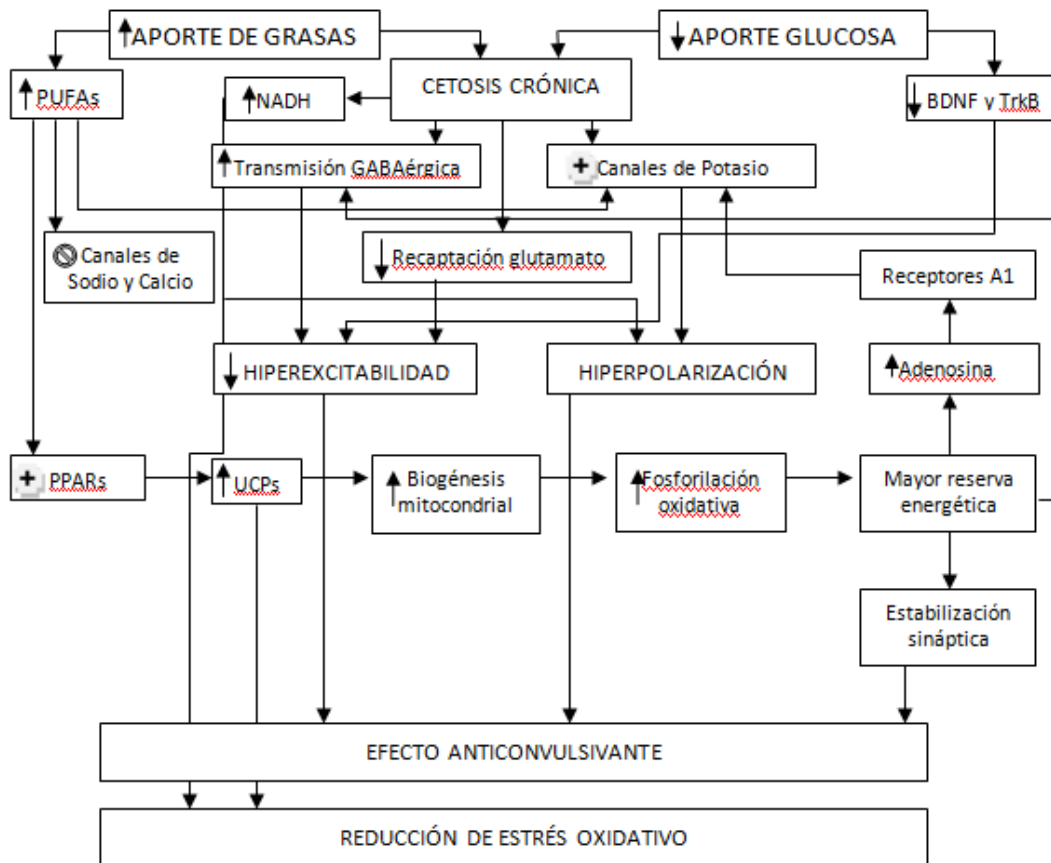


Figura 4. Resumen de los mecanismos de acción de las terapias dietéticas cetogénicas. Modificado de referencia 54.

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro. NADH: nicotinamida adenina dinucleótico en forma reducida. PPAR: receptores activados por proliferadores de peroxisomas. PUFAs: ácidos grasos poliinsaturados. TrkB: receptor de neurotrofinas (receptor de BDNF). UCP: proteínas desacoplantes

#### 4.2.3.1 Bioquímica del ayuno y la cetogénesis

La figura 5 resume muy brevemente los procesos de obtención de energía. El cerebro es el más exigente de los órganos, ya que precisa generar grandes cantidades de

ATP para mantener los potenciales de membrana de las neuronas. En condiciones normales sólo utiliza glucosa como fuente energética y no es capaz de almacenar combustible. Por ello, el aporte de glucosa no puede detenerse ni durante periodos breves de tiempo, ya que podría producirse una lesión cerebral irreversible. Sin embargo, en situaciones de ayuno, el cerebro es capaz de adaptarse y utilizar una fuente alternativa de combustible: los cuerpos cetónicos.

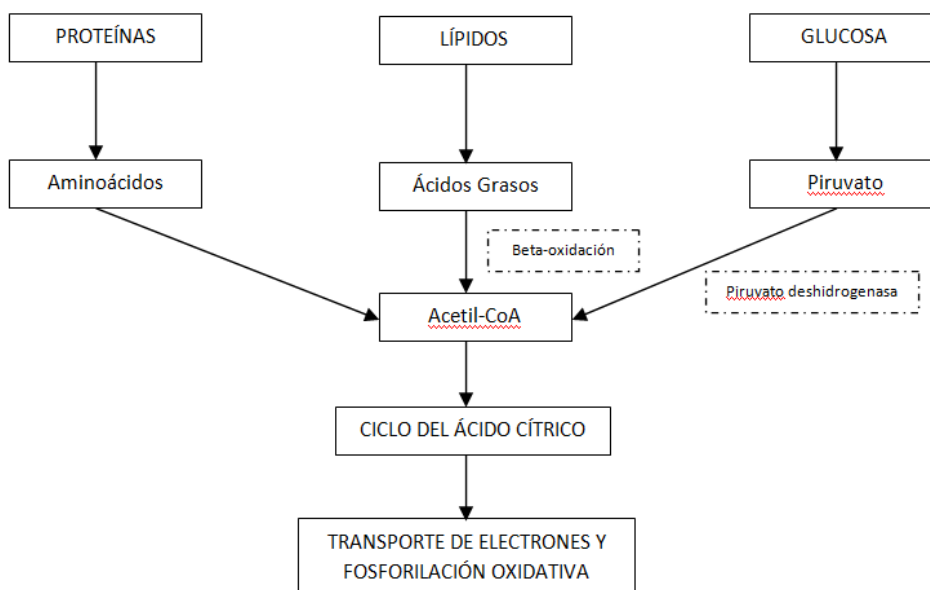


Figura 5. Resumen de los procesos de obtención de energía. Elaboración propia.

Cuando el periodo de ayuno es breve, el hígado moviliza sus reservas de glucógeno convirtiéndolo en glucosa, y el tejido adiposo, mediante la lipólisis, convierte sus triacilgliceroles en ácidos grasos y glicerol, que se transportan a través de la sangre al resto de tejidos. En situaciones de ayuno prolongado el hígado, además, es capaz de sintetizar glucosa a partir de aminoácidos a través de la gluconeogénesis y de producir cuerpos cetónicos. La producción de los cuerpos cetónicos en el hígado tiene lugar por la acumulación de acetil-CoA procedente de la degradación de las grasas y que no puede utilizarse de forma adecuada en el ciclo del ácido cítrico debido a la reducción del

oxaloacetato disponible por el aumento de la gluconeogénesis. El excedente de acetil-CoA se utiliza en la cetogénesis para la producción de cuerpos cetónicos. También tendrá lugar la proteólisis en el músculo esquelético con el fin de dar lugar a aminoácidos que sirvan de precursores para sintetizar glucosa (figura 6).

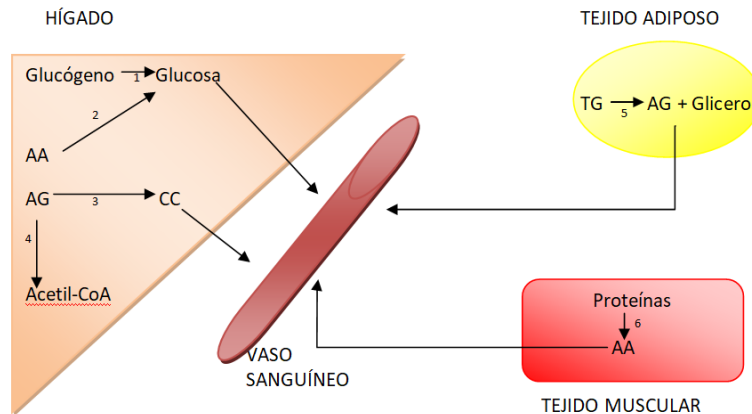


Figura 6. Metabolismo durante el ayuno. Elaboración propia.

1: glucogenolisis. 2: gluconeogénesis. 3: cetogénesis. 4: beta-oxidación. 5: lipólisis. 6: proteólisis. AA: aminoácidos. AG: ácidos grasos. CC: cuerpos cetónicos.

Para llevar a cabo la oxidación de los ácidos grasos éstos deben entrar al interior de la mitocondria. Dado que la membrana mitocondrial interna es impermeable a los ácidos grasos libres, éstos sufren un proceso de activación previo que los convierte en acil-CoA. Las acil-CoA deben desplazarse a la matriz mitocondrial para oxidarse. Para ello atraviesan la membrana mitocondrial externa mediante un transportador. Una vez en el espacio intermembrana, deben convertirse en acilcarnitina para atravesar la membrana interna. Para ello se transfiere la porción acilo a un transportador, la carnitina, mediante una reacción química catalizada por la carnitina acil transferasa I (o carnitina palmitoiltransferasa I) de la membrana mitocondrial externa. El resultado de esta reacción es una molécula de acil-carnitina que es capaz de pasar a través de su proteína transportadora a la matriz mitocondrial. Posteriormente tendrá lugar su conversión a acil-

CoA mediante una reacción inversa catalizada por la carnitina aciltransferasa II (o carnitina palmitoiltransferasa II) que se encuentra en la membrana mitocondrial interna (figura 7). Una vez en el interior de la matriz mitocondrial, las acil-CoA sufren el proceso de la beta-oxidación, que consiste en varios ciclos de deshidrogenación, hidratación, deshidrogenación y fragmentación consecutivos, que liberan en cada uno de ellos acetil-CoA y una acil-CoA dos carbonos más corta. El acetil-CoA tiene dos destinos metabólicos principales: su oxidación en el ciclo del ácido cítrico (o ciclo de Krebs) y la biosíntesis de ácidos grasos. Sin embargo, cuando se acumula y supera la capacidad para cumplir estas dos funciones, se dirige hacia una ruta metabólica alternativa, principalmente a nivel de las mitocondrias hepáticas. Esta ruta es la cetogénesis.

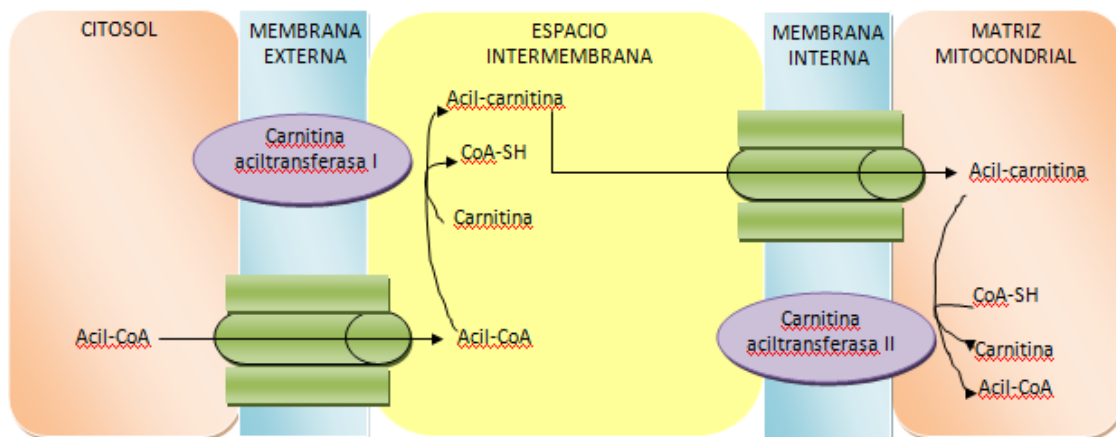


Figura 7. Transporte de acil-CoA al interior mitocondrial. Elaboración propia.

En la cetogénesis, 2 moles de acetil-CoA dan lugar a acetoacetil-CoA, especialmente cuando las concentraciones de oxalacetato son bajas, lo que condiciona un menor flujo a través de la citrato sintasa del ciclo de Krebs. Cuando la acetoacetil-CoA reacciona con otro mol de acetil-CoA a través de la HMG-CoA sintetasa, da lugar a beta-hidroxi-betametilglutaril-CoA (HMG-CoA). Cuando este compuesto se encuentra en el citosol es un intermediario de la síntesis de colesterol. Sin embargo, en la mitocondria se

convierte en el sustrato de la HMG-CoA liasa, dando lugar a acetoacetato y acetil-CoA. El acetoacetato se convierte en betahidroxibutirato a través de una reducción dependiente de NADH. En pequeñas cantidades también puede descarboxilarse espontáneamente a acetona. En conjunto, estos tres compuestos, acetoacetato, betahidroxibutirato y acetona, son los cuerpos cetónicos. Se producen principalmente en el hígado debido a las elevadas concentraciones de HMG-CoA sintasa existentes en el mismo. Los cuerpos cetónicos pueden ser exportados no obstante a otros tejidos, donde el acetoacetato y el betahidroxibutirato pueden convertirse en acetil-CoA para la producción de energía. Esto es lo que tiene lugar en el cerebro sometido a ayuno o a una DC, aprovecha los cuerpos cetónicos para producir acetoacetil-CoA que transforma en acetil-CoA, que oxidará en el ciclo del ácido cítrico para conseguir energía en forma de ATP y mantener así su exigente metabolismo.

#### **4.2.3.2 Los cuerpos cetónicos como mecanismo de acción de la dieta cetogénica**

Los cuerpos cetónicos constituyen un sustrato alternativo a la glucosa y están implicados en la construcción de lípidos y membranas en el cerebro inmaduro. En el cerebro infantil hay mayor número de enzimas relacionadas con el metabolismo de los cuerpos cetónicos y de transportadores de ácido monocarboxílico encargados del transporte de los cuerpos cetónicos que en el cerebro adulto. Por ello, hubo un tiempo en que la DC se empleó fundamentalmente en la infancia, ya que se pensaba que era eficaz principalmente en niños y lactantes, aunque no se ha constatado un efecto edad-dependiente. Sin embargo, se ha demostrado que en situaciones de estrés, el cerebro adulto puede aumentar su capacidad de metabolizar las cetonas y, por tanto, la DC también es eficaz en la madurez<sup>55</sup>.

Existen evidencias a favor de que los cuerpos cetónicos están implicados en el efecto de la DC. Algunos estudios correlacionaron los niveles de cuerpos cetónicos con la reducción de las crisis epilépticas en niños<sup>56,57</sup>, el control de las crisis comienza cuando sus niveles empiezan a elevarse y se puede desencadenar de nuevo la epilepsia al romper la cetosis.

La acetona y el acetoacetato previenen las crisis en algunos modelos animales, y se ha confirmado con técnicas de imagen que sus niveles cerebrales aumentan en pacientes libres de crisis. Ambos pueden activar los canales de potasio K<sub>2p</sub> que conllevan la hiperpolarización neuronal y, por tanto, una mayor resistencia a las descargas. Además, se ha descrito que el acetoacetato disminuye la transmisión excitatoria en hipocampo y la recaptación de glutamato. Sin embargo, es conocida la inestabilidad de esta sustancia, que de forma espontánea se descarboxila a acetona. Por otra parte, la cetosis probablemente incrementa la transmisión GABAérgica, ya que se ha visto una mayor expresión de las enzimas ácido glutámico decarboxilasas (GAD) 65 y 67<sup>54,58</sup>.

En los estados de cetosis se modifica el manejo de los aminoácidos cerebrales. Tiene lugar una adaptación en el metabolismo del glutamato, precursor de GABA (figura 8). El equilibrio de la reacción catalizada por la aspartato aminotransferasa se inclina hacia una reducción de la transaminación de glutamato a aspartato, de modo que una mayor cantidad de glutamato queda disponible para que se descarboxile y forme GABA y glutamina, favoreciendo así el estado inhibitorio<sup>58</sup>. De hecho, se ha observado un aumento de la GAD con la DC. Además, parece que el betahidroxibutirato es capaz de reducir la degradación de GABA, contribuyendo en el mismo sentido<sup>58</sup>.

Además de su efecto antiepiléptico, los cuerpos cetónicos reducen las ERO a través del aumento de NADH y de una menor permeabilidad mitocondrial<sup>54</sup>.

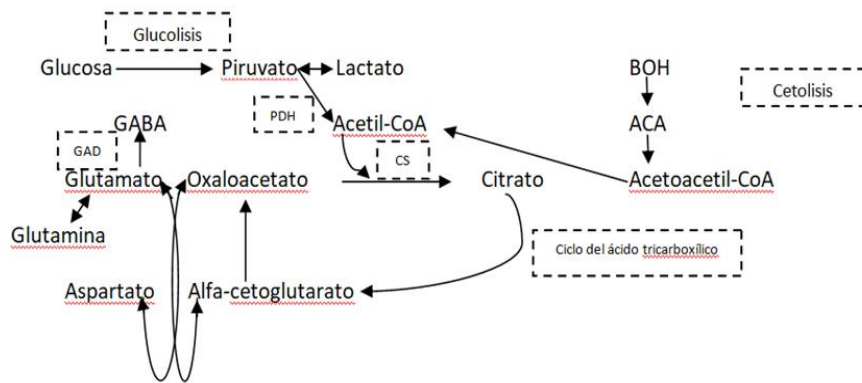


Figura 8. Relación de la cetosis con el metabolismo de GABA y glutamato. Modificado de referencia 58.

ACA: acetoacetato. BOH: betahidroxibutirato. CS: citrato sintetasa. GAD: ácido glutámico decarboxilasa. PDH: piruvato deshidrogenasa.

#### 4.2.3.3 Implicación de la restricción de glucosa en el efecto de la dieta cetogénica

El hecho de que las TDC que no inducen cetosis, como la DBIG, sean eficaces, refuerza la idea de que los cuerpos cetónicos no son los únicos implicados en el efecto de la dieta y que la propia restricción de glucosa puede jugar un papel importante. Huttenlocher demostró que la administración de glucosa intravenosa en niños epilépticos bien controlados con DC-TCM desencadenaba la recaída de las crisis<sup>59</sup>, aunque quizás este efecto se debió a la ruptura de la cetosis.

Se han realizado estudios con el análogo de la glucosa 2-deoxi-D-glucosa. Esta sustancia inhibe la glucólisis por inhibición de la fosfoglucosa isomerasa y ha demostrado ser eficaz contra las crisis en modelos animales<sup>54</sup>. Además, este análogo induce la expresión del factor de transcripción NRSF (factor silenciador neuronal restrictivo) que es un regulador a la baja de genes neuronales. Esto reduciría la expresión de BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) y su receptor TrkB<sup>54</sup>, que promueve la

hiperexcitabilidad. La DC, dado que reduce las reservas de glucosa, podría actuar también por estos mecanismos.

#### **4.2.3.4 Papel de los ácidos grasos en el efecto de la dieta cetogénica**

Los ácidos grasos poliinsaturados o PUFAs están constituidos por una cadena larga de carbonos unida a un grupo carboxilo. La presencia de varios dobles enlaces en sus moléculas les permite una mayor plasticidad, de manera que, al constituir las membranas celulares o mitocondriales, confieren una mejor interacción entre la propia membrana y las proteínas y enzimas que la atraviesan. Se pueden dividir en dos grandes grupos en función de la posición del primer doble enlace a partir del extremo opuesto al ácido carboxílico, esto es, en posición omega ( $\omega$ ). De esta forma pueden clasificarse como  $\omega$ -3 (si se localiza en la posición 3) y  $\omega$ -6 (si se localiza en la 6). Dentro del grupo  $\omega$ -3 destacan el ácido docosahexaenoico (DHA) y el eicosapentanoico (EPA), y entre los  $\omega$ -6 el ácido araquidónico. Son fundamentales para un adecuado desarrollo cerebral, una adecuada mielinización y un buen desarrollo de la sinaptogénesis.

Se ha demostrado, tanto en humanos como en modelos animales, que durante el tratamiento con DC la concentración de PUFAs se eleva en sangre y tejido cerebral. Algunos estudios en roedores han observado un efecto anticonvulsivante, pero otros trabajos no lo han confirmado. La suplementación con PUFAs en humanos ha arrojado datos contradictorios en cuanto a la mejoría de las crisis. Se ha postulado que su efecto anticonvulsivante se produce por un descenso de la excitabilidad neuronal, probablemente a través de la activación de canales de potasio y la inhibición de canales de calcio y sodio<sup>54,58</sup>.



Una acción indirecta de los PUFAs es la disminución de la neurodegeneración y la excitotoxicidad. Estas sustancias son activadores naturales de los receptores de ácidos grasos, especialmente de PPARs (receptores activados por proliferadores de peroxisomas), que cuando se traslocan al núcleo activados, pueden inhibir factores de transcripción proinflamatorios. La DC podría reprogramar el metabolismo celular a través de la regulación de receptores como PPAR-alfa, que induce la expresión de proteínas desacoplantes (UCP) que están implicadas en la regulación de la excitabilidad y la supervivencia neuronales. Las crisis epilépticas aumentan el estrés oxidativo y pueden producir una disfunción mitocondrial. Las UCPs tienen el efecto opuesto, reducen las ERO y mejoran la biogénesis mitocondrial. De hecho, se ha visto que la UCP2 se encuentra sobreexpresada después de la crisis, precisamente para compensar este efecto negativo de la descarga anómala<sup>54,58</sup>.

#### **4.2.3.5 Metabolismo energético y biogénesis mitocondrial**

De Vivo demostró por primera vez en 1978 que la cetosis crónica desencadenada por una dieta rica en grasas durante tres semanas producía en ratas un aumento de la relación ATP/ADP cerebral que probablemente era la causante de la estabilidad neuronal asociada a la cetosis crónica<sup>60</sup>. Más recientemente, Bough empleó técnicas de microscopía electrónica y microarrays para evaluar patrones de expresión génica en el hipocampo de roedores sometidos a DC y compararlos con un grupo control<sup>61</sup>. Cuantificaron una clara regulación al alza de la transcripción de enzimas del metabolismo y proteínas mitocondriales, y los cortes de hipocampo de las ratas sometidas a la dieta eran más resistentes al estrés metabólico inducido por condiciones de restricción de glucosa. Observaron que 384 genes habían sido regulados al alza y 274 a la baja. Más del 70% de los genes que habían modificado su expresión pertenecían a siete categorías:

metabolismo, transducción de señales, crecimiento y desarrollo, biosíntesis, transmisión sináptica, transporte y biosíntesis de proteínas. El grupo que experimentó mayor cambio fue el del metabolismo energético, donde 33 de los 34 genes modificados fueron sobreexpresados, estando 21 de ellos relacionados con la fosforilación oxidativa<sup>61</sup>. Observaron también un aumento de la relación fosfocreatina/creatina y un aumento de los niveles de glutamato y glutamina. Aunque el glutamato es conocido por su papel como neurotransmisor excitador, la mayoría del glutamato cerebral actúa como metabolito energético más que como neurotransmisor.

Esta mejora energética se traduce en una estabilización sináptica y una reducción de las crisis epilépticas a través de varios mecanismos. Por una parte, la neurona puede mantener mejor su gradiente iónico y su potencial de membrana en reposo, lo que le confiere una mayor resistencia a los estímulos despolarizantes. El aumento del ATP cerebral puede potenciar la acción de la sodio-potasio ATPasa. Además, el ATP se degrada a adenosina que puede activar sus receptores A1 acoplados a la apertura de canales de potasio. La mejora del metabolismo energético también contribuye a mantener la actividad inhibitoria GABAérgica y previene el agotamiento de los receptores GABA-A. La gliceraldehído-3fosfato deshidrogenasa (GADPH) se encuentra asociada a este receptor y, al fosforilarlo usando ATP, previene su agotamiento y su deterioro funcional. La DC sobreexpresa la GADPH.

#### **4.2.4 EFICACIA DE LAS TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA EPILEPSIA REFRACTARIA**

Aunque existen muy pocos estudios aleatorizados y controlados, se han publicado múltiples series de casos o incluso cohortes que han permitido evaluar su efectividad e incluso realizar metaanálisis que confirman su eficacia. Sin embargo, estos estudios son difíciles de comparar en muchas ocasiones debido a la diferente metodología, los diferentes protocolos de implantación de la dieta, las distintas dietas empleadas, la edad de los pacientes o incluso la etiología de la epilepsia que en ocasiones puede condicionar el éxito de la dieta.

##### **4.2.4.1 Eficacia global de las TDC**

Una de las primeras revisiones fue llevada a cabo por Lefevre en el año 2000<sup>62</sup>. Encontró en ese momento 11 estudios que evaluaban la DC para el tratamiento de la epilepsia refractaria en niños desde el año 1970, de los cuales 9 eran retrospectivos, ninguno controlado y todos, excepto uno, incluían menos de 60 pacientes. De forma global, el 16% de los niños quedaron libres de crisis, un 32% logró una respuesta excelente (>90% de reducción de crisis con respecto a su estado basal) y un 56% alcanzó un 50% de mejora. Este estudio incluyó los datos de Freeman y sus colaboradores<sup>57</sup> que reclutaron a 150 niños de forma consecutiva con edades comprendidas entre los 4 meses y los 16 años (media 5,3 años) y los siguieron durante al menos un año desde el inicio de una DCC. Observaron que al menos la mitad de la cohorte presentó una buena respuesta a la dieta ( $\geq 50\%$  de reducción de crisis) a los 3, 6 y 12 meses, siendo esta respuesta excelente en 20-31%, y quedando libres de crisis el 3-7%. Un estudio multicéntrico en el que también participaba este investigador arrojó resultados similares<sup>56</sup>. Otros estudios colaborativos fueron publicados en todo el mundo. En Latinoamérica estudiaron el efecto

de la dieta en 216 niños, observando que el 56% había logrado una reducción de crisis superior al 75%, y que un 20% había quedado libre de ellas<sup>63</sup>. Otros estudios se hicieron en Europa, como el llevado a cabo por Coppola<sup>64</sup>, que además de niños incluía adultos jóvenes que lograron una buena respuesta en un 37,5 y 26,8% a los 3 y 6 meses del inicio del tratamiento, aunque esa tasa de buena respuesta cayó al año hasta un 8,9%. Unos años más tarde, Kang y sus colaboradores publicaron una serie de 129 niños coreanos tratados también con DCC. Casi la mitad respondieron a la dieta (44,2%), quedando libres de crisis el 27,9%<sup>65</sup>.

En el año 2006, Keene<sup>66</sup> publicó una revisión sistemática sobre el uso de la DC. La población tratada con DC fue de 972 personas y a los 6 meses eran respondedores un 33% y habían quedado libres de crisis el 15,6%. En el mismo año, Henderson y coautores<sup>67</sup> publicaron un metaanálisis que incluía 19 estudios y 1.084 pacientes. Sus datos fueron mejores, observando que a los 6 meses el 60% redujo sus crisis al menos a la mitad, y el 30% las redujo más de un 90%.

No fue hasta el año 2008 cuando Neal y sus colegas llevaron a cabo por primera vez un ensayo clínico randomizado con DCC<sup>68</sup>. Entre los años 2001 y 2006 reclutaron a 145 niños con edades comprendidas entre los 2 y 16 años que sufrían crisis diarias y no habían respondido al menos a dos FAEs. Realizaron dos grupos: el grupo de tratamiento comenzó la dieta desde el principio del estudio, mientras que el grupo control la comenzaba pasados tres meses. En el grupo de pacientes con dieta, el 38% experimentó una reducción de las crisis de al menos un 50%, frente a un 6% de los controles, siendo este resultado claramente significativo, tanto clínica como estadísticamente. Además, un 7% de los niños con dieta lograron una respuesta excelente.

Una vez demostrada la eficacia de la DCC, otras publicaciones se han centrado en constatar que los otros tipos de TDC son tan eficaces como la DCC en el tratamiento de la epilepsia refractaria infantil. Aunque había publicaciones de cohortes de pocos pacientes en los que la DC-TCM había resultado eficaz<sup>50,59</sup>, no fue hasta 2009 cuando, de nuevo Neal y colaboradores, diseñaron por primera vez un estudio aleatorizado que comparaba la DCC con la DC-TCM en niños con epilepsia refractaria<sup>69</sup>. Reclutaron 145 niños, aunque sólo pudieron evaluar los datos de 45 pacientes que comenzaron una DCC y 49 pacientes con una DC-TCM. No encontraron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje medio de crisis a los 3, 6 y 12 meses de iniciar la dieta (66,5% versus 68,9% a los 3 meses; 48,5% versus 67,6% a los 6 meses; 40,8% versus 53,2% a los 12 meses). Tampoco encontraron diferencias significativas entre los grupos en cuanto al número de pacientes que respondía más del 50% o del 90%.

Varios autores de todo el mundo han publicado los beneficios de la DAM para el tratamiento de la epilepsia infantil. Kossoff publicó en el año 2003 una breve comunicación sobre los resultados obtenidos en 6 pacientes de entre 7 y 52 años que habían recibido DAM para el tratamiento de su epilepsia intratable focal y multifocal<sup>70</sup>. Observó que 5 de los 6 pacientes alcanzaron cetosis adecuada y la mitad presentaron una reducción de las crisis y del número de FAEs administrados. Después de estos datos preliminares, el mismo investigador llevó a cabo un estudio prospectivo reclutando a 20 niños de entre 3 y 18 años con epilepsia farmacorresistente que fueron tratados con DAM durante 6 meses<sup>51</sup>. El porcentaje de niños libres de crisis durante el primer, tercer y sexto mes de tratamiento fue de entre el 5 y 15%. Al sexto mes, el 65% había logrado una reducción de crisis superior al 50% y un 35% superior al 90%.

Otras series de pocos casos han sido publicadas en Europa. Un estudio francés retrospectivo comparó 17 niños con epilepsia refractaria tratados con DCC con 10 niños con MAD<sup>71</sup>. A los 3 meses encontraron que la DCC fue más eficaz que la DAM (64% de respondedores frente a un 20%). A los 6 meses, aunque parecía mantenerse esa tendencia (41% versus 20%), los resultados no fueron significativos. Un estudio danés reclutó 15 pacientes pediátricos y objetivó que el 40% fueron respondedores con DAM<sup>72</sup>. Otro estudio también danés comparó la eficacia de la DAM en 33 niños con epilepsia refractaria que fueron reclutados de forma prospectiva, con la eficacia de la DCC en un grupo de 50 niños que habían seguido la dieta anteriormente. A los 3 y 6 meses, el 52% y el 39% de los pacientes con DAM fueron respondedores y, aunque observaron una mejor tasa de respondedores en el grupo de pacientes con DCC, las diferencias no fueron significativas<sup>73</sup>. Datos similares se han reportado en series latinoamericanas<sup>74</sup> y en un ensayo randomizado coreano<sup>75</sup>.

Sharma y su grupo de trabajo diseñaron un ensayo controlado y aleatorizado para corroborar la eficacia de la DAM<sup>76</sup>. Reclutaron 102 niños de entre 2 y 14 años con epilepsia refractaria y los randomizaron en dos grupos, uno de tratamiento con DAM (50 pacientes) y otro grupo de control sin dieta (52 pacientes), y evaluaron los efectos obtenidos a los 3 meses. La frecuencia de crisis fue significativamente menor en el grupo de niños con dieta, y el porcentaje de pacientes con una reducción de crisis superior al 50% y al 90% en comparación con el estado basal también fue significativamente mayor en el grupo de tratamiento (52% versus 11,5%, y 30% versus 7,7%, respectivamente).

Por último, la eficacia de la DBIG también ha sido evaluada. La mayoría de las publicaciones consisten en series de casos o cohortes. Pfeifer y Thiele<sup>52</sup> fueron los primeros en publicar que la mitad de los 20 pacientes que recibieron una DBIG

experimentó una reducción de las crisis superior al 90%. En una revisión retrospectiva de 131 niños se observó una reducción de las crisis mayor al 50% en un 50%, 54%, 64% y 66% a los 3, 6, 9 y 12 meses desde el inicio del tratamiento, respectivamente<sup>77</sup>. En una cohorte de 42 niños sometidos a DBIG se obtuvieron resultados similares, aunque el seguimiento fue a corto plazo<sup>78</sup>. Un estudio coreano evaluó el efecto de la DBIG en 36 pacientes. Después de 3 meses de terapia, 20 pacientes (56%) experimentaron una reducción de al menos un 50% en la frecuencia de las crisis, y ese beneficio se mantuvo en 19 pacientes (53%) durante un año. Dos niños incluso quedaron libres de crisis a los 3 meses y mantuvieron esta buena respuesta al año<sup>79</sup>.

En el año 2018 se publicó un ensayo randomizado que reclutó a 158 niños con epilepsia refractaria que fueron aleatorizados en tres grupos de tratamiento: DCC (n=52), DAM (n=52) y DBIG (n=54). A las 24 semanas del inicio de la dieta, el porcentaje de reducción de crisis en cada grupo fue de 60,3%, 47,9% y 54,7%, respectivamente. Comprobaron que ni la DAM ni la DBIG fueron inferiores a la DCC<sup>80</sup>.

Por tanto, parece demostrado que los cuatro tipos de TDC disponibles en la actualidad son eficaces para el tratamiento de la epilepsia refractaria en la infancia y la adolescencia. Sin embargo, existen condiciones del paciente y la epilepsia que pueden influir en una mejor respuesta a la misma o en la decisión de optar por una u otra dieta.

#### **4.2.4.2 Eficacia de las TDC en etiologías de la epilepsia particularmente respondedoras**

##### **- Síndrome de déficit del transportador cerebral de la glucosa tipo 1.**

Las TDC son la primera línea de tratamiento de los pacientes con SD-GLUT1 y deben iniciarse lo antes posible<sup>81</sup>, ya que suministran un sustrato alternativo a la glucosa que no puede introducirse adecuadamente en el SNC debido a la alteración en su

transportador. Las TDC mejoran tanto las crisis epilépticas como el estado cognitivo y los trastornos del movimiento con los que con frecuencia cursan estos pacientes. La DCC en general es el tipo de dieta más aceptado y empleado en niños con SD-GLUT1<sup>81-85</sup>. Varias revisiones han constatado que después del inicio de la DCC, hasta el 95% de los pacientes presentan buena respuesta, hasta el 60% quedan libres de crisis, y el 80% de los que padecen trastornos del movimiento experimenta mejoría<sup>86-88</sup>.

Sin embargo, dado que el tratamiento debe mantenerse a largo plazo, muchas veces de por vida, otros tipos de TDC se han usado en los últimos años, especialmente en los pacientes adolescentes y adultos. Algunas publicaciones han descrito el uso de la DAM en pacientes con SD-GLUT1<sup>89-92</sup>. Amalou y colaboradores confirmaron la eficacia de la DAM en 10 niños con epilepsia y trastorno del movimiento<sup>93</sup>. Una cohorte más grande, de 39 pacientes, fue publicada por el grupo de Fuji<sup>94</sup>. Treinta y un pacientes siguieron una TDC durante al menos un mes, empleándose la DAM en 17, la DCC en 11 y la DC-TCM en 3. Confirmaron que todas eran igual de eficaces para el manejo de las crisis y los problemas motores.

Por tanto, la elección de la dieta deber ser individualizada<sup>95</sup>, ya que aunque la DCC se considera de primera elección, las tasas de incumplimiento alcanzan hasta un 18%<sup>84,87</sup>.

#### **- Déficit de piruvato deshidrogenasa (PDH).**

Al igual que en el SD-GLUT1, las TDC proporcionan un sustrato energético alternativo en los pacientes con déficit de PDH y han demostrado ser tratamientos seguros y eficaces<sup>96</sup>.



### **- Complejo esclerosis tuberosa.**

El tratamiento de la epilepsia en estos pacientes suele ser similar al de otros pacientes con epilepsias focales, teniendo en cuenta que pueden emplearse fármacos inhibidores de la vía m-Tor, como Everolimus. Sin embargo, la DC se contempla como tercera línea de tratamiento<sup>97</sup> y ha demostrado su eficacia en algunas publicaciones<sup>98,99</sup>, por lo que este síndrome polimalformativo figura en las últimas guías como una causa de epilepsia en la que la DC es particularmente eficaz<sup>95</sup>.

### **- Espasmos infantiles.**

La tasa de respondedores a la DC en niños con espasmos infantiles supera los dos tercios de los pacientes<sup>100</sup>. Parece que una mayor edad de los pacientes al inicio de la dieta y un menor número de FAEs testados antes de su inicio son predictores de mejor respuesta. De hecho, existen estudios que demuestran que la DC es eficaz y presenta menos efectos adversos y posibilidades de recaída que el tratamiento con ACTH<sup>101</sup>. Por ello, debe plantearse la DC en niños con síndrome de West en los que el tratamiento con corticoides y vigabatrina ha fracasado<sup>100</sup>.

### **- Síndromes de Angelman, Doose, FIRES y Dravet.**

Varias publicaciones han demostrado la eficacia de las TDC en diferentes centros en pacientes con síndrome de Angelman<sup>102,103</sup>, Dravet<sup>104,105</sup>, Doose<sup>106,107</sup> y FIRES (síndrome de epilepsia relacionada con infección febril)<sup>108</sup>, por lo que se consideran patologías en las que la DC es especialmente útil.

### **- Alteraciones del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial.**

Aunque algunas enfermedades mitocondriales constituyen una contraindicación para realizar una TDC, el déficit del complejo I responde bien al tratamiento con DC<sup>109</sup>.

#### **4.2.4.3 Otras condiciones que implican una buena respuesta a las TDC**

##### **- Niños menores de 2 años.**

En las primeras publicaciones que evaluaron la eficacia de las TDC en niños se comprobó que podían presentar buena respuesta todos los pacientes independientemente del grupo de edad al que pertenecían<sup>57</sup>. Nordli y colaboradores describieron por primera vez su experiencia con DC en 32 lactantes<sup>110</sup>. El 20% de ellos quedaron libres de crisis y un 35% adicional logró una buena respuesta. Además, se ha confirmado la eficacia de las TDC en el manejo de los espasmos infantiles, que es una de las principales causas de epilepsia en este grupo etario<sup>100,111-113</sup>.

Se debe tener en consideración que el debut de una epilepsia en el primer año de vida se ha asociado con peor pronóstico y mayor mortalidad<sup>114</sup>. Aunque la edad al inicio de las TDC no se ha relacionado con los resultados<sup>115</sup>, el control de las crisis en los lactantes debe alcanzarse lo antes posible con el fin de evitar un deterioro neurológico progresivo y el uso de fármacos potencialmente ineficaces y dañinos.

##### **- Niños portadores de sonda nasogástrica o gastrostomía.**

El hecho de que un paciente epiléptico porte una sonda nasogástrica o transpilórica o una gastrostomía facilita el cumplimiento de la dieta. La palatabilidad de la dieta, especialmente de la DCC, a veces constituye un problema, pero si se cuenta con una vía de alimentación diferente de la oral debe considerarse como una oportunidad ya que la adherencia al tratamiento será del 100%<sup>116,117</sup>.

#### 4.2.5 CONTRAINDICACIONES DE LAS TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS

Dado que las TDC producen una serie de cambios metabólicos que inducen al uso de la grasa y los cuerpos cetónicos como fuente principal de energía, todas las enfermedades en las que el transporte o el uso de estos compuestos se encuentran comprometidos constituyen contraindicaciones para el empleo de estas terapias, al igual que aquellas situaciones clínicas en las que se precise un aporte elevado de carbohidratos<sup>95</sup>. Así, se consideran contraindicaciones absolutas para las TDC las siguientes:

- Trastornos de la cetogénesis
- Trastornos de la cetolisis
- Déficit primario de carnitina
- Déficit de piruvato carboxilasa
- Porfiria
- Trastornos de la beta-oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, que incluyen las deficiencias en carnitina palmitoiltransferasa I y II, del transportador citoplasmático de carnitina y la traslocasa, así como los déficits en las acil-CoA deshidrogenasas de los diferentes ácidos grasos y los defectos en la síntesis o el transporte de riboflavina.

Además, en los lactantes se consideran también contraindicaciones absolutas los cuadros de hiperinsulinismo, insuficiencia hepática, renal o pancreática, cardiopatías y síndrome de QT largo, las glucogenosis (excepto la tipo 2) y los trastornos de la glucogénesis<sup>118</sup>.

## 4.2.6 EFECTOS ADVERSOS DE LAS TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS

Las TDC suponen un cambio metabólico importante y requieren de un proceso de adaptación global del organismo. Una adecuada instauración de la dieta, adaptándose a la tolerancia del paciente, y un cuidadoso seguimiento, disminuyen la probabilidad de aparición de efectos no deseados. Aunque la mayoría de los efectos secundarios son leves y fáciles de manejar, se han descrito complicaciones graves que incluso pueden condicionar la retirada inmediata de la dieta<sup>119</sup>.

### 4.2.6.1 Efectos adversos precoces

Las complicaciones agudas durante el proceso de instauración de las TDC tienen lugar por la necesidad del organismo de sufrir un proceso de adaptación a la cetosis. Se produce una reducción del aporte de glucosa cerebral, el aparato digestivo debe adaptarse a una dieta rica en grasa y se reducen los niveles de insulina que asocia aumento de pérdidas renales de agua e iones.

- **Problemas digestivos.** Son muy frecuentes durante los primeros días o semanas desde el inicio de la dieta. Se han descrito en hasta la mitad de los niños que comienzan con TDC<sup>65,120</sup>, y es más probable que aparezcan en los pacientes con DCC o DC-TCM. Los vómitos y un empeoramiento del reflujo gastroesofágico que suelen presentar los pacientes neurológicos son frecuentes y tienen lugar por un enlentecimiento del vaciamiento gástrico secundario a un mayor contenido graso de la dieta. Las situaciones de hipoglucemia e hipercetonemia también pueden causar vómitos. Generalmente son fáciles de manejar reduciendo la ratio cetogénica e intentando aumentarla muy lentamente. En casos de reflujo se pueden emplear los inhibidores de la bomba de protones. La diarrea también es frecuente y se relaciona con el exceso de grasa. Aunque

existen casos de diarrea grave intratable<sup>121,122</sup>, suele ser transitoria y mejora reduciendo el aporte de grasas o la osmolaridad de las fórmulas comercialmente preparadas, o sustituyendo los TCM por TCL. El estreñimiento ocurre también en bastantes pacientes, sobre todo en aquellos en los que su estado neurológico facilita su desarrollo. Suele ser fácil de manejar aumentando la ingesta de fibra y líquidos, o con fármacos laxantes de uso habitual en pediatría como polietilenglicol. Las dificultades de alimentación y el rechazo de la ingesta son habituales durante los primeros días, en parte debido a la palatabilidad de las TDC, pero también secundario a la cetosis que reduce el apetito<sup>123</sup>.

- **Hipoglucemia e hipercetonemia.** Hasta una cuarta parte de los niños que comienzan con TDC presentan algún episodio de hipoglucemia<sup>120</sup>, aunque la mayoría de las veces suele ser asintomática. El riesgo de hipoglucemia es mayor en los niños pequeños y en los que inician la dieta con un periodo de ayuno previo<sup>120,124</sup>, lo que no es necesario en la mayoría de los pacientes<sup>95</sup>. Los controles de glucemia durante la etapa de instauración de las TDC son imprescindibles. Los cuerpos cetónicos en sangre y/u orina también deben ser monitorizados con el fin de comprobar que la dieta se está realizando correctamente y se está consiguiendo cetosis. También deben determinarse en caso de que existan síntomas que sugieran la presencia de hipercetonemia ( $>5\mu\text{ml/L}$  en sangre o  $>5$  cruces en orina) como son vómitos, letargia, irritabilidad, polipnea, rubor o palidez faciales, somnolencia o taquicardia.

- **Acidosis metabólica.** Tiene lugar por la necesidad del organismo de adaptarse al aumento de cuerpos cetónicos. El uso concomitante de las TDC con algunos FAEs, especialmente zonisamida, topiramato y acetazolamida<sup>125</sup>, puede favorecerla, así como una escasa ingesta de líquidos o infecciones concurrentes. Se ha descrito que el uso de

citrato potásico puede prevenir la acidosis metabólica sin afectar a la eficacia<sup>126</sup>, pero su uso empírico no se ha establecido<sup>95</sup>.

#### 4.2.6.2 Efectos adversos a medio y largo plazo

- **Hiper calciuria, hiperuricemia y litiasis renal.** Las cifras normales de calcio en orina varían según la edad de los pacientes (tabla 2). La hiper calciuria en las TDC tiene lugar por la acidosis producida por el aumento de las cetonas en sangre. Esto reduce la resorción tubular de calcio en orina aumentando su excreción, y favorece la desmineralización ósea para que el fosfato del hueso sirva de tampón del ácido. Además, durante las TDC, el citrato urinario, que en condiciones normales se une al calcio para evitar su cristalización, disminuye debido a la acidosis que induce su absorción renal. Por otra parte, la acidosis conlleva que el pH urinario también sea ácido, lo cual reduce la solubilidad del ácido úrico en la orina. Todos estos factores condicionan un mayor riesgo de cálculos renales, que suelen ser de fosfato u oxalato cálcico y de ácido úrico. La incidencia de litiasis renal oscila en torno al 3% y 7%, según las series<sup>127,128</sup>. El uso de algunos fármacos, como los inhibidores de la anhidrasa carbónica<sup>127,129</sup>, los niños de menor edad<sup>130</sup> o los que siguen un tratamiento muy prolongado<sup>131</sup> presentan un riesgo mayor.

La hiper calciuria suele ser asintomática, pero dado que puede derivar en complicaciones graves como la litiasis renal, es conveniente monitorizar los niveles de calcio/creatinina y calcio/citrato en orina. Para prevenir la aparición de litiasis renal se debe recomendar una ingesta adecuada de líquidos<sup>132,133</sup> y alcalinizar la orina con citrato potásico en casos de hiper calciuria o niveles de calcio/citrato  $>0,33 \text{ mg/mg}^{134}$ .

Tabla 2. Valores normales de la relación calcio/creatinina en orina según la edad. Tomado de referencia 53.

Edad	Calcio/creatinina (mg/mg)
≤6 meses	<0,8
7-12 meses	<0,6
13-24 meses	<0,5
2-4 años	<0,28
>4 años	<0,20

**-Dislipemia y riesgo cardiovascular.** Dado que la mayoría de las TDC conllevan una ingesta diaria de grasa aumentada, parece lógico que aparezcan alteraciones en el perfil lipídico. La dislipemia se ha descrito en hasta el 60% de los pacientes que siguen una DC<sup>65</sup>, y se ha documentado desde las primeras semanas de la dieta, aunque tiende a normalizarse posteriormente<sup>131,135</sup>. Hasta el momento, los datos publicados sobre riesgo cardiovascular son contradictorios. Heussinger y colaboradores no observaron un mayor riesgo cardiovascular en pacientes que habían seguido una DC para el tratamiento de SD-GLUT1 durante 10 años<sup>136</sup>. Sin embargo, otros autores comprobaron un aumento de la rigidez de la pared arterial<sup>137</sup>. Generalmente no son necesarios tratamientos farmacológicos para el control de la dislipemia, sino que suele ser suficiente la realización de cambios dietéticos. Además, el empleo de suplementos de omega-3 parece reducir el riesgo cardiovascular<sup>138</sup>.

**- Problemas digestivos.** A medio y largo plazo también pueden surgir las mismas alteraciones gastrointestinales que tienen lugar durante las primeras semanas, esto es, diarrea, estreñimiento, náuseas y vómitos, reflujo gastroesofágico y dificultades de alimentación. Aunque suelen ser leves, con frecuencia condicionan el abandono de la dieta<sup>65</sup>. Otros problemas digestivos menos frecuentes son la pancreatitis y la hipertransaminasemia<sup>65</sup>.

## **4.2.7 REPERCUSIÓN DE LAS TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS SOBRE EL ESTADO NUTRICIONAL Y EL CRECIMIENTO**

### **4.2.7.1 Repercusión en el desarrollo ponderoestatural**

El impacto de las TDC sobre el crecimiento continúa siendo hoy en día un tema de controversia. Los mecanismos teóricos por los que las TDC pueden repercutir sobre el crecimiento son varios. La acidosis crónica inducida por la elevación persistente de los cuerpos cetónicos en sangre juega un papel importante. Por otro lado, en niños tratados con DCC se han observado niveles más bajos del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) que condicionan una menor velocidad de crecimiento<sup>139</sup>. Además, algunos protocolos emplean la restricción calórica, lo que puede desencadenar que parte de las reservas proteicas sean utilizadas como fuente de energía en vez de para el crecimiento. Por ello es importante que, independientemente del tipo de TDC que se utilice, se asegure un adecuado aporte proteico, en general, 1 g/kg/día en niños mayores de un año y 1,5 en lactantes<sup>140</sup>, y un aporte calórico suficiente.

Varios autores han estudiado el efecto de las TDC en diferentes cohortes de niños. Estudios a corto plazo han demostrado que se mantiene un adecuado estado nutricional<sup>141</sup>. Sin embargo, en pacientes con tratamientos prolongados parece existir una repercusión sobre la talla. Vining publicó en el año 2002 los datos retrospectivos de 237 niños que habían recibido DCC<sup>142</sup>. Observó una reducción de los z score de peso en los primeros tres meses de tratamiento. Encontró, además, una reducción leve de la puntuación z de talla a los 6 meses, y esta tendencia fue mayor a medida que se prolongaba la dieta. Observaron que los pacientes de menor edad presentaban mayor repercusión en el crecimiento. En el mismo año, Williams también constató en una cohorte de 21 pacientes



que el crecimiento puede verse alterado a largo plazo<sup>143</sup>. Ambos autores emplearon protocolos clásicos en los que se aplicaba la restricción calórica.

Un año después, Liu y colaboradores llevaron a cabo uno de los pocos estudios prospectivos que se han realizado para evaluar la repercusión de las TDC sobre el crecimiento<sup>144</sup>. Se trató de un estudio no aleatorizado con 30 pacientes que tomaban DCC de ratio 4:1 o DC-TCM. Sólo mantuvieron la dieta 25 niños, en los que observaron que la puntuación z de peso se redujo en ambos grupos de pacientes a los 4 meses, aunque esta reducción sólo fue estadísticamente significativa en el grupo de niños con DCC. En cuanto a la talla, al contrario que en estudios previos, encontraron un incremento significativo, aunque los percentiles de talla para la edad no experimentaron cambios significativos.

Otro estudio retrospectivo fue llevado a cabo por el equipo de Peterson<sup>145</sup>. Recogieron datos de pacientes de entre 1 y 26 años en cuanto a la reducción de crisis, y evaluaron el crecimiento en los menores de 20 años. Al año del inicio del tratamiento sólo lo continuaban 34 sujetos. Constataron en estos pacientes que el z score de talla para la edad se redujo significativamente, siendo este descenso mayor en los pacientes con niveles de cetosis más elevados. Otros estudios han presentado resultados similares<sup>146</sup>.

Sin embargo, un estudio coreano publicado en 2013 comprobó que el efecto de las TDC sobre el crecimiento podía ser reversible<sup>147</sup>. Retrospectivamente, recogieron los datos de 40 niños que habían seguido una DCC ratio 4:1 durante dos años. Analizaron el crecimiento durante la terapia y un año después de suspenderla. Observaron que la dieta afectaba especialmente al crecimiento de niños de menor edad o con epilepsia grave, y que tras la retirada se alcanzaba una recuperación significativa tanto del peso como de la talla.

En los últimos años, las publicaciones sobre el efecto de las TDC sobre el crecimiento han seguido incrementándose. Varias series de casos analizadas tanto de forma prospectiva como retrospectiva han sido publicadas, como la italiana de Ferraris<sup>148</sup> o la argentina de Armeno<sup>149</sup>. El estudio retrospectivo italiano encontró que el 20% de los 34 niños que evaluaron presentaba retraso de crecimiento a los 12 meses. El grupo argentino realizó un análisis prospectivo de 45 niños y encontró que el 9% experimentó una desaceleración del crecimiento. Un estudio retrospectivo austriaco en 50 niños que habían seguido la dieta durante al menos 6 meses reportó cifras aún más bajas, revelando que sólo un 6% presentó retraso del crecimiento<sup>150</sup>.

La repercusión antropométrica de otros tipos de TDC no clásicas ha sido menos estudiada. En el año 2015, Lambrechts y colaboradores publicaron un estudio prospectivo llevado a cabo en niños tratados con DC-TCM<sup>151</sup>. La desaceleración del crecimiento tuvo lugar en el 30% de los pacientes y la reducción de peso en el 15%. El efecto de la DAM fue evaluado en 38 niños suecos con epilepsia intratable, SD-GLUT1 o deficiencia de PDH<sup>152</sup>. La puntuación de la desviación estándar de peso y altura se mantuvo estable durante 24 meses, mientras que la mediana del IMC aumentó. No observaron efectos a nivel de la masa ósea ni la masa grasa.

Otros estudios han evaluado el crecimiento en series de pacientes que seguían diferentes tipos de dieta. Wibisono y coautores describieron la experiencia de un centro con 33 niños que había seguido una TDC durante 2 años, ya fuese DCC, DAM o DC-TCM<sup>153</sup>. Observaron que el 70% mantuvo o mejoró su curva de crecimiento.

Parece, por tanto, que las TDC pueden ocasionar problemas de crecimiento en algunos pacientes. Sin embargo, es difícil saber si son las únicas responsables de la desaceleración, ya que la propia epilepsia, la enfermedad subyacente y los tratamientos

farmacológicos administrados podrían jugar un papel importante. Sería útil identificar factores de riesgo de afectación del crecimiento para monitorizar más estrechamente a los pacientes portadores de esos factores.

#### 4.2.7.2 Déficit de vitaminas y micronutrientes

- **Déficit de vitamina D y disminución de masa ósea.** Se ha descrito que un 4% de los niños con epilepsia refractaria tienen déficit de vitamina D antes del establecimiento de la dieta, y más de la mitad pueden tener niveles insuficientes<sup>154</sup>. Además, muchos de los FAEs, especialmente de las primeras generaciones, contribuyen al deterioro de la salud ósea. Siguiendo las recomendaciones internacionales, todos los niños que comienzan con TDC deben recibir suplementos de calcio y vitamina D<sup>95</sup>. Con ello, se han descrito aumento de los niveles de vitamina D a los 3 meses, aunque posteriormente, y a pesar de los suplementos, a medida que se prolonga la dieta, los niveles pueden descender<sup>154</sup>. En el año 2008 Berqvist y sus colegas desarrollaron un estudio piloto para determinar cuáles eran los efectos de las TDC sobre la salud ósea<sup>155</sup>. Reclutaron a 48 niños de entre 1 y 14 años con epilepsia refractaria que fueron tratados con DCC ratio 4:1. En 25 de ellos se pudo realizar una absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA). Un 63% y un 54% de estos niños presentaban una ingesta basal insuficiente de calcio y vitamina D, respectivamente. Un 73% tenía niveles séricos de vitamina D basales subóptimos. Tras el inicio de la DCC, a los 3, 6, 12 y 24 meses, tanto el contenido mineral óseo global como el de la columna lumbar fueron reduciéndose. Observaron, además, que eran predictores de mayor afectación una menor edad al inicio de la dieta y la ausencia de deambulación, y que la reducción de la mineralización ósea se mantenía a pesar de la suplementación con calcio y vitamina D y la reducción del número

de FAEs. Probablemente la acidosis crónica y los niveles bajos de IGF-1 estén implicados en la desmineralización ósea.

Otras series han reportado osteopenia en hasta el 14,7% de los niños que siguen la dieta<sup>65</sup>. A largo plazo, la osteopenia puede desencadenar la aparición de fracturas. De 28 niños que siguieron la dieta durante 6-12 años, un 21% presentó fracturas óseas, la mediana de tiempo desde el inicio de la dieta hasta la aparición de la fractura fue de un año y medio, y un 14% sufrió más de una fractura<sup>131</sup>.

- **Déficit de carnitina.** El mantenimiento de unas reservas óptimas de carnitina es importante para un uso adecuado de los ácidos grasos en pacientes con TDC. La deficiencia de carnitina se ha descrito desde las primeras cuatro semanas de tratamiento<sup>65</sup>. Puede ocurrir en hasta el 20-25% de los pacientes<sup>156,157</sup> y tiende a mejorar de forma espontánea<sup>156</sup>. Es más probable que tenga lugar en pacientes tratados con varios FAEs simultáneamente<sup>156-158</sup>, especialmente si uno de ellos es ácido valproico<sup>157</sup>. Generalmente es asintomática, aunque puede cursar con debilidad muscular y fatiga y, en muy raras ocasiones, con hepatopatía o cardiopatía.

Los niveles plasmáticos de carnitina no son un fiel reflejo de los depósitos reales de carnitina, ya que esta amina cuaternaria se encuentra almacenada principalmente en el músculo. La determinación sanguínea más representativa de estos depósitos es la carnitina libre. La relación acil-carnitina/carnitina libre tampoco es útil, ya que puede incrementarse durante las TDC debido al aumento del metabolismo de las grasas y la cetosis<sup>159</sup>.

La suplementación sistemática con carnitina no es recomendable y las últimas guías la aconsejan en caso de niveles bajos en sangre<sup>95</sup>. No obstante, en aquellos pacientes en los que no pueda determinarse el nivel plasmático de carnitina y presenten

factores de riesgo de hipocarnitinemia, como tratamiento con politerapia o con valproato, niños pequeños o con desnutrición, o tratamientos muy prolongados con TDC, debe plantearse el uso profiláctico de carnitina<sup>123</sup>. Los suplementos deben ser de L-carnitina y deben iniciarse a dosis bajas e incrementarse de forma gradual, ya que dosis altas iniciales pueden ocasionar diarrea, malabsorción o incremento de las crisis<sup>159</sup>.

- **Déficit de vitaminas A y E.** Un estudio llevado a cabo en Reino Unido con 91 niños de entre 2 y 16 años tratados con DCC o DC-TCM constató que los niveles de estas vitaminas no son deficitarios en ambas TDC. La DCC redujo ligeramente los niveles de vitamina A a lo largo del tiempo, mientras que en los niños con DC-TCM se incrementaron. La vitamina E se elevó más en los niños con DCC a lo largo del tratamiento<sup>160</sup>.

- **Déficit de zinc.** Los niveles de zinc pueden incrementarse en los primeros meses y pueden disminuir en tratamientos prolongados. Sin embargo, no parece que las TDC influyan claramente sobre los niveles plasmáticos ya que se han observado niveles bajos antes de su inicio. Probablemente se deban a una ingesta insuficiente incluso antes del inicio de la dieta. No obstante, la monitorización del zinc es importante ya que juega un papel relevante en la división celular y el crecimiento, que puede verse afectado en niños con TDC<sup>160</sup>.

- **Déficit de selenio.** Se han demostrados descensos significativos de los niveles plasmáticos de selenio, especialmente a partir del año de tratamiento<sup>160</sup>. Un estudio más reciente analizó los niveles de selenio en 110 niños que habían seguido una DCC durante al menos 12 meses<sup>161</sup>. Los niveles plasmáticos se redujeron de forma significativa a los 6 y 12 meses de tratamiento, y un 49% de los pacientes fue diagnosticado de deficiencia de selenio (definida por niveles sanguíneos  $<48 \mu\text{g/L}$ ). Otros trabajos han reportado una

menor incidencia de déficit de selenio, en torno al 20% de pacientes con dieta<sup>162</sup>. Aunque generalmente no se describen síntomas clínicos asociados a la deficiencia de selenio<sup>161</sup>, otros estudios han establecido una relación entre los niveles bajos de este micronutriente y efectos cardiológicos<sup>162-164</sup>. Se han descrito casos de cardiomiopatía en niños con niveles de selenio en sangre indetectables<sup>162</sup>, en ocasiones asociadas a taquicardia ventricular<sup>163</sup> e incluso con muerte súbita con intervalo QT prolongado<sup>164</sup>. En casos con deficiencia de este micronutriente es recomendable la evaluación cardiológica completa, que incluya electrocardiograma y ecocardiograma, aunque en pacientes asintomáticos suele ser normal<sup>162</sup>.

- **Hipomagnesemia.** Se ha descrito en un 5% de los niños que siguen una DCC<sup>64</sup>. Los niveles descienden igualmente en pacientes con DC-TCM, especialmente a partir de un año de terapia<sup>160</sup>.

- **Otros déficits nutricionales.** En el año 2008 Zupec-Kania y Zupanc llevaron a cabo una evaluación de la ingesta de 28 micronutrientes en pacientes que seguían una DCC ratio 3:1, 4:1, 2:1 y 1:1 (éstas últimas similares a la DAM), y los compararon con las ingestas diarias recomendadas<sup>165</sup>. En el grupo de pacientes con DCC ratio 4:1, solo ingerían la dosis recomendada de 3 micronutrientes de los 28 evaluados. En el grupo con ratio 1:1 cumplieron los requerimientos con 12 de los 28. Todas las vitaminas del grupo B fueron deficitarias (excepto la B12) en todos los grupos, tanto más cuanto más restrictiva fue la dieta. Los aportes de calcio, fósforo, hierro y cobre también fueron insuficientes en todos los tipos de dieta.

## 4.3 APLICACIÓN DE LA TRANSCRIPTÓMICA Y LA METABOLÓMICA EN EL ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LAS TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS

### 4.3.1 TIPOS DE ARN, TRANSCRIPTÓMICA Y ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA<sup>166,167</sup>

La **transcriptómica** es el estudio del conjunto de los **ácidos ribonucleicos** (ARN) de una célula, tejido u órgano. El ARN es un polímero de nucleótidos fundamental para la expresión génica, ya que se comporta como un intermediario entre la información contenida en el ADN (ácido desoxirribonucleico) del núcleo y la producción de proteínas. El ADN está formado por una cadena de bases (adenina, guanina, timina y citosina), que se emparejan de dos en dos (citosina con guanina y adenina con timina). Igualmente, el ARN se compone de cuatro bases, aunque en vez de timina contiene uracilo. Existen diferentes tipos de ARN. El **ARN mensajero** (ARNm) extrae el código genético del ADN que se encuentra en el interior del núcleo hacia el citoplasma, donde se une a los ribosomas para iniciar la síntesis proteica. En el citoplasma, cada molécula de los **ARN de transferencia** (ARNt) porta un aminoácido de los 20 posibles en función de la secuencia de tres bases que posean. Cada ARNt lleva su aminoácido a los ribosomas, donde se encuentra el ARNm. El ARNm se lee en grupos de tres en tres bases llamados codones, de forma que los ARNt que poseen las tres bases complementarias (llamadas anticodones) se unen al ARNm y transfieren el aminoácido correspondiente a los ribosomas para la formación de proteínas. Los **ARN interferentes** (ARNi) se encargan de la supresión de la expresión de algunos genes, pueden ser de diferentes tamaños, destacando los **micro-ARN** (miARN) (figura 9).

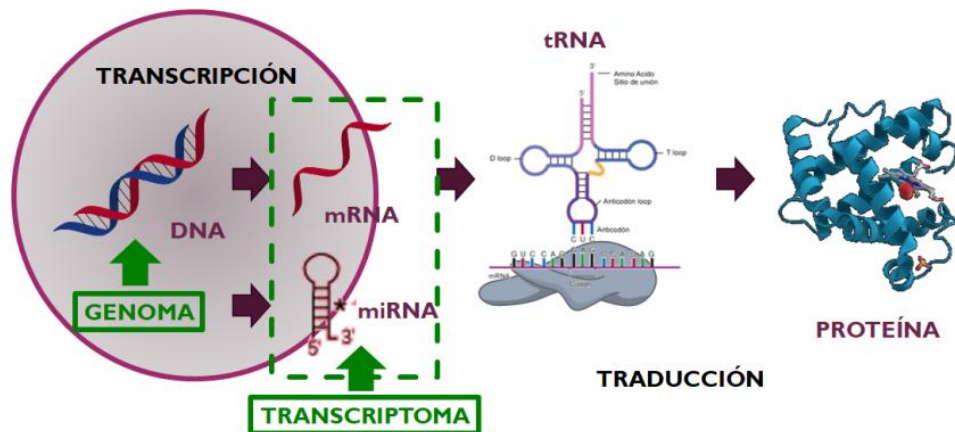


Figura 9. Proceso de transcripción y traducción del ADN. Cedido por Dra. Gloria Olaso.

El análisis de los ARN se puede realizar mediante secuenciación de transcripciones individuales o mediante hibridación a una matriz ordenada de nucleótidos conocidos. Una de las técnicas más empleadas en la actualidad es la de los microarrays.

Los **microarrays** son chips que contienen múltiples moléculas de material genético conocido. Valiéndose de la atracción química natural entre ADN y ARN, mediante la hidridación de las muestras de estudio y su posterior análisis por fluorescencia, pueden determinar la expresión de múltiples genes simultáneamente. Cada placa de microarray contiene múltiples sondas, generalmente de 25 bases cada una.

Cualquier método de análisis del transcriptoma requiere el aislamiento previo del ARN que se quiere analizar. Para ello, la muestra debe ser tratada con reactivos que permitan separar el ARN de otros productos biológicos y mantener la integridad del mismo inhibiendo la ARNasa. Además, se requiere la amplificación de las copias de ARN para lo que se emplean técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por otro lado, las moléculas de ARN deben ser marcadas con biotina. Posteriormente, se coloca la muestra de ARN sobre el chip. Tras varias horas, el ARN que coincida con una



sonda de ADN hibridará y se adherirá a la sonda. Al lavar la matriz, sólo quedarán adheridos los ARN que hayan sido emparejados. Sin embargo, no sólo es útil conocer cuáles ARN se han adherido, sino si solo lo ha hecho una molécula o varias. Para ello, se utilizan fluoróforos que se unen a la biotina con la que se marcó el ARN. Así, si un gen está altamente expresado en la muestra, la ubicación de la sonda donde se ha adherido brillará intensamente. El brillo será más tenue en caso de que el gen se exprese escasamente. Con los microarrays se pueden comparar dos muestras (por ejemplo, dos grupos de pacientes, o el mismo grupo de pacientes antes y después de ser sometidos a un tratamiento). Para compararlas se crean “mapas de calor”, que son gráficos que representan la expresión génica por colores. Este proceso se resume en la figura 10.

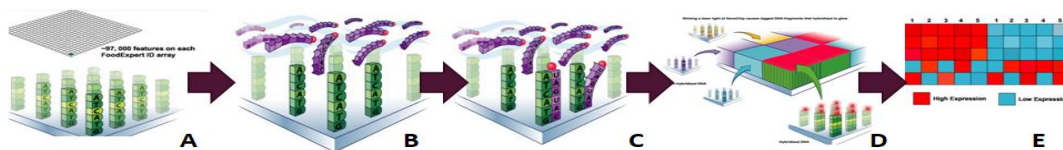


Figura 10. Análisis del transcriptoma mediante microarrays. Tomado de Affymetrix. (2005). GeneChip Microarrays: Student Manual. Retrieved 11 1, 2012, from [http://www.affymetrix.com/about\\_affymetrix/outreach/educator/microarray\\_curricula.aff](http://www.affymetrix.com/about_affymetrix/outreach/educator/microarray_curricula.aff) X.

A. Sondas de ADN. B. La muestra con fragmentos de ARN (morado) se lava sobre la matriz de sondas de ADN (verde). C. Hibridación de las muestras de ARN con las sondas de ADN. D. Tras el lavado, las moléculas fluorescentes unidas al ARN solo se encuentran en las zonas de la matriz donde se ha producido hibridación con el ADN. E. Mapa de calor en el que se representa por colores la intensidad de la expresión génica de dos grupos diferentes de sujetos o en los mismos sujetos antes y después de una intervención.

### 4.3.2 FUNDAMENTOS DE LA METABOLÓMICA

La metabolómica consiste en la medición cuantitativa de la respuesta metabólica multiparamétrica de sistemas vivos a estímulos fisiopatológicos o modificaciones genéticas<sup>168</sup>. Al medir y modelar matemáticamente los cambios en los niveles de productos del metabolismo que se encuentran en los fluidos y tejidos biológicos, la metabolómica ofrece una nueva perspectiva de los efectos de las TDC<sup>168</sup>.

La espectroscopía de resonancia magnética (RMN) de alta resolución de fluidos y tejidos, combinada con metodologías de análisis multivariante, como el Análisis de Componentes Principales (PCA), constituye una poderosa técnica para investigar el metaboloma en medicina<sup>168,169</sup>. La RMN es un método eficaz, robusto y reproducible para obtener perfiles metabólicos en especímenes biológicos sin una preparación extensiva de muestras. La espectroscopia de RMN permite medir el contenido de protones en muestras biológicas complejas de moléculas de pequeño peso molecular. El espectro de <sup>1</sup>H da información del número y tipo de hidrógenos diferentes que hay en la molécula. La posición en el espectro (desplazamiento químico) determina el entorno químico del núcleo y, por tanto, da información de grupos funcionales a los que pertenecen o que están cerca. La forma de la señal da información de los protones cercanos acoplados escalarmente.

## 5. OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo son:

1. **Determinar la eficacia** de las TDC en el control de las crisis epilépticas en la edad pediátrica. Estudiar qué parámetros clínicos, analíticos o epidemiológicos se asocian a mejor respuesta a la dieta.
2. **Evaluar la seguridad** de dichas terapias, tanto a corto como a medio y largo plazo en pacientes pediátricos, evaluando los efectos secundarios y su relación con el tipo de dieta y las características de los pacientes.
3. **Analizar la repercusión de la dieta sobre el estado nutricional** a nivel clínico (variaciones antropométricas) y analítico, tanto a corto como a largo plazo. Establecer qué variables predicen una mayor afectación del crecimiento.
4. **Determinar la repercusión de las TDC sobre los siguientes parámetros**, analizándolos antes y tras el inicio del tratamiento, con el fin de dilucidar posibles mecanismos de acción:
  - a. Marcadores de daño oxidativo en sangre (MDA, proteínas oxidadas).
  - b. Perfil metabolómico en plasma.
  - c. Expresión génica en células mononucleares periféricas.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

Para lograr los objetivos mencionados se llevó a cabo un estudio observacional retrospectivo y prospectivo (desde mayo de 2015). Se recabó información de las historias clínicas de todos los pacientes que habían recibido tratamiento con alguna TDC en el Hospital Infantil Universitario Niño Jesús de Madrid (hasta diciembre de 2018 si presentaban epilepsia refractaria y hasta agosto de 2020 si padecían SD-GLUT1). Este proyecto de investigación fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital Niño Jesús con código interno R-0002/15. Se estudiaron y registraron en una hoja de Excel las siguientes variables cuidando la confidencialidad del paciente:

### 1. Variables clínicas y epidemiológicas:

- a. Datos relacionados con la epilepsia: fecha de diagnóstico, causa de la misma, tipo de crisis, si existen alteraciones del desarrollo psicomotor, tratamientos previos empleados.
- b. Datos relacionados con la valoración del paciente antes del establecimiento de la dieta: número y tipo de crisis diarias, número de FAEs empleados, variables antropométricas, parámetros analíticos en sangre y orina, y encuesta dietética.
- c. Datos de la dieta elegida: fecha de inicio, tipo de dieta, vía de administración, modo y lugar de inicio, si se realiza con restricción calórica o no, fecha y motivo de retirada.

**2. Valoración de la respuesta a la dieta** a los 3, 6 12 y 24 meses, y una vez al año, posteriormente, en los siguientes aspectos:

- a. Reducción del número de crisis. La reducción de las convulsiones se graduó en comparación con el valor inicial de la siguiente manera: 100% (ausencia de convulsiones), 90-100% de mejora, 50-90%, menos de 50%, 0% (sin mejoría) o aumento del número de convulsiones.
- b. Reducción del número de FAEs.

**3. Estudio de la seguridad de la dieta.** Se valoró la presencia o ausencia de efectos secundarios a lo largo del tratamiento, se especificaron cuáles fueron y se clasificaron como precoces (si aparecían en las primeras 4 semanas del inicio del tratamiento) o tardíos.

**4. Estudio de la repercusión sobre el crecimiento.** Se registraron los datos de peso, talla, índice de masa corporal (IMC) y perímetro cefálico (éste en menores de 3 años) antes del inicio de la dieta y a los 3, 6, 12 y 24 meses desde su establecimiento, y anualmente hasta su retirada. Las puntuaciones z de los parámetros antropométricos fueron ajustadas por sexo y edad acorde a los patrones de la OMS. En la tabla 3 se exponen los valores que se consideraron normales y alterados respecto al IMC y la talla en función de la edad. Aunque en menores de 5 años se suele emplear la relación peso/talla en lugar del IMC, se optó por emplear el IMC en todos los pacientes siguiendo las recomendaciones de la OMS<sup>170,171</sup>.

Tabla 3. Evaluación del estado nutricional según la puntuación del z score de talla e IMC en función de la edad. Modificado de la clasificación de la OMS de ICD11 (disponible en <https://icd.who.int/browse11/l-m/en>).

Estado nutricional	Edad ≤5 años	Edad >5 años
Normalidad	Z score IMC ≥-2 y ≤+1 Z score talla ≥-2 y ≤+2	Z score IMC ≥-2 y ≤+2 Z score talla ≥-2 y ≤+2
Desnutrición leve	Z score IMC ≥-3 y <-2	
Desnutrición grave	Z score IMC <-3	
Sobrepeso	Z score IMC >+1 y ≤+2	Z score IMC >+2 y ≤+3
Obesidad	Z score IMC >+2 y ≤+3	Z score IMC >+3
Obesidad grave	Z score IMC >+3	-
Alteración leve del crecimiento	Z score talla ≥-3 y <-2	
Alteración grave del crecimiento	Z score talla <-3	

**5. Estudio de parámetros analíticos.** Se recogieron los datos analíticos de cada paciente previo al inicio de la dieta, y a los 3, 6 y 12 meses, y una vez al año posteriormente. Se analizaron los resultados obtenidos en el hemograma, la coagulación, la bioquímica general, la gasometría, los iones y el sedimento urinario y las relaciones en orina de calcio/creatinina, proteínas/creatinina, y citrato/creatinina. También se midieron de forma cuantitativa los marcadores nutricionales (prealbúmina, proteína transportadora del retinol (RBP de sus siglas en inglés *retinol binding protein*), vitaminas A, E, D, B12, ácido fólico, zinc y selenio), el perfil lipídico (colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL y triglicéridos) y carnitina. La cetosis fue determinada mediante los niveles de betahidroxibutirato en sangre. En todos los pacientes que seguían una TDC se realizaron de forma rutinaria estas determinaciones con el fin de llevar a cabo un adecuado manejo de su tratamiento. Se consideraron normales los siguientes valores: prealbúmina >15 mg/dL (alteración leve 10–15 mg/dL,

moderada 5–10 mg/dL, y grave <5 mg/dL); RBP >2,5 mg/dL (alteración leve 2–2,5 mg/dL, moderada 1,5–2 mg/dL, y grave <1,5 mg/dL); vitamina A 0,2–0,5 mg/L; vitamina E 0,8–10 mg/g de lípidos; 25-hidroxi-vitamina D 20–60 ng/mL; ferritina 7–140 ng/mL; vitamina B12 >250 pg/mL; ácido fólico >3,9 ng/mL; colesterol total ≤200 mg/dL; triglicéridos ≤115 mg/dL; aspartato amino transferasa (AST) y alanino aminotransferasa (ALT) ≤50 IU/L; gamma glutamil transpeptidasa (GGT) ≤35 IU/L; ácido úrico ≤6 mg/dL; relación calcio/creatinina en tabla 2; pH en gasometría venosa >7,3; bicarbonato >20 mMol/L; zinc >70 µg/dL; selenio >70 µg/L; carnitina total 21-64,5 µM/L; L-carnitina >20 µM/L; y magnesio >1,5 mg/dL.

Se estudiaron también en algunos pacientes datos analíticos excepcionales y que no se llevan a cabo de forma rutinaria en niños con TDC. Para ello, los pacientes y sus cuidadores fueron informados de la naturaleza del estudio y firmaron un consentimiento informado. En estos casos se determinaron, antes de iniciar la TDC y a los 6 meses:

a. Marcadores de daño oxidativo:

- i. Valores de MDA en plasma. Su concentración se determinó por el método de HPLC (por sus siglas en inglés, *high performance liquid chromatography*). A 50 µL de muestra se añadieron 75 µL de ácido fosfórico H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,44M y 25 µL de la solución de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA); se agitó y se mantuvo 60 minutos en un baño a 95°C. Posteriormente, se añadieron 150 µL de la solución neutralizante y, seguidamente, se centrifugó a 10.000 g durante 5 minutos a 4°C, y se inyectaron 50 µL del

sobrenadante obtenido en el HPLC. El proceso de cromatografía se realizó a un flujo constante de 1 ml/minuto. La elusión del aducto TBA-MDA<sub>2</sub> se realizó en condiciones isocráticas, siendo la fase móvil una mezcla de fosfato monopotásico KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50Mm pH = 6,8 y acetonitrilo (70:30). El tiempo de retención del aducto TBA-MDA<sub>2</sub> fue aproximadamente de 5 minutos, y el tiempo del cromatograma de 30 minutos. Para la detección del aducto TBA-MDA<sub>2</sub> se utilizó un detector ultravioleta visible a una longitud de onda de 532 nm. Para los cálculos, el área del pico correspondiente al aducto TBA-MDA<sub>2</sub> se valoró frente a una recta patrón construida con MDA-bis. En la construcción de la recta patrón se incluyó un blanco. La recta patrón se hizo a partir de las siguientes soluciones de MDA-bis blanco: 1,5 mM; 6.0 mM; 15 mM y 60 mM.

- ii. Proteínas oxidadas en plasma. Las muestras se analizaron mediante Western Blott utilizando un kit específico para medir las carbonilaciones proteicas (OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit). Se realizó inicialmente una dilución 1/15 del plasma utilizando como diluyente agua Milli-Q. Posteriormente se preparó una recta patrón seriada de diluciones de albúmina de suero bovino (BSA por sus siglas en inglés, *bovine serum albumin*) conocidas, las cuales se procesaron en iguales condiciones que las muestras. Las diluciones preparadas fueron: 10-5-2,5-1-0,5-0,1 mg/ml. Se pipetearon 490 µL de



agua Milli-Q y 10  $\mu\text{L}$  de cada muestra (dilución 1/15) o patrón en un tubo Eppendorf y seguidamente se añadieron 500  $\mu\text{L}$  del reactivo de Lowry, y se incubó cada Eppendorf durante 20 min en la oscuridad. Se añadieron 250  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu y se incubó 30 min en la oscuridad nuevamente, y posteriormente se midió la absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro marca Cecil, modelo CE 3021. Para calcular los resultados, se restaron a todos los valores de absorbancia el valor de la muestra “blanco” (sin BSA, agua Milli-Q y reactivos) se interpoló la absorbancia de las muestras a la de la recta patrón construida a partir de las concentraciones conocidas de BSA. La modificación oxidativa de las proteínas totales se evaluó mediante la detección de inmunotransferencia de grupos carbonilo de proteínas, utilizando el kit “OxyBlot” de oxidación de proteínas (Millipore, Madrid-España) según las instrucciones del fabricante. A partir de 12  $\mu\text{g}$  de muestra, tomados de la dilución 1/15 realizada previamente para medir proteínas por Lowry, se inició el proceso de derivatización. Para ello, en un tubo Eppendorf con los 12  $\mu\text{g}$  de muestra se añadió la cantidad necesaria de agua Milli-Q hasta completar 5  $\mu\text{L}$  de volumen. Se agregaron 5  $\mu\text{L}$  de SDS (dodecilsulfato sódico) al 12% para desnaturalizar las proteínas. Se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de solución DNPH (dinitrofenilhidracina) al 1x, y se incubaron los tubos a temperatura ambiente durante 15 minutos. Durante ese tiempo se preparó en otro tubo una

solución que contenía el reactivo de neutralización (7,5 µL por muestra) y mercaptoetanol (1,4 µL por muestra). Pasado el período de incubación, se añadió a cada muestra 8,9 µL de la solución preparada para finalizar el proceso de derivatización de la muestra. Una vez derivatizadas las muestras, fueron cargadas en el gel de transferencia de poliacrilamida. Se emplearon geles discontinuos al 12% de acrilamida (29:1 Acrilamida:Bisacrilamida) con SDS al 10%, sobre los que se aplicó un campo eléctrico constante de 100 Voltios durante 2 horas, en un tampón preparado previamente (25 mM Tris, 200 mM de glicina, SDS 10%, pH 8,3). Una vez realizada la electroforesis, el gel fue transferido (Western Blotting) a una membrana de Nitrocelulosa (Schelider & Shuel, USA), mediante electrotransferencia en condiciones húmedas por medio del sistema Miniprotean II (Bio-Rad, USA). El proceso se desarrolló durante 90 minutos, a una temperatura de 4°C a una intensidad constante de 240 mAmpereos, en un tampón de transferencia (25Mm Tris, 192 mM de Glicina, Metanol al 20% v/v, pH 8,3). Una vez obtenida la membrana tras la transferencia, se dejó incubando durante una hora en una solución de BSA al 1% en PBS-T (*Phosphate Buffered Saline with Tween*, o Solución salina tamponada con fosfato con Tween) para bloquear sitios inespecíficos a los que el anticuerpo se pudiese unir. Posterior al bloqueo, se incubaron las membranas con el anticuerpo primario. Para ello se realizó

una dilución 1:150 del anticuerpo en BSA al 1% de PBS-T, y se dejó incubando en agitación durante toda una noche a una temperatura de 4°C. Tras la incubación, se realizaron 3 lavados con 10 ml de PBS-T, y entre cada lavado se dejó la membrana en agitación durante 10 minutos. Seguidamente, la membrana se incubó durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario proporcionado por el kit, el cual había sido diluido en BSA al 1% de PBS-T en una dilución 1:300. Para el revelado, la membrana fue incubada 1 minuto con reactivo de detección quimioluminiscente (ECL Amersham Pharmacia. GE Healthcare, USA) e inmediatamente revelada con un detector quimioluminiscente mediante el programa Image quant LAS 4000 (GE-Healthcare Bio-Sciences). Las imágenes obtenidas fueron almacenadas en formato digital tif para poder realizar la densitometría utilizando el programa informático Li-cor Image studio. Como control de carga, se tiñeron las membranas con rojo Ponceu. El cálculo final se obtuvo de la ratio densitometría de las proteínas carboniladas/densitometría de la membrana teñida en rojo Ponceau.

- b. Cambios en el perfil metabolómico. Se analizaron las muestras de plasma mediante espectrofotometría de RMN. Para ello se descongeló una alícuota de 25 µL, y a cada muestra se le añadieron 5 µL de óxido de deuterio (agua pesada o D<sub>2</sub>O) y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos a 20°C. Se tomó una alícuota de 20 µL del

sobrenadante y se colocó en un tubo de 1 mm para RMN de alta resolución (Bruker Biospin GmbH). Todos los espectros se obtuvieron con un espectrómetro Bruker Avance DRX 600 (Valencia, España) equipado con una sonda de 1mm  $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  y operando a una frecuencia  $^1\text{H}$  de 600.13 MHz. Las muestras se colocaron en un Robot SampleJet con control de temperatura que mantiene a las mismas a 4°C hasta el momento de su medida (no más de 1 hora de espera). Una vez en el espectrómetro, se mantuvieron un tiempo total de 3 minutos para que la temperatura de la muestra alcanzase 37°C estables antes de que los espectros fuesen adquiridos. Se midió un experimento de pulso-adquisición con pre-saturación del agua para todas las muestras. Para evitar efectos sobre la intensidad de la señal diferente de la cantidad de metabolito, se realizaron experimentos de un solo pulso sin filtrar antes que secuencias de pulso filtradas. Se empleó una pre-saturación durante 1 segundo a lo largo del periodo de reciclado para la supresión de la señal del disolvente. La anchura de todos los espectros fue 8000 Hz para  $^1\text{H}$ . Antes de la transformación de Fourier, la FID (*free induction decay*) se multiplicó por una ventana exponencial de 0,3 Hz. Se realizó un referenciado del desplazamiento químico sobre la señal del doblete CH<sub>3</sub> de la alanina a 1.475 ppm en todos los espectros. Todos los espectros se procesaron usando MNova (MestreLab S.A., 2008, Santiago de Compostela) y se transfirieron a MATLAB (MathWorks Inc, 2006) usando sus secuencias para el análisis de datos. Se investigó la región de desplazamiento químico incluyendo las resonancias entre 0,50 y 4,70 ppm (región alifática) y 5,20 a 10,00 ppm

(región aromática). Los espectros se normalizaron al área espectral total alifática para eliminar las diferencias en la concentración de las muestras. Los espectros se diezmaron en cubos de 0,01 ppm y se realizó el análisis estadístico usando las secuencias propias de MATLAB y la librería de análisis estadístico multivariable PLS\_Toolbox. Las columnas se centraron a la media antes del análisis multivariable. Se aplicó un PCA al conjunto de vectores espectrales, ya que es capaz de representar estructuras de datos multivariadas complejas en un espacio de dimensiones reducidas, conservando la estructura de los datos. Los componentes principales se eligieron para explicar, al menos, el 45,2% de la varianza. Se usaron los diagramas de carga de los componentes principales correspondientes para detectar las posiciones de los metabolitos más relevantes. El método de selección para las posiciones relevantes incluye una comparación entre la carga de cada columna y el valor medio en todos los espectros. Las columnas con factores de carga más grandes que los valores espectrales medios son seleccionados como relevantes. Las señales de estos metabolitos se integran y se cuantifican usando secuencias de ajuste de picos semi-automáticos de MATLAB. Estas secuencias de ajuste se basan en los procedimientos de optimización de Lavenberg-Marquardt. La función objetivo para la optimización incluye medidas de espectros experimentales para soluciones estándar de los metabolitos seleccionados con patrones de multiplete complejo y señales de curva Lorentziana generadas teóricamente para aquellos metabolitos con patrones espectrales más simples. El análisis

estadístico se llevó a cabo mediante la prueba t de student para muestras pareadas.

- c. Expresión génica en células mononucleares periféricas (figura 11). Cada muestra de 5 mL de sangre se introdujo en un tubo Vacutainer con heparina sódica como anticoagulante y se invirtió suavemente cinco veces. Posteriormente se centrifugó a 3.000 g a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante (plasma) y se recogió la capa leucocitaria que contenía células mononucleares. Las células mononucleares se lavaron dos veces en PBS y se congelaron a -80° C para el posterior aislamiento del ARN, para lo cual se empleó el reactivo Trizol (TRIzol, Invitrogen, Thermo-Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EE.UU.). El número de integridad del ARN (RIN) se probó con el bioanalizador 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.), y la concentración y pureza del ARN se determinaron utilizando un espectrofotómetro (GeneQuant, GE Healthcare Biosciences). Se evaluaron los perfiles de expresión génica. El perfil de ARNm se realizó usando Clariom D-Human Array (Life Technologies, SIF: A28139434). Esta matriz comprende más de 542.000 transcripciones que constituyen más de 134.000 conjuntos de sondas a nivel de genes. Los experimentos de micromatrices se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Life Technologies, SIF: A28139434). Se marcaron 300 ng de ARN total usando el kit de reactivos Genechip WT Plus. La reacción de marcado se hibridó en la matriz de genes humanos en el horno de hibridación 645 a 45°C durante 16 horas. Las dieciséis matrices de cada grupo se

tiñeron con Fluidics Station 450 utilizando el script de fluidos FS450\_0001, y posteriormente se escanearon en GeneChip Scanner 3000 7G. Se utilizó el software GeneChip Command Console suministrado por Life Technologies para realizar el análisis de expresión génica. Por otro lado, se realizó un perfil de expresión de ARN no codificante utilizando GeneChip miARN 4.0 Array (Life Technologies, SIF: A28139434). La matriz contenía 30.434 secuencias de miARN maduras de la cobertura de miARN codificada por miRBASE (v20) de 203 organismos, 2.578 miARN maduros humanos y 1.908 conjuntos de sondas de ARN no codificantes y ARN de Cajal pequeños. Los experimentos de microarrays se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se marcaron 300 ng de ARN total con FlashTag Biotin HSR RNA Labeling Kit (Life Technologies, SIF: A28139434). La reacción de marcado se hibridó en el miARN Array en el horno de hibridación Affymetrix 645 a 48°C durante 18 h. Las matrices se tiñeron con Fluidics Station 450 utilizando el script de fluidos FS450\_0002, y luego se escanearon en GeneChip Scanner 3000 7G. Se utilizó el software GeneChip Command Console suministrado por Life Technologies para realizar el análisis de expresión. Los valores atípicos de la sonda de miARN se definieron según las instrucciones del fabricante y se analizaron más a fondo para el resumen de datos, la normalización y el control de calidad mediante el uso del software miARN QC Tool. Los datos se analizaron y filtraron estadísticamente utilizando el software Partek Genomic Suite 6.4 (Partek Inc., St. Louis, MO). Los archivos de entrada se normalizaron

con el algoritmo de la razón monótona (RMA). Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) unidireccional con Partek Genomics Suite en todas las muestras. Los genes estadísticamente significativos entre diferentes grupos se identificaron utilizando un modelo de ANOVA con un valor de  $p \leq 0,05$ . Los datos importados fueron analizados por PCA para determinar las fuentes significativas de variabilidad en los datos. Los genes seleccionados fueron analizados usando el software Pathway Studio v8 (software Ariadne) para realizar un Análisis de Enriquecimiento Biológico, que es un método computacional que determina si un conjunto definido de genes muestra significación estadística entre dos estados biológicos diferentes, en nuestro estudio, antes y después del tratamiento con TDC. Este método funciona clasificando el conjunto completo de genes utilizando los valores de cambio de veces (omitiendo los valores p corregidos), proporcionando procesos significativos, en los que la mayoría de los genes relacionados comparten el mismo perfil de expresión. Por lo tanto, el análisis de enriquecimiento del conjunto de genes permite detectar aquellos genes que describen un fenotipo concreto en experimentos con un tamaño muestral pequeño.



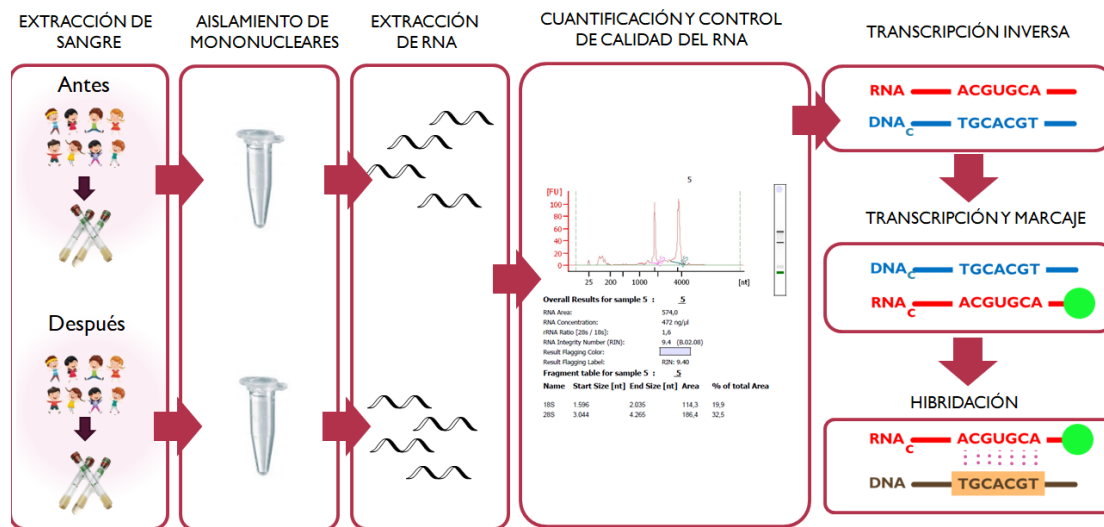


Figura 11. Esquema del proceso de análisis de la expresión génica en células mononucleares en sangre periférica. Cedida por Dra. Gloria Olaso.

---

## 7. RESULTADOS

Los resultados de este trabajo han sido plasmados en cinco artículos científicos, todos ellos publicados en revistas de alto impacto. Además, se han evaluado otros datos que no se han incluido en estas publicaciones ni han sido publicados en revistas científicas o comunicaciones en congresos, y se muestran en un epígrafe al final de este apartado.

## **7.1 PRIMER ARTÍCULO: SAFETY AND EFFECTIVENESS OF THE PROLONGED TREATMENT OF CHILDREN WITH A KETOGENIC DIET.**

### **7.1.1 PRESENTACIÓN DEL ARTÍCULO**

#### **Autores:**

1. Jana Ruiz Herrero
2. Elvira Cañedo Villarroya
3. Juan José García Peñas
4. Beatriz García Alcolea
5. Begoña Gómez Fernández
6. Laura Andrea Puerta Macfarland
7. Consuelo Pedrón-Giner

**Revista:** Nutrients. ISSN 2072-6643.

Factor de impacto año 2020: 5,717. Factor de impacto de los últimos 5 años: 6,349.

#### **Referencia completa:**

Ruiz Herrero J, Cañedo Villarroya E, García Peñas JJ, García Alcolea B, Gómez Fernández B, Puerta Macfarland LA, Pedrón-Giner C. **Safety and Effectiveness of the Prolonged Treatment of Children with a Ketogenic Diet.** Nutrients 2020;12(2):306. Doi: 10.3390/nu12020306.

## 7.1.2 ARTÍCULO PUBLICADO



Article

# Safety and Effectiveness of the Prolonged Treatment of Children with a Ketogenic Diet

Jana Ruiz Herrero <sup>1,\*</sup>, Elvira Cañedo Villarroya <sup>2</sup>, Juan José García Peñas <sup>3</sup>,  
Beatriz García Alcolea <sup>2</sup>, Begoña Gómez Fernández <sup>2</sup>, Laura Andrea Puerta Macfarland <sup>2</sup> and  
Consuelo Pedrón Giner <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Pediatric Gastroenterology, Pediatric Service, San Rafael Hospital, 28016 Madrid, Spain

<sup>2</sup> Department of Gastroenterology and Nutrition, Niño Jesús Pediatric Hospital, 28009 Madrid, Spain; elviracaedo@yahoo.es (E.C.V.); bgarciaa@salud.madrid.org (B.G.A.); bgomezf@salud.madrid.org (B.G.F.); laura.puertamac@yahoo.es (L.A.P.M.); consuelocarmen.pedron@salud.madrid.org (C.P.G.)

<sup>3</sup> Department of Neurology, Niño Jesús Pediatric Hospital, 28009 Madrid, Spain; jgarciadelarape.1961@gmail.com

\* Correspondence: jana.ruizherrero@hotmail.com; Tel.: +34-915-035-933

Received: 5 December 2019; Accepted: 22 January 2020; Published: 24 January 2020



**Abstract:** Background: The ketogenic diet (KD) is an effective treatment against drug-resistant epilepsy in children. The KD is a diet rich in fats that produces anticonvulsant and neuroprotective effects that reduces seizures and improves the cognitive state. Nevertheless, it can produce side effects that sometimes can be serious. Further, the effect on growth is quite controversial when used for an extended period of time. The aim of this paper was to assess the effectiveness, side effects, and repercussions in the development of children who have been treated with a KD for more than 2 years. Methods: Observational descriptive study of 26 pediatric patients on a KD, with data collection at baseline, at 3, 6, and 12 months, and then once a year. Number of seizures, type of seizures, anti-seizure drugs, anthropometry, side effects, and alterations in laboratory assessment were monitored. Results: In every assessment, about 60%–75% of the patients experienced a reduction in number of seizures of over 90%, and at least 50% experienced side effects, of which digestive issues, alteration in the lipid metabolism, and hypercalciuria were the most common. The KD significantly affected height after 2 years of treatment. Conclusions: The KD is an effective treatment for drug-resistant epilepsy. Its side effects, although common, are very mild; therefore, this constitutes a very safe treatment for children of all ages. More studies are needed to identify and prevent potential causes of growth retardation in children on the KD.

**Keywords:** ketogenic diet; drug-resistant epilepsy; GLUT-1; growth

### 1. Introduction

A ketogenic diet (KD) is characterized by the high percentage of calories obtained from fat and a limited percentage obtained from carbohydrates [1]. There are different types of diets according to the different amounts of macronutrients [1,2]. In the classic KD, 87%–90% of daily caloric intake comes from fat sources [2]. The provision of carbohydrates and proteins may vary within ratios of 3:1 to 4:1 (3–4 g of fat to 1 g of carbohydrates plus protein). In the KD with medium-chain triglyceride (MCT, KD-MCT) approximately 71% of caloric intake comes from fat sources, of that, 11% is from natural foods and 60% is from MCT [3]. There is another KD-MCT in which natural food fat percent is higher (41%) and instead, only 30% of fat comes from MCT. The modified Atkins diet (MAD) allows an unrestricted amount of protein and fat but does restrict the carbohydrate intake to 10 g/day [4,5]. Lastly,

the low glycemic index diet (LGID) is rich in fat but allows for a higher amount of carbohydrates, permitting only those foods whose glycemic index is lower than 50 [6].

The KD is an effective treatment against drug-resistant epilepsy [7], defined by the International League Against Epilepsy (ILAE) as “uncontrolled epilepsy in which two or more drugs have been used for treatment in the correct dosage”. The KD works through different mechanisms, complementary and not fully known. These include ketosis; reduced glucose; elevated fatty acid levels; enhanced bioenergetic reserves; and others with anticonvulsant, anti-epileptogenic, and neuroprotective properties [8]. The KD must be considered precociously as treatment in specific epileptic syndromes and in some etiologies where it is known to be very effective [9,10], including Dravet syndrome [11,12], infantile spasms and West syndrome [13,14], Doose syndrome [15,16], tuberous sclerosis complex [17], and FIRES syndrome (febrile infection related epilepsy syndrome) [18,19]. Moreover, it is the treatment of choice in the deficiency of glucose type 1 transporter (GLUT-1) [20] and in pyruvate dehydrogenase deficiency (PDH) [21].

Side effects may occur at the beginning of the diet as well as months after the introduction of the diet. Short-term side effects are dehydration, electrolyte abnormalities, hypoglycemia, lethargy, hyperuricemia, acidosis, abdominal pain, nausea/vomiting, diarrhea, constipation, hepatitis, or acute pancreatitis [22,23]. Long-term side effects could be hypoproteinemia, hypocalcemia, hypercalciuria, urolithiasis, lipid profile changes, transaminase increase, or cardiomyopathy [22,23]. There is little information about possible long-term side effects in children on the KD for longer than 2 years: increased risk of bone fractures, kidney stones, and growth delay are the most referred [24]. In most cases, the symptomatology experienced is often mild and self-limited, and only in a small percentage of patients are dietary modifications or pharmacological treatment needed, and in rare and severe cases the patient must be weaned off the KD. KD is not a balanced diet, so the intake of vitamins and minerals can be compromised. Nutrients deficiency has been described (vitamin D, selenium, magnesium, iron, and carnitine) [22,25,26]. The effect on growth is quite controversial. Some studies show no change in growth patterns [27,28], whereas studies where a longer follow-up was done for a longer period of growth did seem to be affected [29,30], especially in younger children [31]. Two very recent papers suggest a protective effect of citrate supplementation [32,33].

The main goal of this study was to assess the effectiveness of long-term KD, as well as the side effects, especially those with regard to growth development.

## 2. Materials and Methods

Data of all pediatric patients (<18 years old) who had been prescribed a KD in a Spanish tertiary care level hospital in Madrid between January 2000 and December 2018 were collected. It is a retrospective and prospective (since May 2015) observational descriptive study. It was approved by the Committee for Ethics in Clinical Research of the University Children’s Hospital Niño Jesús (R-0002/15) as part of a more complete investigation to determine the changes in gene expression and metabolism induced by a KD. All patients or their relatives were fully informed of the aims and scope of the research and signed an informed consent. All data were collected anonymously. The inclusion criteria were being under 18 years old and having been treated for at least 2 years with a KD. A total of 26 participants were recruited for this study. The age at the beginning of the KD ranged from 3 months to 12.5 years. Five patients were infants  $\leq 1$  year old at the onset of a KD, nine were 1–5 years old, nine were 5–10 years old, and three were older than 10 years. Full medical histories were reviewed in order to collect epidemiological data, information about the disease they suffered, type and amount of seizures, and treatments they had received prior to the diet’s implementation, including drug use. Antiepileptic drugs (AEDs) were prescribed by the neurologist on the basis of the patient’s weight, and these were adjusted according to clinical changes and blood levels, if any.

To estimate the resting energy expenditure, an indirect calorimetry was performed for only four patients. The recommendations of the World Health Organization on the basis of age and weight were used for the remainder of patients [34]. Protein intake was calculated according to daily protein

recommendations (generally 1 g per kilo per day in children over 1 year and 1.5 in children under 1 year) [35,36]. Needs of liquids were calculated according to Holliday–Segar method [37]. Infants younger than 6 months were on a liquid diet based on Ketocal<sup>®</sup>. Older infants and children were on a diet based on natural foods supplemented with a fat emulsion consisting of MCT (Liquigen<sup>®</sup>) or with powders or liquids rich in lipids and low in carbohydrates, based on whey protein supplemented with amino acids and micronutrients (Ketocal<sup>®</sup>). Only when an insufficient intake or a nutritional deficiency was found were the children started on a carbohydrate-free multivitamin, or a calcium, vitamin D, or other supplement. The dosage was to reach Recommended Dietary Allowance (DRA) or greater if necessary.

All patients underwent a thorough examination prior to the KD and then after the 1st, 3rd, 6th, and 12th month and then yearly after being weaned off the diet or being discharged. The effectiveness of the diet was measured by a reduction in AEDs and the number of seizures. The effect of the KD on the seizures was assessed on the basis of the percentage of incidence: 100% (lack of seizures), 90%–100% improvement, 50%–90%, <50%, 0% (no improvement), or increase of the amount of seizures [38].

In each medical examination, possible side effects were accounted for and were divided into early (if they appeared within the first month) or late (if they appeared after the first month). Anthropometric measures were likewise analyzed (weight, height, and body mass index (BMI)) in order to identify growth abnormalities. It was considered normal if the z-score of the BMI was between  $-2$  and  $+1$  in children older than 5 years. Mild malnutrition if  $z$  was  $<-2$  and  $\geq-3$  and severe malnutrition if  $z < -3$ . Overnutrition was divided into three categories (overweight,  $>+1$  and  $\leq+2$ ; obesity,  $z > +2$ ; and  $\leq +3$  and severe obesity,  $z > +3$ ). In children younger than 5 years, normalcy was established between  $-2$  and  $+2$ , malnutrition was considered to have the same parameters stated above, and overnutrition was as follows: overweight  $z > +2$  and  $\leq +3$ , and obesity  $z > +3$ . Parameters were adjusted by sex and age according to the growth charts of the World Health Organization [39–41]. Height development was considered normal when the z score was between  $-2$  and  $+2$ , mild alteration if  $z$  was  $<-2$  and  $\geq-3$ , and severe alteration if  $z$  was  $<-3$ . Laboratory assessment, in order to identify side effects and evaluate nutritional status, included complete blood count; biochemical profile; lipid profile; gasometry; ions; urinary sediment; calcium/creatinine relation; protein/creatinine and citrate/creatinine; prealbumin and retinol binding protein (RBP); vitamins A, E, D, and B12; folic acid; zinc; selenium; parathormone (PTH); and carnitine. Then, we specified, between parentheses, the normal ranges and degrees of deficiency of each of the parameters evaluated. Prealbumin ( $>15$  mg/dL, mild decrease 10–15, moderate 5–10, and severe  $<5$  mg/dL); RBP ( $>2.5$  mg/dL, mild decrease 2–2.5 mg/dL, moderate 1.5–2 mg/dL, and severe  $<1.5$  mg/dL); vitamin A (0.2–0.5 mg/L); vitamin E (0.8–10 mg/g of lipids); vitamin D (20–60 ng/mL); ferritin (7–140 ng/mL); vitamin B12 ( $>250$  pg/mL); folic acid ( $>3.9$  ng/mL); cholesterol ( $<200$  mg/dL); triglycerides ( $<115$  mg/dL); aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) ( $<50$  IU/L); gamma glutamyl transpeptidase (GGT) ( $<35$  IU/L); uric acid ( $<6$  mg/dl); calciuria (calcium/creatinine in urine  $<0.2$  mg/mg in children older than 2 years and  $<0.5$  in under 2 years); pH in gasometry ( $>7.3$ ); bicarbonate ( $>20$  mMol/L); zinc ( $>70$  mcg/dL); selenium ( $>70$  mcg/L); carnitine ( $>33$  mcM/L); and magnesium ( $>1.5$  mg/dL).

### 3. Statistical Analysis

Variables were registered in an Excel program table. All statistical analyses were carried out with R software version 3.5.2. Figures were generated with R and Excel software. Prior to the main statistical analyses, the normality assumption of studied variables was confirmed using the Shapiro–Wilk test. Paired sample Student's *t*-test was used to assess significant differences in the z-scores for weight, height, and BMI at baseline and at 24 months of KD treatment for the complete cohort. The effect of the introduction of the KD in patients younger and older than 2 years was also assessed, creating two age groups. The unpaired Wilcoxon signed-rank test was used to compare the z-score values for weight, height, and BMI for these to age groups after 2 years of treatment with a KD. A two-tailed test was performed, and  $p < 0.05$  was considered significant.

#### 4. Results

The study consisted of 26 patients (9 females and 17 males) on a KD. In Table 1, the characteristics of the sample are specified. Of the 26 cases, 25 suffered from drug-resistant epilepsy and the remaining patient's initial diagnosis was GLUT-1 deficiency, which was not genetically confirmed. This child suffered from movement disorder, dystonia, and ataxia. Two years after the introduction of the KD, a *NALCN* (sodium leak channel, non-selective) gene mutation was perceived compatible with congenital contractures of the limbs and face with hypotonia and developmental delay syndrome (CLIFAHDD syndrome). The causes for epilepsy are shown in Table 2. There was one case of Doose syndrome, one of Otahara syndrome, and one of Lennox–Gastaut syndrome among the four patients in which no cause was identified. The average number of AEDs used before the diet was 3.72 (range of 0–11), and 15 out of the 25 patients suffered side effects due to medication. None of the patients underwent surgery, and one improved as a result of having a vagus nerve stimulator. Other treatments that have not been effective were previously used: KD already withdrawn (1 patient), corticoids (1), gamma globulins (1), cofactors (1), adrenocorticotrophic hormone (ACTH) (2), and pyridoxine (8).

**Table 1.** Characteristics of the patients in the study.

	Patients with KD (n = 26)
Sex	17 M (65.38%) 9 F (34.62%)
Type of seizure	GTC, 1 (4%) Myoclonic, 7 (28%) Tonic, 4 (16%) Focal onset, 5 (20%) Atonic, 1 (4%) Typical absences, 1 (4%) Clonic, 1 (4%) Various, 5 (20%)
Median age of epilepsy debut (range)	0.97 years (2 days to 4 years)
Median age at introduction of KD (range)	4 years (3 months to 12.6 years)
Type of KD	CKD 3:1, 11 (42.31%) CKD 4:1, 4 (15.38%) MAD, 11 (42.31%)
Administration route	Oral, 21 (80.77%) Nasogastric tube, 2 (7.69%) Gastrostomy (G-tube), 3 (11.54%)
Median length of KD (range)	3.91 years (2–9.4 years)
Present situation	Off of the diet, 10 (38.5%) Active, 16 (61.5%)

KD: ketogenic diet, M: male, F: female, GTC: generalized tonic-clonic, MAD: modified Atkins diet, CKD: classic ketogenic diet.

Two patients were in status epilepticus before starting on the KD, and three patients could not specify the quantity of seizures per day, but were numerous in quantity, whereas one patient suffered none. Out of the other 20 patients, 3 did not have daily seizures (ranging from 1 per month to 4 per week) and 17 had daily seizures (ranging from 1 to 60 seizures per day). The average amount of AEDs administered prior to the KD was 2.8 (median 3; maximum 5). Electroencephalogram recording was performed for 21 patients before the KD, and in all cases the results were abnormal.

Four patients were infants at the onset of the diet. In all of these cases, a CKD with a 3:1 ratio was administered, and in 1 case the administration route was through nasogastric tube. All patients who received a 4:1 ratio diet were older than 3 years, and in three of these cases the administration route was not oral (2 g-tubes and 1 nasogastric tube). These diets were introduced slowly and progressively without fasting and without liquid restriction. One exception was one patient who was in status epilepticus whose introduction of the KD was done quickly and who had a calorie restriction of 25% of the daily recommended intake. In six of the cases, they were out-patients and all were on a MAD.

Two patients started their diet in another hospital. The rest of the sample started the diet in the Hospital Niño Jesús. Average ketosis was  $\geq 2.4$  mM/L and it was achieved in a median of 4 days (1–30 days).

**Table 2.** Etiology of epilepsy.

Etiology	Frequency	Percent	Specific Etiology
Unknown	4	16.00	
Metabolic	10	40.00	7 GLUT1DS 3 mitochondrial diseases
Structural	5	20.00	1 cortical dysplasia 4 hypoxic-ischemic structural brain abnormalities (2 perinatal problems, 1 meningitis, 1 sepsis)
Genetic disorders	4	16.00	3 gene disorders: 1 KCNQ2 gene mutation 1 CDKL5 gene mutation 1 Noonan syndrome (PTPN) 1 chromosome disorders: 1 Down syndrome
Infection	2	8.00	1 herpes simplex virus 1 Streptococcus pneumoniae

GLUT1DS: glucose transporter type 1 deficiency syndrome, *KCNQ2*: potassium voltage-gated channel subfamily Q member 2, *CDKL5*: cyclin dependent kinase-like 5, *PTPN*: protein tyrosine phosphatase non-receptor.

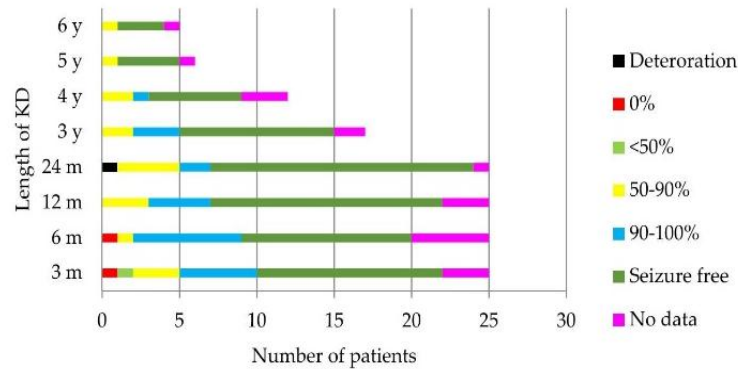
During the follow-up, one child needed the administration of the diet through a g-tube (1.5 months after starting the diet) and there were changes in the type of diet and of ratio in 11 cases: one patient went from having a 3:1 ratio to a 2:1 ratio on the fourth day; two patients went from a 4:1 ratio to a 3:1 ratio on the 7th and on the 43rd day due to side effects; four patients went from having a CKD to a MAD (one due to side effects, three due to the long duration of the diet); and four patients went from having a MAD to a LGID also due to the long duration of the diet. The average of  $\beta$ -hydroxybutyrate blood levels during follow-up were 3 months, 2.23 mM/L (0–5.9); 6 months, 2.7 (0.2–5.1); 12 months, 3.14 (0.1–5.9); 2 years, 2.9 (0.3–5.9); 3 years, 2.8 (0.3–4.6); 4 years, 2.41 (0.4–6.7); 5 years, 2.47 (1.2–3.7); 6 years, 1.23 (0.9–1.4).

The median length on a KD was 3.91 years. Most often the reason to suspend the diet was the long duration (8/10). In one case, the diet was suspended due to dietary treatment of eosinophilic esophagitis, the seizures in the beginning got worse but the child later returned to a normal state. In another case, the diet was removed because GLUT-1 deficiency was suspected initially but later a Christianson syndrome was confirmed with an *SLC9AC* gene mutation.

#### 4.1. Outcome of the KD

Figure 1 shows the results of the amount of seizures in the 25 children who had epilepsy. The following patients had a 100% reduction of the seizures: at 3 months, 12 out of 25 children (48%); at 6 months, 11/25 (44%); at 12 months, 15/25 (60%); at 24 months, 17/25 (68%); at 3 years, 10/17 (58.8%); at 4 years 7/12 (58.3%); at 5 years 4/6 (66.6%); at 6 years 3/5 (60%). The reduction of the seizures was higher than 90% in 68% of the children 3 months after the diet, 72% after 6 months, 76% after 12 and 24 months and 3 years, 66.6% after 4 and 5 years, and 60% after 6 years. Table 3 shows the effectiveness of the diet according to the etiology of epilepsy. The patient with a movement disorder had a noticeable improvement of her symptomatology. A subjective cognitive or behavioral improvement was observed in 10 (38.46%), 9 (34.61%), and 8 (30.76%) patients at 6, 12, and 24 months, respectively. The patients who were able to reduce the number of AEDs taken prior to the diet were 3 months, 6/25; 6 months, 5/25; 12 months, 6/25; 2 years, 9/25; 3 years, 2/17; 4 years, 2/11; 5 years, 1/7; 6 years, 0/6. After 2, 3, and 4 years, one patient did not take any AEDs; after 5 years, two children did not take any AEDs.





**Figure 1.** Evolution of the seizures throughout the follow-up. In one patient, the seizures were hard to account for because they happened during sleep. KD: ketogenic diet, m: months, y: years.

**Table 3.** Effectiveness of the diet according to the etiology of epilepsy. The number of patients within each group that were within each improvement category is represented according to the reduction of epileptic seizures compared to baseline.

	1 Year			2 Years			3 Years		
	50%–90%	90%–100%	100%	50%–90%	90%–100%	100%	50%–90%	90%–100%	100%
Unknown	-	-	3/4	-	-	3/4	-	1/2	1/2
Metabolic	1/10	1/10	7/10	-	1/10	9/10	-	1/7	6/7
Structural	1/5	1/5	2/5	2/5	-	2/5	-	1/1	-
Genetic disorders	-	1/4	3/4	-	1/4	3/4	-	-	2/2
Infection	1/2	1/2	-	2/2	-	-	2/2	-	-

Six patients remained on the KD for more than 6 years. The etiology was very different in each case (two GLUT-1 deficiency syndrome, one of them not confirmed by genetic testing, one due to meningoencephalitis, one CLIFAHDD syndrome, one Leigh syndrome, and one possible mitochondrial disease). One patient did not suffer any seizures before the introduction of the diet and had a CKD with a 3:1 ratio. After commencing the diet, the remaining patients achieved a 100% reduction of the seizures except for one patient who had a reduction of 50%–90%. They were all on a MAD, except for the patient with Leigh syndrome who was on a CKD 4:1 ratio. They all still took 1 to 3 AEDs.

The patient who remained on the diet the longest time was a male with GLUT-1 deficiency syndrome who was on a MAD for more than 9 years. Before being discharged to another hospital due to his age, the patient was still on valproic acid treatment and had not had seizures since the start of the diet.

#### 4.2. Side Effects

Of the 26 patients, 11 had early onset side effects: nausea and vomiting (4), constipation (3), hypoglycemia (3), hypercalciuria (3), fatigue (2), acidosis (1), diarrhea (1), hypocalcemia (1), and hypertriglyceridemia (1). In most cases they were mild, except in four patients, for which a change of diet was prescribed.

In the long term, some side effects were detected; most were easy to manage and a change of diet was not needed. These are shown in detail in Table 4. The most altered results in blood parameters were cholesterolemia 389 mg/dl at 3 months; triglyceridemia 496 mg/dl at 3 months; AST 223 IU/L, ALT 310 IU/L, and GGT 111 IU/L in a patient at 12 months on a KD; calciuria 1.15 mg/mg at 12 months; proteinuria 1.2 mg/mg at 12 months; hyperuricemia 8.7 mg/dl at 2 years; pH 7.22 at 2 years. After 12 months, hypercalciuria was associated to a nephrocalcinosis in an ultrasound test; this was the patient who had CLIFAHDD syndrome, in which there was a mutation of the sodium channels.

**Table 4.** Number of patients who suffer from late side effects of the KD at every evaluation period.

Time on the Diet	3 Months	6 Months	12 Months	2 Years	3 Years	4 Years	5 Years	6 Years
Total of patients suffering side effects	15/26	13/26	21/26	22/26	11/18	7/12	3/8	3/6
Constipation	4	3	3	2	1	-	2	1
Abdominal Pain	-	-	-	1	-	-	-	-
Nausea/vomiting	1	1	1	1	-	1	-	-
Diarrhea	-	-	-	1	-	-	-	-
Hypoglycemia	-	-	-	-	-	1	-	-
Hypercholesterolemia	6	5	10	8	6	4	1	1
Hypertriglyceridemia	3	1	2	2	2	-	-	1
Elevated AST, ALT or GGT	3	2	1	2	1	-	-	-
Hypercalciuria	6	6	9	11	4	3	-	1
Protein in urine	1	4	3	3	1	1	1	-
Fatigue	1	-	-	-	-	-	-	-
Anorexia	1	-	-	-	-	-	-	-
Hyperuricemia	1	-	2	4	3	2	1	1
Metabolic acidosis (pH)	2	-	4	4	2	-	-	-

AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase, GGT: gamma glutamyl transpeptidase.

### 4.3. Nutritional Evolution

#### 4.3.1. Nutritional Status before the KD

It was possible to calculate the BMI in 22 children prior to the KD. Twelve patients were older than 5 years. They all met the criteria for the BMI z-score. Fourteen of them were younger than 5 years at the beginning of the diet, and all had a normal BMI z-score (except for one with severe malnutrition). The cephalic perimeter was measured in 10 children, 4 of them had z-scores of  $<-1$  (ranging from  $-2.04$  to  $-3.27$ ). Only three patients had a calorimetry measurement taken and testing positive for hypometabolism. In 19/26 patients, we had access to the data of dietary intake survey, and three of these were found to have deficiency in both vitamins and minerals. The average distribution of macronutrients was 15.70% of protein, 39.68% lipids, and 41.88% carbohydrates.

The average levels of prealbumin and RBP was 20.63 (range of 12.6–54.6) and 3.55 (1.69–6.8) mg/dL, respectively, before the beginning of the KD. Six patients were found to be under a normal range.

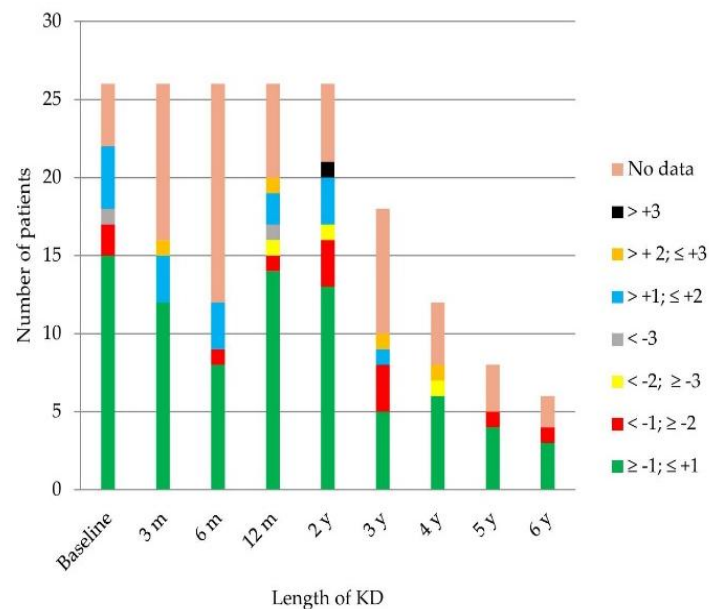
The average results of cholesterol were 161 mg/dL, and only five patients had levels  $>200$  mg/dL (maximum of 354 mg/dL). The average count of triglycerides was 65 mg/dl (range of 23–140 mg/dL).

Of 24 patients for which it was possible to get a blood count, none of them had anemia. Of the 22 children for which the values of ferritin were tested, all were found to be normal, and for those of whom we had data, neither had B12 nor folic acid deficiency (average values were 833 pg/mL and 12.31 ng/mL, respectively).

The average values for liposoluble vitamins were vitamin A at 0.35 mg/L (range of 0.22–0.64), efficient vitamin E at 5.08 mg/g of lipids (range 3.13–7.5), and vitamin D at 25.18 ng/mL (range 4.53–45.6). Six patients had levels below 20 ng/mL, and all of them were supplemented with cholecalciferol according to DRA (400 IU/day for children  $\leq 1$  year old and 600 IU/day for children  $>1$  year old). One of these patients suffered a secondary hyperparathyroidism with vitamin D value of 4.53 ng/mL and a PTH of 176 pg/mL. He was treated with cholecalciferol 3000 IU/day for three months and then supplemented according to RDA. Calcium intake was also ensured (30–75 mg/kg/day). No calcium, phosphorus, or magnesium deficiencies were registered (average value of 9.48 mg/dL, 5.08 mg/dL, and 2.20 mg/dL, respectively). Patients who had their zinc, selenium, and carnitine levels determined, averaged 89.62 microg/dl, 66.17 microg/L, and 40.62 microM/L, respectively. One patient developed a zinc deficiency, six registered a selenium deficiency, and one had a carnitine deficiency. In cases where a deficit was observed, the supplements were prescribed according to the following doses: elemental zinc, 5 mg twice a day for three months; selenium 1–2 mcg/kg (maximum 60 mcg) divided into two doses for 3 months; carnitine daily at 50 mg/kg.

#### 4.3.2. Nutritional Status after the Introduction of the KD

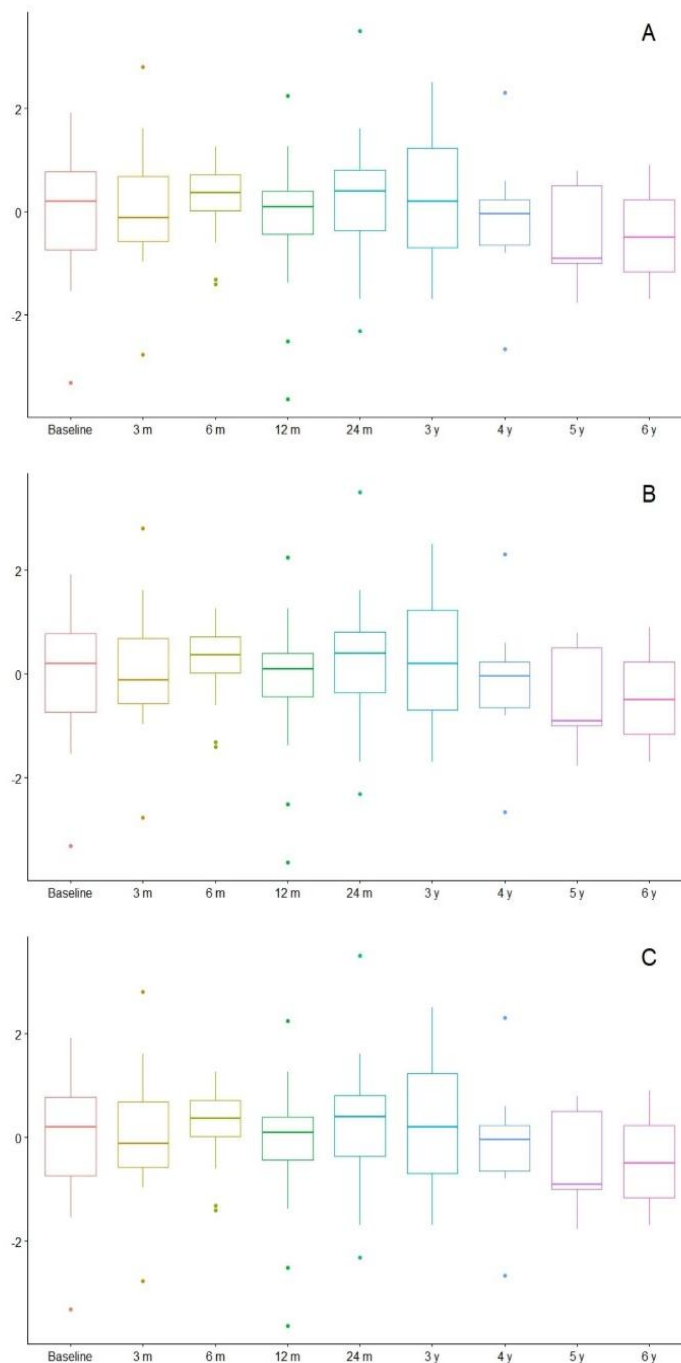
In Figure 2, the children and their different ranges of BMI are represented throughout time. Most were found to be adequately nourished in every check-up. Amongst the children older than 5, there was one child who was mildly malnourished at 3, 12, and 24 months, and one case of severe malnutrition at 12 months. There was one overweight patient at 3 months and at 3 years, and 2 cases at 6 and at 24 months. Obesity criteria was achieved by two children at 3 years on the diet, and one child at 4 years on the diet. Amongst the group younger than 5 years old, there was one case of mild malnutrition after 4 years on the diet, two cases affected by overweight at 3 and at 12 months on the diet, and one with obesity at 24 months. The evolution of the z-score of weight, height, and BMI throughout time is shown in Figure 3.



**Figure 2.** Number of patients in each range of the body mass index (BMI) z-score throughout time. KD: ketogenic diet, m: months, y: years.

The low levels of prealbumin and RBP were 3 at 3 months (2 mild and 1 moderate), 5 at 6 months (all mild), 12 at 12 months (10 mild and 2 moderate), 13 at 2 years (9 mild, 4 moderate), 5 at 3 years (3 mild, 1 moderate, 1 severe), 6 at 4 years (4 mild and 2 moderate), 3 at 5 years (2 mild and 1 moderate), and 3 at 6 years (1 mild, 1 moderate, 1 severe). In just one case was the level of prealbumin lower than 10 mg/dl, whereas the rest of the moderate and severe deficiencies corresponded to the RBP levels.

No patient presented either vitamin B12 or a folic acid deficiency. The lowest levels of ferritin were detected in an isolated case at month 3 (4 ng/mL), at year 2 (3 ng/mL), and at year 3 (6 ng/mL). Even though no actual deficiencies were observed, there were several abnormalities in the blood count of several patients throughout the follow-ups. The mean corpuscular volume augmented over 90 fl in one patient at 3 months; four at 6 months; five in the first and second year; three at 3 years; and one at 4, 5, and 6 years. The neutrophils were lower than 1500/mcl in two cases at 3 and at 6 months, three cases at 12 months, and one at 2 and at 3 years. One case of eosinophilia was described at month 3 and at month 6, and two at month 12, and again just one at years 2 and 3. Although no other causes were found for these abnormalities, there was no binding reason to acknowledge that the cause could be, in fact, the KD.



**Figure 3.** Evolution of weight (A), height (B), and BMI (C) in z-score values. m: months, y: years.

Vitamin E stayed within normal ranges during the entire follow-up, six patients had vitamin A deficiency (1 at 12 months (0.18 mg/L), one at 2 years (0.19), two at 3 years (0.16 and 0.19), and two at 4 years (0.17 and 0.12)), and six had vitamin D deficiency (one at 3 months (19.3 ng/mL), two at 12 months (16.0 and 4.9), two at 2 years (12.7 and 13.5), and one at 4 years (19.0)). None had calcium or PTH alterations. No patient had a magnesium deficiency.

Low levels of carnitine were observed in two cases (at month 6 with levels of total carnitine at 20 microm/L, and at month 12 with levels of L-carnitine at 7.6 microm/L). Two children registered

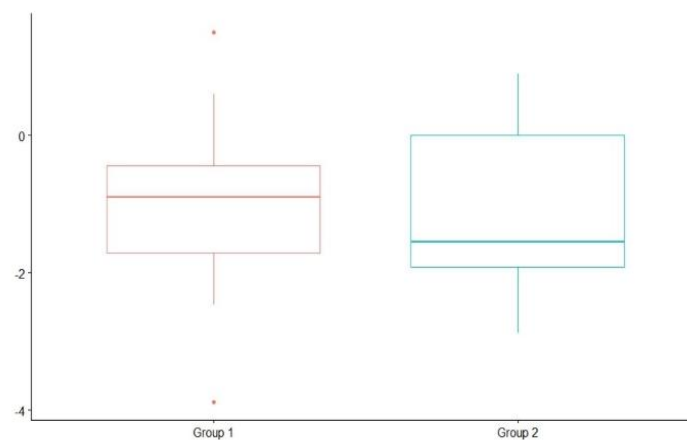
low levels of zinc (one at 12 months (64 mcg/dL) and one at 4 years (54.8)), and three had selenium deficiency (one at 6 months (53 mcg/L), one at year 2 (68.4), one at year 4 (59.2)).

The average and standard deviation of the weight, height, and BMI z-score are presented in Table 5. The height z-score was significantly lower after 2 years on the diet compared with before the diet. However, there were no significant differences in the weight and BMI z-score. No significant differences were found in the weight, height, and BMI z-score after 2 years on the diet among those children who started before 2 years of age and those who started after 2 years of age. Nevertheless, height was mildly influenced after 2 years on the diet in the children who started before the age of 2 years (Figure 4). The coefficients of variation were 13.7% (in those children who started a KD after the age of 2 years) and 8.9% (in those who started before).

**Table 5.** Variations of weight, height, and BMI of the z-score.

	Basal	2 Years on KD	Paired Differences	
	Median $\pm$ SD		Median $\pm$ SD	p-Value *
	(Minimum–Maximum)			
Weight	−0.252 $\pm$ 1.10 (−2.65 – 1.95)	−0.477 $\pm$ 1.33 (−3.31 – 3.00)	−0.257 $\pm$ 1.297841	0.3869
Height	−0.279 $\pm$ 1.21 (−2.4 – 2.14)	−1.03 $\pm$ 1.27 (−3.88 – 1.5)	−0.644 $\pm$ 1.431242	0.04681
BMI	−0.00364 $\pm$ 1.21 (−3.31 – 1.91)	0.197 $\pm$ 1.25 (−2.31 – 3.5)	0.248 $\pm$ 1.630604	0.5046

\* With statistical significance, value of  $p < 0.05$ . BMI: body mass index, KD: ketogenic diet, SD: standard deviation.



**Figure 4.** z-score eight comparison after 2 years on the diet; group 1: children older than 2 years, group 2: children younger than 2 years.

## 5. Discussion

Multiple studies have confirmed the efficacy of the KD. In our cohort, approximately half of the patients with drug-resistant epilepsy became seizure-free and about 60%–75% of the patients achieved a decrease of over 90%. Our results show more success than the data published from other hospitals because our study only included information on children who followed a KD for a prolonged period. Those patients that respond well to the treatment were precisely those who maintained the diet longer. Those in which the diet was not completely efficient abandoned the diet early on.

Because of the accumulated past data on certain syndromes and clinical cases where the KD is shown to be more efficient and beneficial, it is recommended that the diet be implemented as soon as possible. Some of these clinical disorders are Doose syndrome [15,16] and Otahara syndrome [42,43], GLUT-1 deficiency [20], PDH [21], and alterations of complex-1 of the respiratory mitochondrial

chain [44]. In this study there were eight cases in which GLUT-1 deficiency was either suspected or received the actual diagnosis, one case of Doose syndrome, and one case of Otahara syndrome. All of them had a 100% recovery rate. The three cases with mitochondrial diseases in this study had a positive response above 90%. Infants as a group also responded favorably to the KD. There was a 90% improvement in the four children who started on the KD before 12 months of age.

The average level of blood ketone bodies was adequate over the follow-up. However, some patients presented low levels of ketone bodies that were not related to a worse diet response, and thus the KD is probably effective due to other mechanisms besides ketosis.

Side effects in these children were mostly mild and did not require the termination of the diet. The digestive issues they presented have been described in about 50% of patients on a KD [22,45]. In this study, the digestive symptoms were less noted, whereas the most frequent was constipation, which was successfully managed with polyethylene glycol in all cases in which the bowel regimen and diet were insufficient. Amongst the urinary symptoms, hypercalciuria was observed in almost one fourth of the children. There was only one case in which the child suffered nephrocalcinosis (3.8%), which corresponded to the same frequency shown in literature that indicates 3%–7% [46–48]. The singular case was diagnosed 12 months after the KD was implemented and was probably associated to a mutation in the sodium channels. All cases of hypercalciuria were treated with potassium citrate (1–2 mEq/kg/day divided in three doses), which reduces the lithiasis risk in patients on a KD, and normalizes or improves calciuria [49].

The lipid profile underwent frequent changes, especially during the first 12 months of the diet. These variations have been described in up to 60% of children [22], and may happen during the first month [50] but tend to normalize within the first few months following the diet's introduction [24,51]. There has been no increased cardiovascular risk associated with the diet in recent studies [52]. There have been cases of liver dysfunction in children on the KD, especially in association with valproic acid treatment [44,53]. Amongst our patients, seven children presented mild liver enzyme conditions and five of them received valproic acid treatment.

KD treatment for more than 2 years has been associated with an increased risk of bone fracture and development issues [24]. One patient suffered a bone fracture while practicing sport after 7 years on the KD, (a bone densitometry after 6 years on the KD was on file for the child with a z-score of  $-1.096$ ).

Several studies have shown that children treated with KD for more than 6 months showed a decreased growth rate [29–31,54–56], especially in younger children, although the decrease they present is reversed after the patients are taken off the KD [57]. In our global cohort, we also observed a gradual reduction of the height z-score over time, especially after 12 months of KD. In children who began the diet before 2 years of age, a more acute decline in height development was observed. Potential causes of poor growth in children on the KD include inadequate intakes of energy and protein (compared with recommended values) the effects of the underlying diseases and treatments, ambulatory status, acidosis/ketosis, and related endocrine changes [32,33]. More research is required to identify children at higher risk of growth delay. Results showed weight was also affected, although differences were not statistically significant. The BMI stayed stable throughout the diet due to the paralleled decline in growth in both height and weight.

KD produces modifications in the levels of micronutrients. Vitamin A and E, for the most part, are not affected, however the following are: vitamin D [58], magnesium, selenium [59,60] (sometimes associated to a cardiomyopathy [61]), and carnitine. The latter is especially vulnerable when on the KD for a prolonged period, when the child is very young, or when valproic acid is used as part of the treatment [25,26]. In our cohort, the most frequent micronutrient deficiencies before KD were vitamin D and selenium. After the diet was implemented, there were six cases of mild deficiency of vitamins A and D. Only two children had carnitine deficiency—both were younger than 4 years and neither were being treated with valproic acid. It is our opinion that no more carnitine deficiencies were found in children in treatment with valproic acid because they were already being supplemented before the KD was implemented. Two children presented zinc deficiency and three children presented

selenium deficiency, but none had myocardium dysfunction symptoms. When a deficit was detected, supplements were prescribed according to RDA, increasing the doses if necessary, to normalize plasma levels. No patients registered low magnesium levels. No patients suffered anemia, even though there were several cases of corpuscular volume growth, eosinophilia, and neutropenia.

In children who achieved higher than 50% reduction of seizures on the KD, they were weaned off the KD after approximately 2 years. However, in children where the almost complete disappearance of seizures is achieved and only mild side effects are suffered, the KD diet can be maintained many years, with no time limit, weighing, of course the benefits and the risks [62]. In some pathologies it is the treatment of choice and must be maintained for a prolonged period. In GLUT-1 deficiency, for example, the KD is recommended at a minimum until puberty, and until adulthood in many cases because of its effectiveness [63,64]. In our study, all patients followed a KD for more than 2 years because of their excellent response to the diet. It should be noted that the most frequent diagnosis from our cohort (7/26) was GLUT-1 deficiency.

The benefits of a CKD can be appreciated in the long run, even after the patient has been weaned off the diet [24,65]. Guidelines suggest that, in patients in which the CKD is effective and necessary in the long run, should, after several years, change to a less restrictive diet such as the MAD or LGID [62]. In our study, 11 patients started out with a DAM, 4 patients who had a CKD switched to a MAD, and 4 patients went from a MAD to a LGID.

## 6. Conclusions

In conclusion, the KD is an efficient and safe treatment during childhood. It is especially efficient in certain pathologies. Generally, the nutritional status of the patients on KD is good, even when they are on the diet for an extended period. The nutritional deficiencies are mild and easy to treat with nutritional supplements. Height is usually affected in prolonged treatments; however, it is difficult to determine if the KD is exclusively responsible given the patient's pathology, the severity of the condition, and the need for other treatments. Side effects in the long term are mild and easy to treat. In children on a KD treatment for an extended period, it is possible to transition to less restrictive diets (MAD, LGID) that allow for a better treatment adherence.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.R.H. and C.P.G.; methodology, J.R.H. and E.C.V.; software, J.R.H.; validation, J.R.H., C.P.G., and E.C.V.; formal analysis, J.R.H.; investigation, L.A.P.M., B.G.F., and B.G.A.; resources, C.P.G., E.C.V., L.A.P.M., B.G.F., and B.G.A.; data curation, J.R.H.; writing—original draft preparation, J.R.H. and L.A.P.M.; writing—review and editing, J.R.H., J.J.G.P., and C.P.G.; visualization, J.R.H.; supervision, C.P.G.; project administration, C.P.G. All authors have read and agree to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Acknowledgments:** To Víctor Ramírez González for his statistical advice.

**Conflicts of Interest:** Ruiz Herrero has participated in two ketogenic diet courses sponsored by Nutricia and has received funding for travel from Nutricia. Cañedo Villarroya has received honorarium for lectures and funding for travel from Mead Johnson, Nestlé, Nutricia, and Abbott y Orphan. García Peñas has participated in courses and seminars sponsored by UCB, Eisai/Esteve, Bial, GW, Sanofi, and Nutricia. Puerta Macfarland has participated in two ketogenic diet courses sponsored by Nutricia. Pedrón Giner has served as a consultant or received honorarium for lectures from Nutricia, Vitaflor, Nestlé, and Mead Johnson, and has received funding for travel from Nutricia, Vitaflor, and Nestlé. García Alcolea and Gómez Fernández have no conflict of interest.

## References

1. Kossoff, E.H.; McGrogan, J.R. Worldwide use of the ketogenic diet. *Epilepsia* **2005**, *46*, 280–289. [[CrossRef](#)]
2. Kossoff, E.H. International consensus statement on clinical implementation of the ketogenic diet: agreement, flexibility, and controversy. *Epilepsia* **2008**, *49* (Suppl. 8), 11–13. [[CrossRef](#)]
3. Huttenlocher, P.R.; Wilbourn, A.J.; Signore, J.M. Medium-chain triglycerides as a therapy for intractable childhood epilepsy. *Neurology* **1971**, *21*, 1097–1103. [[CrossRef](#)]
4. Kossoff, E.H.; Krauss, G.L.; McGrogan, J.R.; Freeman, J.M. Efficacy of the Atkins diet as therapy for intractable epilepsy. *Neurology* **2003**, *61*, 1789–1791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Kossoff, E.H.; Dorward, J.L. The modified Atkins diet. *Epilepsia* **2008**, *49* (Suppl. 8), 37–41. [CrossRef] [PubMed]
6. Pfeifer, H.H.; Thiele, E.A. Low-glycemic index treatment: A liberalized ketogenic diet for treatment of intractable epilepsy. *Neurology* **2005**, *65*, 1810–1812. [CrossRef] [PubMed]
7. Kim, J.A.; Yoon, J.R.; Lee, E.J.; Lee, J.S.; Kim, J.T.; Kim, H.D.; Kang, H.C. Efficacy of the classic ketogenic and the modified Atkins diets in refractory childhood epilepsy. *Epilepsia* **2016**, *57*, 51–58. [CrossRef] [PubMed]
8. Masino, S.A.; Rho, J.M. Mechanisms of Ketogenic Diet Action. In *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*, 4th ed.; Noebels, J.L., Avoli, M., Rogawski, M.A., Olsen, R.W., Delgado-Escueta, A.V., Eds.; National Center for Biotechnology Information (US): Bethesda, MD, USA, 2012; Available online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK98219/PubMed> (accessed on 2 November 2018).
9. Nangia, S.; Caraballo, R.H.; Kang, H.C.; Nordli, D.R.; Scheffer, I.E. Is the ketogenic diet effective in specific epilepsy syndromes? *Epilepsy Res.* **2012**, *100*, 252–257. [CrossRef] [PubMed]
10. Thammongkol, S.; Vears, D.F.; Bicknell-Royle, J.; Nation, J.; Draffin, K.; Stewart, K.G.; Scheffer, I.E.; Mackay, M.T. Efficacy of the ketogenic diet: Which epilepsies respond? *Epilepsia* **2012**, *53*, 55–59. [CrossRef] [PubMed]
11. Dressler, A.; Trimmel-Schwahofer, P.; Reithofer, E.; Mühlebner, A.; Gröppel, G.; Reiter-Fink, E.; Benninger, F.; Grassl, R.; Feucht, M. Efficacy and tolerability of the ketogenic diet in Dravet syndrome—Comparison with various standard antiepileptic drug regimens. *Epilepsy Res.* **2015**, *109*, 81–89. [CrossRef]
12. Caraballo, R.H.; Cersosimo, R.O.; Sakr, D.; Cresta, A.; Escobal, N.; Fejerman, N. Ketogenic diet in patients with Dravet syndrome. *Epilepsia* **2005**, *46*, 1539–1544. [CrossRef] [PubMed]
13. Eun, S.H.; Kang, H.C.; Kim, D.W.; Kim, H.D. Ketogenic diet for treatment of infantile spasms. *Brain Dev.* **2006**, *28*, 566–571. [CrossRef] [PubMed]
14. Hong, A.M.; Turner, Z.; Hamdy, R.F.; Kossoff, E.H. Infantile spasms treated with the ketogenic diet: Prospective single-center experience in 104 consecutive infants. *Epilepsia* **2010**, *51*, 1403–1407. [CrossRef] [PubMed]
15. Caraballo, R.H.; Cersosimo, R.O.; Sakr, D.; Cresta, A.; Escobal, N.; Fejerman, N. Ketogenic diet in patients with myoclonic-astatic epilepsy. *Epileptic Disord.* **2006**, *8*, 151–155. [PubMed]
16. Kilaru, S.; Bergqvist, A.G. Current treatment of myoclonic astatic epilepsy: Clinical experience at the children's hospital of Philadelphia. *Epilepsia* **2007**, *48*, 1703–1707. [CrossRef]
17. Kossoff, E.H.; Thiele, E.A.; Pfeifer, H.H.; McGrogan, J.R.; Freeman, J.M. Tuberos sclerosis complex and the ketogenic diet. *Epilepsia* **2005**, *46*, 1684–1686. [CrossRef]
18. Millichap, J.J.; Millichap, J.G. Ketogenic diet as preferred treatment of FIRES. *Pediatr. Neurol. Briefs* **2015**, *29*, 3. [CrossRef]
19. Nabbout, R.; Mazzuca, M.; Hubert, P.; Peudennier, S.; Allaire, C.; Flurin, V.; Aberastury, M.; Silva, W.; Dulac, O. Efficacy of ketogenic diet in severe refractory status epilepticus initiating fever induced refractory epileptic encephalopathy in school age children (FIRES). *Epilepsia* **2010**, *51*, 2033–2037. [CrossRef]
20. Klepper, J.; Leiendecker, B. Glut1 deficiency syndrome and novel ketogenic diets. *J. Child Neurol.* **2013**, *28*, 1045–1048. [CrossRef]
21. Sofou, K.; Dahlin, M.; Hallböök, T.; Lindefeldt, M.; Viggedal, G.; Darin, N. Ketogenic diet in pyruvate dehydrogenase complex deficiency: Short- and long-term outcomes. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2017**, *40*, 237–245. [CrossRef]
22. Kang, H.C.; Chung, D.E.; Kim, D.W.; Kim, H.D. Early and late-onset complications of the ketogenic diet for intractable epilepsy. *Epilepsia* **2004**, *45*, 1116–1123. [CrossRef] [PubMed]
23. Muscogiuri, G.; Barrea, L.; Laudisio, D.; Pugliese, G.; Salzano, C.; Savastano, S.; Colao, A. The management of very low-calorie ketogenic diet in obesity clinic: A practical guide. *J. Transl. Med.* **2019**, *17*, 356. [CrossRef] [PubMed]
24. 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.* **2006**, *48*, 978–981. [CrossRef] [PubMed]
25. Coppola, G.; Epifanio, G.; Auricchio, G.; Federico, R.R.; Resicato, G.; Pascotto, A. Plasma free carnitine in epilepsy children, adolescents and young adults treated with old and new antiepileptic drugs with or without ketogenic diet. *Brain Dev.* **2006**, *28*, 358–365. [CrossRef]
26. Berry-Kravis, E.; Booth, G.; Sánchez, A.C.; Woodbury-Kolb, J. Carnitine levels and the ketogenic diet. *Epilepsia* **2001**, *42*, 1445–1451. [CrossRef]



27. Couch, S.C.; Schwarzman, F.; Carroll, J.; Koenigsberger, D.; Nordli, D.R.; Deckelbaum, R.J.; DeFelice, A.R. Growth and nutritional outcomes of children treated with the ketogenic diet. *J. Am. Diet Assoc.* **1999**, *99*, 1573–1575. [CrossRef]
28. Liu, Y.M.; 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. [CrossRef]
29. Peterson, S.J.; Tangney, C.C.; Pimentel-Zablah, E.M.; Hjelmgren, B.; Booth, G.; Berry-Kravis, E. Changes in growth and seizure reduction in children on the ketogenic diet as a treatment for intractable epilepsy. *J. Am. Diet Assoc.* **2005**, *105*, 718–725. [CrossRef]
30. Spulber, G.; Spulber, S.; Hagenas, L.; Amark, P.; Dahlin, M. Growth dependence on insulin-like growth factor-1 during the ketogenic diet. *Epilepsia* **2009**, *50*, 297–303. [CrossRef]
31. Vining, E.P.; Pyzik, P.; McGrogan, J.; Hladky, H.; Anand, A.; Kriegler, S.; Freeman, J.M. Growth of children on the ketogenic diet. *Dev. Med. Child Neurol.* **2008**, *44*, 796–802. [CrossRef]
32. Ferraris, C.; Guglielmetti, M.; Pasca, L.; De Giorgis, V.; Ferraro, O.E.; Brambilla, I.; Leone, A.; De Amicis, R.; Bertoli, S.; Veggiotti, P.; et al. Impact of the Ketogenic Diet on Linear Growth in Children: A Single-Center Retrospective Analysis of 34 Cases. *Nutrients* **2019**, *11*, 1442. [CrossRef] [PubMed]
33. Svedlund, A.; Hallböök, T.; Magnusson, P.; Dahlgren, J.; Swolin-Eide, D. Prospective study of growth and bone mass in Swedish children treated with the modified Atkins diet. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* **2019**, *23*, 629–638. [CrossRef]
34. World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations, United Nations University. Human Energy Requirements. Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation, Rome, Italy, 17–24 October 2001. 2004. Available online: [www.fao.org/ag/agn/nutrition/requirements\\_pubs\\_en.stm](http://www.fao.org/ag/agn/nutrition/requirements_pubs_en.stm) (accessed on 15 July 2019).
35. Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation on Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition (2002: Geneva, Switzerland). *Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition: Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation*; WHO Technical Report Series; no. 935; WHO Press: Geneva, Switzerland, 2007.
36. Armeno, M.; Caraballo, R.; Vaccarezza, M.; Alberti, M.J.; Ríos, V.; Galicchio, S.; de Grandis, E.S.; Mestre, G.; Escobal, N.; Matarrese, P.; et al. Consenso nacional sobre dieta cetogénica. *Rev. Neurol.* **2014**, *59*, 213–223. [CrossRef] [PubMed]
37. Holliday, M.A.; Segar, W.E. Maintenance need for water in parenteral fluid therapy. *Pediatrics* **1957**, *19*, 823. [CrossRef]
38. Huttenlocher, P.R. Ketonaemia and seizures: Metabolic and anticonvulsant effects of two ketogenic diets in childhood epilepsy. *Pediatr. Res.* **1976**, *10*, 536–540. [CrossRef]
39. WHO/The WHO Child Growth Standards. WHO. Available online: <http://www.who.int/childgrowthstandards/en/> (accessed on 3 June 2019).
40. WHO/Growth Reference Data for 5–19 Years [Internet]. WHO. Available online: <https://www.who.int/growthref/en/> (accessed on 3 June 2019).
41. World Health Organization. International Classification of Diseases 11th Revision-Beta Browser [Internet]. Available online: <http://apps.who.int/classifications/icd11/browse/l-m/en> (accessed on 3 June 2019).
42. Sivaraju, A.; Nussbaum, I.; Cardoza, C.S.; Mattson, R.H. Substantial and sustained seizure reduction with ketogenic diet in a patient with Ohtahara syndrome. *Epilepsy Behav. Case Rep.* **2015**, *3*, 43–45. [CrossRef]
43. Seo, J.H.; Lee, Y.M.; Lee, J.S.; Kim, S.H.; Kim, H.D. A case of Ohtahara syndrome with mitochondrial respiratory chain complex I deficiency. *Brain Dev.* **2010**, *32*, 253–257. [CrossRef] [PubMed]
44. Kang, H.C.; Lee, Y.M.; Kim, H.D.; Lee, J.S.; Slama, A. Safe and effective use of the ketogenic diet in children with epilepsy and mitochondrial respiratory chain complex defects. *Epilepsia* **2007**, *48*, 82–88. [CrossRef]
45. Caraballo, R.; Vaccarezza, M.; Cersósimo, R.; Ríos, V.; Soraru, A.; Arroyo, H.; Agosta, G.; Escobal, N.; Demartini, M.; Maxit, C.; et al. Long-term followup of the ketogenic diet for refractory epilepsy: Multicenter Argentinean experience in 216 pediatric patients. *Seizure* **2011**, *20*, 640–645. [CrossRef] [PubMed]
46. Kossoff, E.H.; Pyzik, P.L.; Furth, S.L.; Hladky, H.D.; Freeman, J.M.; Vining, E.P. Kidney stones, carbonic anhydrase inhibitors, and the ketogenic diet. *Epilepsia* **2002**, *43*, 1168–1171. [CrossRef] [PubMed]
47. Sampath, A.; Kossoff, E.H.; Furth, S.L.; Pyzik, P.L.; Vining, E.P. Kidney stones and the ketogenic diet: Risk factors and prevention. *J. Child Neurol.* **2007**, *22*, 375–378. [CrossRef] [PubMed]

48. Furth, S.L.; Casey, J.C.; Pyzik, P.L.; Neu, A.M.; Docimo, S.G.; Vining, E.P.; Freeman, J.M.; Fivush, B.A. Risk factors for urolithiasis in children on the ketogenic diet. *Pediatr. Nephrol.* **2000**, *15*, 125–128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. McNally, M.A.; Pyzik, P.L.; Rubenstein, J.E.; Hamdy, R.F.; Kossoff, E.H. Empiric use of oral potassium citrate reduces symptomatic kidney stone incidence with the ketogenic diet. *Pediatrics* **2009**, *124*, e300–e304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Guzel, O.; Yilmaz, U.; Uysal, U.; Arslan, N. The effect of olive oil-based ketogenic diet on serum lipid levels in epileptic children. *Neurol. Sci.* **2016**, *37*, 465–470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Kwiterovich, P.O.; Vining, E.P.; Pyzik, P.; Skolasky, R.; Freeman, J.M. Effect of a high-fat ketogenic diet on plasma levels of lipids, lipoproteins, and apolipoproteins in children. *JAMA* **2003**, *290*, 912–920. [[CrossRef](#)]
52. Heussinger, N.; Della Marina, A.; Beyerlin, A.; Leiendecker, B.; Hermann-Alves, S.; Dalla Pozza, R.; Klepper, J. 10 patients, 10 years—Long term follow-up of cardiovascular risk factors in Glut1 deficiency treated with ketogenic diet therapies: A prospective, multicenter case series. *Clin. Nutr.* **2018**, *37*, 2246–2251. [[CrossRef](#)]
53. Stevens, C.E.; Turner, Z.; Kossoff, E.H. Hepatic dysfunction as a complication of combined ketogenic diet and valproic acid. *Pediatr. Neurol.* **2016**, *54*, 82–84. [[CrossRef](#)]
54. 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 diets. *Pediatrics* **2008**, *122*, e334–e340. [[CrossRef](#)]
55. Williams, S.; Basualdo-Hammond, C.; Curtis, R.; Schuller, R. Growth retardation in children with epilepsy on the ketogenic diet: A retrospective chart review. *J. Am. Diet Assoc.* **2002**, *102*, 405–407. [[CrossRef](#)]
56. Groleau, V.; Schall, J.I.; Stallings, V.A.; Bergqvist, C.A. Long-term impact of the ketogenic diet on growth and resting energy expenditure in children with intractable epilepsy. *Dev. Med. Child Neurol.* **2014**, *56*, 898–904. [[CrossRef](#)]
57. Kim, J.T.; Kang, H.C.; Song, J.E.; Lee, M.J.; Lee, Y.J.; Lee, E.J.; Lee, J.S.; Kim, H.D. Catch-up growth after long-term implementation and weaning from ketogenic diet in pediatric epileptic patients. *Clin. Nutr.* **2013**, *32*, 98–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Bergqvist, A.G.; Schall, J.I.; Stallings, V.A. Vitamin D status in children with intractable epilepsy, and impact of the ketogenic diet. *Epilepsia* **2007**, *48*, 66–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Christodoulides, S.S.; Neal, E.G.; Fitzsimmons, G.; Chaffe, H.M.; Jeanes, Y.M.; Aitkenhead, H.; Cross, J.H. The effect of the classical and medium chain triglyceride ketogenic diet on vitamin and mineral levels. *J. Hum. Nutr. Diet* **2012**, *25*, 16–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Arslan, N.; Kose, E.; Guzel, O. The effect of ketogenic diet on serum selenium levels in patients with intractable epilepsy. *Biol. Trace Elem. Res.* **2017**, *178*, 1–6. [[CrossRef](#)]
61. Bergqvist, A.G.; Chee, C.M.; Lutchka, L.; Rychik, J.; Stallings, V.A. Selenium deficiency with cardiomyopathy: A complication of the ketogenic diet. *Epilepsia* **2003**, *44*, 618–620. [[CrossRef](#)]
62. Kossoff, E.H.; Zupec-Kania, B.A.; Auvin, S.; Ballaban-Gil, K.R.; Christina Bergqvist, A.G.; Blackford, R.; Buchhalter, J.R.; Caraballo, R.H.; Cross, J.H.; Dahlin, M.G.; et al. Optimal clinical management of children receiving dietary therapies for epilepsy: Updated recommendations of the International Ketogenic Diet Study Group. *Epilepsia Open* **2018**, *3*, 175–192. [[CrossRef](#)]
63. Veggiotti, P.; De Giorgis, V. Dietary treatments and new therapeutic perspective in GLUT1 deficiency syndrome. *Curr. Treat Options Neurol.* **2014**, *16*, 291. [[CrossRef](#)]
64. Leen, W.G.; Taher, M.; Verbeek, M.M.; Kamsteeg, E.J.; van de Warrenburg, B.P.; Willemsen, M.A. GLUT1 deficiency syndrome into adulthood: A follow-up study. *J. Neurol.* **2014**, *261*, 589–599. [[CrossRef](#)]
65. Patel, A.; Pyzik, P.L.; Turner, Z.; Rubenstein, J.E.; Kossoff, E.H. Long-term outcomes of children treated with the ketogenic diet in the past. *Epilepsia* **2010**, *51*, 1277–1282. [[CrossRef](#)]



## **7.2 SEGUNDO ARTÍCULO: CLASSIC KETOGENIC DIET AND MODIFIED ATKINS DIET IN SLC2A1 POSITIVE AND NEGATIVE PATIENTS WITH SUSPECTED GLUT1 DEFICIENCY SYNDROME: A SINGLE CENTER ANALYSIS OF 18 CASES.**

### **7.2.1 PRESENTACIÓN DEL ARTÍCULO**

#### **Autores:**

1. Jana Ruiz Herrero
2. Elvira Cañedo Villarroya
3. Luis González Gutiérrez-Solana
4. Beatriz García Alcolea
5. Begoña Gómez Fernández
6. Laura Andrea Puerta Macfarland
7. Consuelo Pedrón-Giner

**Revista:** Nutrients. ISSN 2072-6643.

Factor de impacto año 2020: 5,717. Factor de impacto de los últimos 5 años: 6,349.

#### **Referencia completa:**

Ruiz Herrero J, Cañedo Villarroya E, González Gutiérrez-Solana L, García Alcolea B, Gómez Fernández B, Puerta Macfarland LA, Pedrón-Giner C. **Classic Ketogenic Diet and Modified Atkins Diet in SLC2A1 Positive and Negative Patients with Suspected GLUT1 Deficiency Syndrome: A Single Center Analysis of 18 Cases.** Nutrients 2021; 13(3):840. Doi:10.3390/nu13030840.

## 7.2.2 ARTÍCULO PUBLICADO



Article

## Classic Ketogenic Diet and Modified Atkins Diet in SLC2A1 Positive and Negative Patients with Suspected GLUT1 Deficiency Syndrome: A Single Center Analysis of 18 Cases

Jana Ruiz Herrero <sup>1,\*</sup>, Elvira Cañedo Villarroya <sup>2</sup>, Luis González Gutiérrez-Solana <sup>3,4</sup>, Beatriz García Alcolea <sup>2</sup>, Begoña Gómez Fernández <sup>2</sup>, Laura Andrea Puerta Macfarland <sup>2</sup> and Consuelo Pedrón-Giner <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Pediatric Gastroenterology, Pediatric Service, San Rafael Hospital, 28016 Madrid, Spain

<sup>2</sup> Department of Gastroenterology and Nutrition, University Children's Hospital Niño Jesús, 28009 Madrid, Spain; elviracaedo@yahoo.es (E.C.V.); bgarciaa@salud.madrid.org (B.G.A.); bgomez@salud.madrid.org (B.G.F.); laura.puertamac@yahoo.es (L.A.P.M.); consuelocarmen.pedron@salud.madrid.org (C.P.-G.)

<sup>3</sup> Department of Neurology, University Children's Hospital Niño Jesús, 28009 Madrid, Spain; luisggsolana@hotmail.com

<sup>4</sup> Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Health Institute Carlos III, 28029 Madrid, Spain

\* Correspondence: jana.ruizherrero@hotmail.com; Tel.: +34-915-035-933



**Citation:** Ruiz Herrero, J.; Cañedo Villarroya, E.; González Gutiérrez-Solana, L.; García Alcolea, B.; Gómez Fernández, B.; Puerta Macfarland, L.A.; Pedrón-Giner, C. Classic Ketogenic Diet and Modified Atkins Diet in SLC2A1 Positive and Negative Patients with Suspected GLUT1 Deficiency Syndrome: A Single Center Analysis of 18 Cases. *Nutrients* **2021**, *13*, 840. <https://doi.org/10.3390/nu13030840>

Academic Editor: Marcellino Monda

Received: 15 January 2021

Accepted: 26 February 2021

Published: 4 March 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Background: Glucose transporter type 1 deficiency syndrome (GLUT1DS) is caused by mutations in the SLC2A1 gene and produces seizures, neurodevelopmental impairment, and movement disorders. Ketogenic dietary therapies (KDT) are the gold standard treatment. Similar symptoms may appear in SLC2A1 negative patients. The purpose is to evaluate the effectiveness of KDT in children with GLUT1DS suspected SLC2A1 (+) and (-), side effects (SE), and the impact on patients nutritional status. Methods: An observational descriptive study was conducted to describe 18 children (January 2009–August 2020). SLC2A1 analysis, seizures, movement disorder, anti-epileptic drugs (AEDS), anthropometry, SE, and laboratory assessment were monitored baseline and at 3, 6, 12, and 24 months after the onset of KDT. Results: 6/18 were SLC2A1(+) and 13/18 had seizures. In these groups, the age for debut of symptoms was higher. The mean time from debut to KDT onset was higher in SLC2A1(+). The modified Atkins diet (MAD) was used in 12 (5 SLC2A1(+)). Movement disorder improved (4/5), and a reduction in seizures >50% compared to baseline was achieved in more than half of the epileptic children throughout the follow-up. No differences in effectiveness were found according to the type of KDT. Early SE occurred in 33%. Long-term SE occurred in 10, 5, 7, and 5 children throughout the follow-up. The most frequent SE were constipation, hypercalciuria, and hyperlipidaemia. No differences in growth were found according to the SLC2A1 mutation or type of KDT. Conclusions: CKD and MAD were effective for SLC2A1 positive and negative patients in our cohort. SE were frequent, but mild. Permanent monitoring should be made to identify SE and nutritional deficits.

**Keywords:** GLUT1 deficiency syndrome; SLC2A1 gene; ketogenic diet; pediatric epilepsy; refractory epilepsy; movement disorder

### 1. Introduction

The main fuel for the human brain is glucose, and Glut-1 is the major glucose transporter expressed on the blood-brain barrier. The glucose transporter type 1 deficiency syndrome (GLUT1DS) was first described by De Vivo in 1991 [1] and consists of an in-born metabolic disease caused by the absence or loss of function of the Glut-1 protein

coded in the SLC2A1 gene on chromosome 1 [2]. Hypoglycorrhachia in the setting of normoglycemia and low-to-normal cerebrospinal fluid lactate is the main biochemical disturbance. The classic phenotype consists in a developmental encephalopathy with seizures (usually refractory epilepsy), acquired microcephaly, and movement disorders. Atypical phenotypes without seizures have been described in recent years (i.e., complex movement disorders or paroxysmal episodes triggered by fasting or exercise) [3,4]. In addition, 5–10% of patients suffer similar symptoms and biochemical disturbances without the SLC2A1 gene mutation [5]. In these patients, an extended genetic testing may discover disturbances in other genes.

The current gold standard treatment for GLUT1DS are ketogenic dietary therapies (KDT), especially the classic ketogenic diet (CKD) [6]. CKD is a high fat and low carbohydrate diet that provides ketones as an alternative fuel to the brain. In the CKD, 87–90% of daily caloric intake comes from fat sources [7]. The provision of carbohydrates and proteins vary within ratios of 3:1 to 4:1 (3–4 g of fat to 1 g of carbohydrates plus protein). CKD reduces seizures and movement disorders, and it should be used lifelong [4]. However, side effects are common, and compliance is difficult. Other types of KDT have been used. The modified Atkins diet (MAD) allows an unrestricted amount of protein and fat, but does restrict carbohydrate intake to 10 g/day. The compliance is easier, and it has fewer side effects. MAD has been used for refractory epilepsy with good results. The use of MAD in GLUT1DS has been published recently showing promising results [8–10].

The aim of this paper was to assess the efficacy and side effects of KDT for the treatment of SLC2A1 positive and negative children with suspected GLUT1DS, and to establish the differences between MAD and CKD in efficiency, adverse effects, and nutritional status.

## 2. Materials and Methods

Data of all pediatric patients (<18 years old) who had been prescribed a KDT to treat a confirmed or suspected GLUT1DS in a tertiary care level hospital between January 2009 and August 2020 were collected. A GLUT1DS was suspected in patients with seizures or movement disorders associated with hypoglycorrhachia. The diagnosis was confirmed when SLC2A1 mutations were found.

It is a retrospective and prospective (since May 2015) observational descriptive study approved by the Committee for Ethics in Clinical Research of the University Children's Hospital Niño Jesús (project identification code R-0002/15, date of approval 25 February 2015). Patients or their relatives were informed of the aims of the research and signed an informed consent. All data were collected anonymously. Full medical histories were reviewed to collect epidemiological data, symptoms, genetic disorders, and treatments used before the diet's implementation.

CKD was indicated for patients younger than 3 years or with severe epilepsy. MAD was selected for children older than 3 years. Both types of KDT were introduced slowly, increasing the ketogenic ratio progressively, adjusting according to the patient's tolerance and the appearance of adverse effects, without fasting or liquid restriction. We started KDT as an inpatient regime when a CKD was selected, the patient was <2 years, or the child did not live in proximity to medical care. The hospital admission provided more time to teach the caregivers, monitor ketosis, and manage side effects. We started KDT as an outpatient when a MAD was selected, the patient was >2 years and the family had been previously trained in diet management and could easily access the hospital in case of side effects. Nutrition expert nurses designed the diets and trained the caregivers in meal preparation and management of side effects. The recommendations of the World Health Organization (WHO) based on age and weight were used to estimate energy and protein requirements. Protein intake was calculated according to daily protein recommendations (generally 1 g per kilo per day in children over 1 year and 1.5 in children under 1). We used the Holliday and Segar method [11] to estimate minimum fluids requirements, although we always prescribed at least the WHO recommendation or more to decrease some adverse effects of the diet such as constipation, acidosis, dehydration, or hypercalciuria. CKD was

started as a 1:1 ratio. The next day, the ratio was increased to 2:1, and the next day to 3:1. If tolerance was not good or adverse effects appeared, the ratio was lowered again and then we tried to reach the 3:1 ratio more slowly. Infants younger than 6 months were on a liquid diet based on Ketocal<sup>®</sup>. Older infants and children were on a diet based on natural foods supplemented with a fat emulsion consisting of MCT (Liquigen<sup>®</sup> or MCT Oil Nutricia<sup>®</sup>) or with powders or liquids rich in lipids and low in carbohydrates, based on whey protein supplemented with amino acids and micronutrients (Ketocal<sup>®</sup>). For the onset of MAD, the reduction of carbohydrates in the diet was first recommended. The caregivers were then given a list of foods indicating how many grams of carbohydrates they contained, the amount of carbohydrates the patient had to eat each day, and sample menus. In addition, they were recommended to supplement the diet with specific formulas (Ketocal<sup>®</sup>) to achieve a 0.8–1.1 ratio. Caregivers had written information about the menus, the glycemia and ketonemia controls that they should carry out, the management of adverse effects, and the drugs that they could use in case of common illness in childhood such as fever or respiratory infections and that they do not affect ketosis. Families could also make telephone inquiries in case of doubts. The caregivers were instructed to perform urine ketone tests every 8 h during the first days of the diet. Glycemia and beta-hydroxybutyrate were also monitored using test strips. These controls were carried out once or twice a day during the first weeks. Once a stable situation was reached, controls were carried out 3–4 times a week. The frequency of the controls was increased when the patients suffered secondary effects or associated diseases.

All patients underwent a thorough examination before KDT and then after the 1st, 3rd, 6th, 12th month, and then yearly. In each medical examination, possible side effects were accounted for. Weight, height, head circumference, and body mass index (BMI) were analyzed. Parameters were adjusted by sex and age according to the growth charts of the WHO (except head circumference in children older than 2 years, for whom the Spanish charts were used). Laboratory assessment included complete blood count, biochemical and lipid profiles, gasometry, ions, urinary sediment and calcium, protein, and citrate/creatinine ratios, prealbumin and retinol binding protein (RBP), vitamins A, E, D, B12, B9, zinc, selenium, carnitine, and parathormone (PTH).

Two groups were compared according to the SLC2A1 mutation (SLC2A1 (+) or (-)-group) and according to symptoms (the epilepsy group or movement disorder group). The effectiveness was measured by the reduction in number of seizure (100% (seizure freedom), 90–100% improvement, 50–90%, <50%, 0% (no improvement), or an increase in the number of seizures) and anti-epileptic drugs (AEDS) in the epilepsy group, and by a reduction in the intensity and frequency of movement disorder.

Variables were registered in an Excel program table. All statistical analyses were carried out with SPSS version 16.0. Wilcoxon signed-rank test was used to compare the z-score values for weight, height, and BMI, and blood and urine markers, at baseline and throughout the follow-up intervals. The Mann–Whitney test was used to compare the effects of the different KDT on blood and urine markers. Fisher's exact test was used to compare the efficiency according to the type of KDT, and two groups were compared based on the existence of the SLC2A1 mutations and type of symptoms (seizures versus movement disorder).

### 3. Results

The characteristics of the 18 patients recruited are shown in Table 1. SLC2A1 mutations (SLC2A1(+)) were found in six patients (33.3%), five had seizures, and one had exercise-induced paroxysmal dyskinesia. Two patients had de novo deletions on chromosome 1 (130 Kb and 1.69 Mb, respectively) that affected the SLC2A1 gene. A heterozygous pathogenic variant in SLC2A1 was identified in three children. One was de novo mutation c.388G > A (p.Gly130Ser). In the other two patients, the same mutation was found in relatives: c.823G > A (p.Ala275Thr) was found in an asymptomatic brother and in the asthenic mother; and c.1232A > G (p.Ans411Ser) was identified in the

asymptomatic mother. In one patient who was followed in the neurology department of another center, the specific mutation of the SLC2A1 gene was not registered in the medical record. Twelve patients were SLC2A1(-). Disturbances in other genes were found in six, and 4/6 had epilepsy. A one-year-old girl started with myoclonic seizures related to the mutation c.2813G > A (p.Arg938His) in GRIN2B (glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B). Alterations in GRIN2B may cause intellectual disability, epilepsy, autism, and sometimes microcephaly, movement disorder, cortical visual impairment, and occasionally cortical developmental malformation. A boy had a neonatal epileptic encephalopathy with generalized tonic-clonic seizures associated with the heterozygous mutation c.619C > T (p.Arg207Trp) in KCNQ2 (potassium voltage-gated channel subfamily Q member 2). Mutations in KCNQ2 can cause neonatal seizures to severe neonatal epileptic encephalopathy. A two-year-old girl began with absences related to the de novo mutation c.T277delGC (p.Ala93Glyfs\*113) in SLC6A1 (Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 1). SLC6A1 mutations may produce cognitive impairment and epilepsy. The most common seizures are absences, myoclonic, and atonic seizures. GRIN2B-, KCNQ2-, and SLC6A1-related disorders are inherited in an autosomal dominant manner. A one-year-old boy debuted with focal epilepsy due to a de novo mutation in chromosome Xq26.3, which led to disturbances in SLC9A6 (solute carrier family 9 member A6) associated with Christianson syndrome (intellectual disability, epilepsy, ataxia, and postnatal microcephaly). The remaining two children were a girl with the de novo mutation c.965T > C (Ile322Thr) in NALCN (sodium leak channel, non-selective) associated with CLIFAHDD syndrome (congenital contractures of the limbs and face with hypotonia and developmental delay syndrome) who debuted with a severe intellectual disability, dystonia, and ataxia at the age of one; and a boy who had a complex movement disorder with a predominance of intentional and postural tremor and had the heterozygous pathogenic variant 619C > T (p.Arg207Trp) in NKX2-1 (NK2 homeobox 1). NKX2-1-disorders are associated with choreoathetosis and hypothyroidism.

**Table 1.** Demographic and clinical characteristics of the patients and the ketogenic dietary therapies (KDT) in the study.

	Patients on a KDT (n = 18)
Sex	Males, 8 (55.6%) Females, 10 (44.4%)
Median z-score of baseline head circumference (IQR)	−0.5 (−1.9–0.47)
Median age at the onset of symptoms (range)	14 months (4 days to 7 years and 8 months)
Seizure (n = 13)	Myoclonic, 5 (41.6%) Typical absences, 3 (25%) Various, 2 (16.6%) Focal onset, 1 (8.3%) Generalized tonic-clonic, 1(8.3%) Clonic, 1 (8.3%)
Movements disorders (n = 5)	Paroxysmal exercise-induced dyskinesias, 1 Dystonia and nystagmus, 1 Dystonia and ataxia, 1 Paroxysmal eye movements, 1 Complex movement disorder with a predominance of intentional and postural tremor, 1
Median age at the onset of KDT (range)	5 years and 2 months (3.5 months to 17 years and 4 months)

Table 1. Cont.

	Patients on a KDT (n = 18)
Age at the onset of KDT	Infant, 2 (11%)
	1–2 years, 2 (11%)
	2–5 years, 5 (28%)
	5–10 years, 6 (33%)
	>10 years, 3 (17%)
Median time from debut to the onset of KDT (range)	3 year and 1 month (49 days to 13 years and 4 months)
Type of KDT	Classic ketogenic diet (CKD) 3:1, 6 (33.3%) Modified Atkins diet (MAD), 12 (66.7%)
Median time to reach ketosis (range)	3.8 days (2–9 days)
Median length of KDT (IQR)	463 days (170–1863 days)
Reasons for withdrawing KDT (n = 10)	Difficulties in compliance, 3 (16.6%)
	Loss of clinical follow-up, 3 (16.6%)
	Ineffectiveness, 1 (5.55%)
	Adverse effects, 1 (5.55%)
	Length of KDT >2 years, 1 (5.55%) Other, 1 (5.55%)

IQR: interquartile range. KDT: ketogenic dietary therapies.

Median age at debut was lower in the SLC2A1(+)-group ( $1.7 \pm 1.7$  versus  $2.2 \pm 2.2$  years), and in the epilepsy group ( $1.8 \pm 1.5$  versus  $2.7 \pm 3.2$  years). The mean of cerebrospinal fluid to the blood glucose ratio was 0.45 (0.24–0.61). This ratio was lower in the SLC2A1(+)-group ( $0.39 \pm 0.1$  versus  $0.49 \pm 0.09$ ). These differences were not statistically significant.

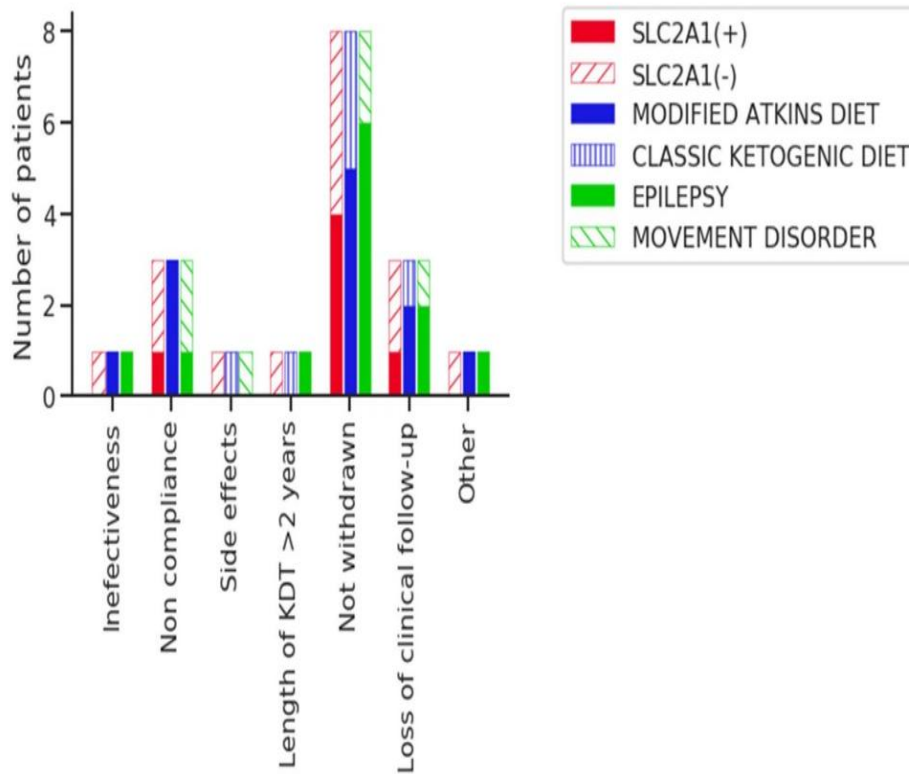
Almost one third of the children did not have seizures (Table 1), and 13 had developmental delay or a cognitive disability. The mean of baseline seizures in the epilepsy group was 3/day, and 9/13 children had seizures daily. The mean of AEDS used in the epilepsy group was 3.8 (range 1–8), and 12/13 children with seizures had been treated with at least 2 AEDS before the onset of KDT. The most often tested AEDS before KDT were: Valproic acid (12/13), levetiracetam (8/13), clobazam (6/13), and lamotrigine (6/13). Just before starting the diet, only three patients were taking only one AEDS. One patient was on a KDT previously, but it was withdrawn due to the side effects and loss of efficiency. Three patients did not improve with other treatments (coenzyme Q, vitamin C, and riboflavin; vitamin B6 and adrenocorticotrophic hormone; vitamin B6).

The characteristics of KDT are shown in Table 1. Although the differences were not statistically significant, the median age at the onset of KDT was higher in SLC2A1(+)-group (8.8 versus 4.9 years), and in the epilepsy group (4.5 versus 3.5 years). The median time from clinic debut to the onset of KDT was longer in the SLC2A1(+)-group (7.1 versus 2.7 years) ( $p = 0.039$ ). All diets were administered orally. MAD was used in 5/6 children SLC2A1(+) and 7/12 SLC2A1(-). All CKD were started in children younger than 3 years, except one SLC2A1 (-)-girl with CLIFAHDD syndrome who started a CKD in another hospital. All CKD were onset as an inpatient setting, and most MAD (8/12) began as an outpatient setting. One MAD was initiated in another center. Median age at the onset of KDT was 2 years and 3 months in the CKD group and 8 years and 3 months in the MAD group. In 3 SLC2A1(-)-patients, KDT were modified to improve compliance: 2 CKD switched to MAD (13 days and 17 months later), and 1 MAD switched to a low glycemic index treatment (after 19 months).

Ketosis ( $>2.4 \mu\text{mol/L}$ ) was reached in a mean of 3.8 days. No significant differences were found depending on the type of diet or the gene mutation in the time needed to reach ketosis. However, beta-hydroxybutyrate levels were higher in patients following a CKD at 3 months ( $p = 0.05$ ).

Eight patients are still on a KDT (44.4%). Reasons for withdrawal are in Table 1 and Figure 1.





**Figure 1.** Reasons for withdrawing ketogenic dietary therapies (KDT) according to the SLC2A1 gene mutation, type of KDT, and symptoms.

### 3.1. Outcome of the KDT

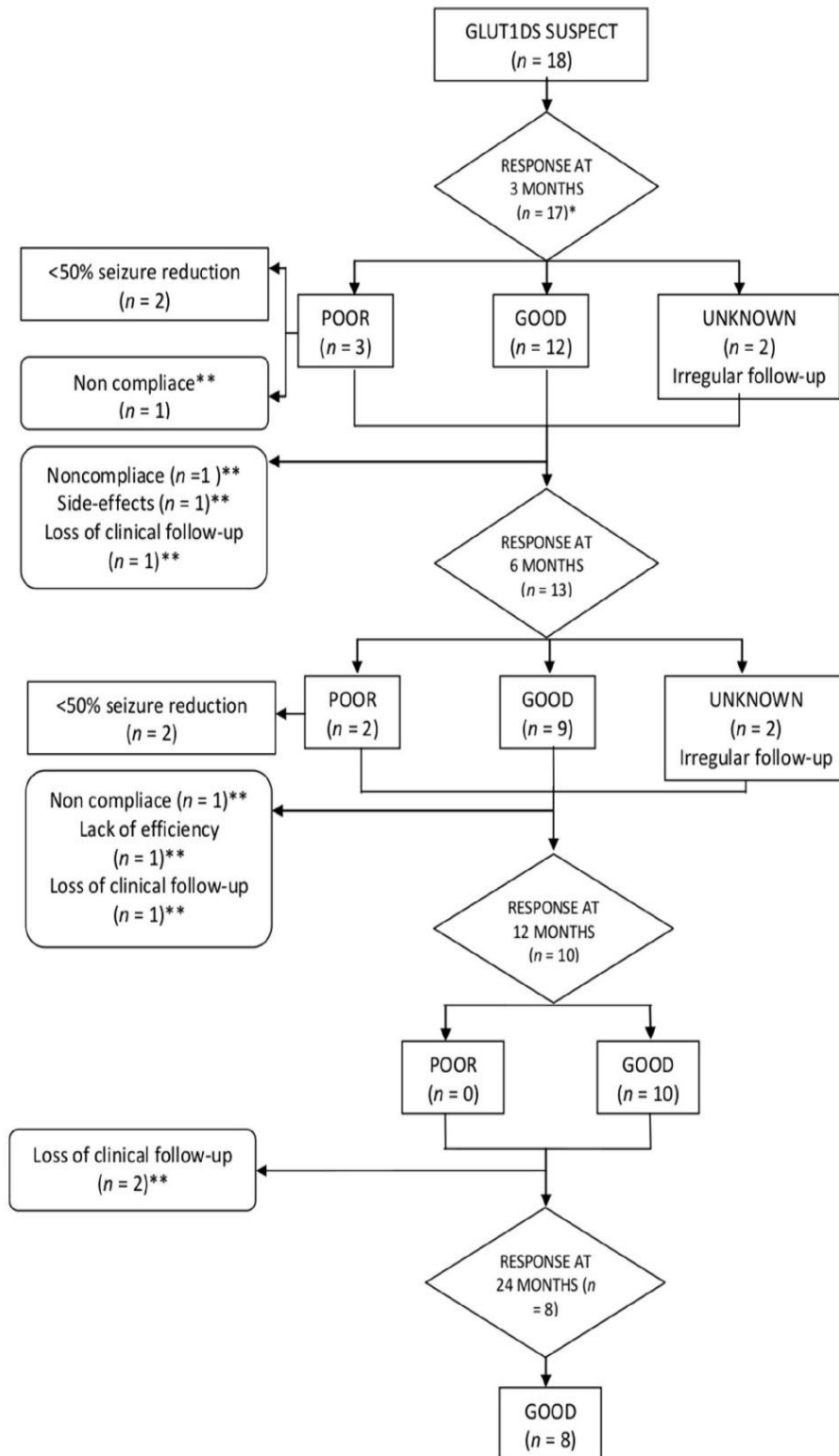
Figure 2 represents the flow chart with the evolution of the patients of the study. Patients who responded to the KDT are shown in Figure 3.

In epilepsy group, seizure-free patients were 6, 5, 6, and 7, and subjects with a reduction in the number of AEDS were 3, 4, 3 and 2 at 3, 6, 12, and 24 months, respectively.

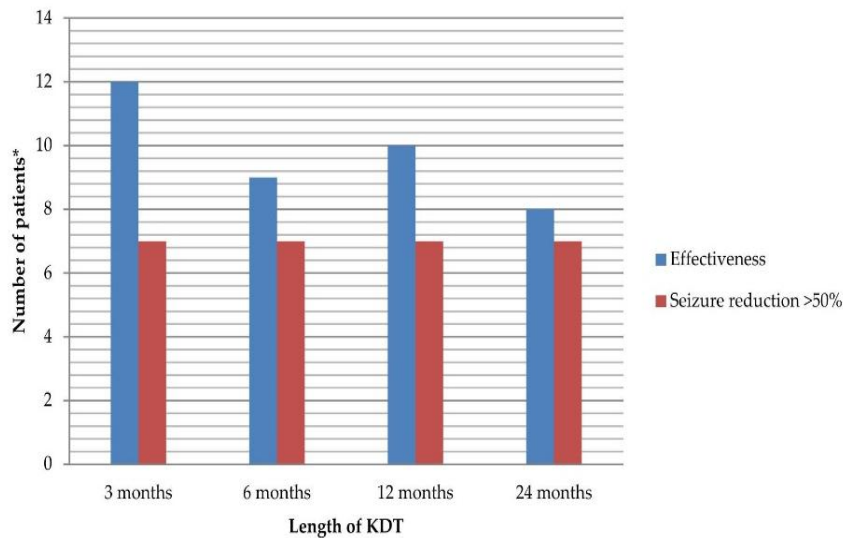
The mean of the AEDS taken by the patients was  $1.9 (\pm 0.8)$  at 3 months,  $1.5 (\pm 0.7)$  at 6 months,  $1.4 (\pm 0.9)$  at 12 months, and  $1.3 (\pm 1.2)$  at 24 months. Throughout the follow-up, 4, 5, 5, and 6 patients, at 3, 6, 12, and 24 months, respectively, were taking  $\leq 1$  AEDS. Seven patients with epilepsy were on a KDT for more than 2 years (3 SLC2A1(+)), all of them had 90–100% improvement, and 3 of them were on a KDT for 6 years or more.

In the movement disorder group ( $n = 5$ ), 4 children had a good response at 3 months. At 6 months, 2 patients were still on KDT (2 had the diet withdrawn, one due to non-compliance and one due to a high level of transaminases and the negative result of SLC2A1). Only one patient with a movement disorder due to the CLIFAHDD syndrome was still on a CKD, 6 years after the onset.

No significant differences were found in either in the reduction of seizures and AEDS, nor in the improvement of the movement disorder according to the type of KDT or SLC2A1 mutation.



**Figure 2.** Evolution of the patients of the study. \* One patient had not completed 3 months at the moment of the analysis. \*\* KDT withdrawn.



**Figure 3.** Global effectiveness and significant seizure reduction of the ketogenic dietary therapies (KDT) in patients with confirmed or suspected glucose transporter type 1 deficiency syndrome (GLUT1DS). \* Each column represents the total number of patients without distinguishing the type of diet. Total number of patients on KDT: 17 at 3 months, 13 at 6 months, 10 at 12 months, and 8 at 24 months.

### 3.2. Side Effects

Six children (33.3%) had early side effects (first month): Hypoglycemia with nausea/vomiting; asymptomatic hypoglycemia; drowsiness and hypercholesterolemia; carnitine deficiency; constipation; and metabolic acidosis and hypercalciuria. Long-term adverse effects are shown in Table 2. A higher risk of adverse effects was not found according to the type of diet, but significant differences were found in some blood and urine markers. The most clinically important were found in cholesterol (higher in patients on MAD at 3 months ( $p = 0.045$ )) and calciuria (higher at 3 months in patients on a CKD ( $p = 0.011$ )). Only one girl on a CKD with CLIFAHDD syndrome had nephrocalcinosis at 24 months.

**Table 2.** Long-term side effects in patients on a ketogenic dietary therapy.

Time on the Diet	3 Months (n = 17)	6 Months (n = 13)	12 Months (n = 10)	24 Months (n = 8)
Total of patients suffering side effects	10	5	7	5
Constipation	4	2	1	1
Abdominal pain	-	-	-	1
Nausea/vomiting	1	-	-	-
Anorexia	1	-	-	-
Dehydration	1	-	-	-
Hypoglycemia	1	-	-	-
Hypercholesterolemia <sup>1</sup>	4	2	3	2
Hypertriglyceridemia <sup>2</sup>	1	-	1	-
Elevated AST, ALT, or GGT <sup>3</sup>	1	-	-	-
Hypercalciuria <sup>4</sup>	3	2	3	1
Hyperuricemia <sup>5</sup>	-	-	1	3
Metabolic acidosis <sup>6</sup>	3	-	-	-

<sup>1</sup> Cholesterol > 200 mg/dl; <sup>2</sup> Triglycerides > 150 mg/dl; <sup>3</sup> AST: Aspartate aminotransferase > 50 IU/L, ALT: Alanine aminotransferase > 50 IU/L, GGT: Gamma glutamyl transpeptidase > 35 IU/L;

<sup>4</sup> Urinary calcium/creatinine > 0.2 mg/mg in children  $\geq 2$  years and > 0.5 in < 2 years; <sup>5</sup> Uric acid > 6 mg/dl; <sup>6</sup> pH < 7.30.

### 3.3. Nutritional Evolution

One patient was severely malnourished and two were baseline overweight. BMI was normal in most patients throughout the follow-up. Only one patient was severely malnourished at 12 months, and one child was overweight, and one was mildly malnourished at 24 months. Mild disturbances in height were found in one child baseline, and in 2 at 6 months, and 3 at 12 and 24 months. Baseline mean z-score (SD) of BMI and height were  $-0.26$  (1.6) and  $-0.63$  (1.1), respectively. Throughout the follow-up, mean z-score ( $\pm$ SD) of BMI was:  $-0.20$  (0.93),  $-0.30$  (0.99),  $-0.30$  (1.5), and  $0.03$  (1.4). Height data were:  $-0.65$  (0.64),  $-0.70$  (1.08),  $-1.2$  (1.6), and  $-1.3$  (1.5) at 3, 6, 12, and 24 months. No significant differences were found in anthropometric parameters throughout the follow-up compared to baseline, nor by the presence of the SLC2A1 gene mutation or the type of KDT.

Nutritional markers and micronutrients are shown in Table 3. At the baseline, the following nutrients were deficient: Vitamin D (3 patients), selenium (2), phosphorus (2), folic acid (1), and vitamin B12 (1). Throughout the follow-up, only two children had a vitamin A deficiency, one patient had a vitamin E deficit, and another one a vitamin D deficit. No significant differences were found in nutritional markers in blood except in phosphorus levels, which were significantly lower at 3 months ( $p = 0.007$ ) and at 12 months ( $p = 0.028$ ), compared to baseline.

**Table 3.** Evolution of nutritional markers and micronutrients.

Nutritional Markers in Blood	Lab Reference Values	Mean $\pm$ SD				
		Baseline	3 m	6 m	12 m	24 m
Prealbumin (mg/dL)	15–40	17.7 $\pm$ 3.5	16.2 $\pm$ 3.5	15.7 $\pm$ 1.9	15.3 $\pm$ 2.9	17.1 $\pm$ 3.6
Retinol binding protein (RBP) (mg/dL)	2.5–6.9	3.4 $\pm$ 1.2	1.41	1.4 $\pm$ 0.07	2.5 $\pm$ 0.7	2.5 $\pm$ 0.7
Ferritin (ng/mL)	7–140 (<15 y) 15–175 ( $\geq$ 15 y)	31 $\pm$ 19	48 $\pm$ 31	55 $\pm$ 31	52 $\pm$ 27	40 $\pm$ 21
<b>Micronutrients</b>						
Magnesium (mg/dL)	1.5–2.5	2.2 $\pm$ 0.28	2.0 $\pm$ 0.11	1.9 $\pm$ 0.1	2.0 $\pm$ 0.08	1.85 $\pm$ 0.13
Selenium ( $\mu$ g/L)	70–120	73 $\pm$ 8.6	-	76.4	89 $\pm$ 6.8	84.4 $\pm$ 9.0
Zinc ( $\mu$ g/dL)	70–150	107 $\pm$ 4.0	-	97	103 $\pm$ 18.8	103 $\pm$ 10.3
Total carnitine or Levocarnitine ( $\mu$ mol/L)	21.5–64.5	52 $\pm$ 23	-	70.5	61.9 $\pm$ 40.3	63 $\pm$ 25.4
Vitamin A (mg/L)	20–50	35 $\pm$ 2.5	-	48.6	34.8 $\pm$ 6.3	41 $\pm$ 13.4
Vitamin E (mg/L)	0.2–0.6	0.31 $\pm$ 0.08	-	0.21 $\pm$ 0.03	0.28 $\pm$ 0.08	0.27 $\pm$ 0.07
Folic acid (ng/mL)	3–9 (<12 y) 5–20 ( $\geq$ 12 y)	5.3 $\pm$ 1.2	-	3.53	6.0 $\pm$ 2.5	5.1 $\pm$ 1.4
Vitamin B12 (pg/mL)	3.9–23.9	11 $\pm$ 5.2	-	18.1 $\pm$ 9.2	20.6 $\pm$ 7.8	17 $\pm$ 4.6
25-hydroxyvitamin D (ng/mL)	250–914	715 $\pm$ 545	1023 $\pm$ 291	612 $\pm$ 9	636 $\pm$ 353	859 $\pm$ 504
Calcium (mg/dL)	20–80	33.3 $\pm$ 12.3	-	40 $\pm$ 6	36.5 $\pm$ 9.2	31 $\pm$ 10.0
Phosphorus (mg/dL)	8.8–10.8	9.6 $\pm$ 0.4	9.7 $\pm$ 0.4	9.5 $\pm$ 0.19	9.6 $\pm$ 0.2	9.6 $\pm$ 0.2
	4.5–6.5	5.4 $\pm$ 0.9	5.0 $\pm$ 0.6	4.8 $\pm$ 0.5	4.8 $\pm$ 0.7	4.0 $\pm$ 0.4

y: years; m: months.

Calcium at 3 months ( $p = 0.01$ ), and prealbumin ( $p = 0.05$ ) and folic acid ( $p = 0.025$ ) at 12 months, were significantly higher in patients on CKD.

## 4. Discussion

GLUT1DS is a rare metabolic disease and its clinical presentation is heterogeneous [3,12,13]. Among our patients, epilepsy was the most frequent symptom. Various types of seizures were described, as in other studies [14,15], but the most frequent were myoclonic seizures and absences. Almost a third of the patients in our study had a motor disorder. Dystonia and paroxysmal movements were the most frequent movement disorders in our cohort. In one case, paroxysmal movements were paroxysmal exertion-induced dystonia. A high clinical suspicion is necessary for diagnosis since early treatment is important, because those

patients who began KDT at a younger age had better outcomes [16,17]. When GLUT1DS is suspected, the SLC2A1 gene should be tested. However, some patients with compatible symptoms and a good response to treatment do not have mutations in SLC2A1 [2,18]. We used KDT in all our patients despite not having a definitive diagnosis because they had hypoglycorrhachia. Furthermore, the presence of a motor disorder increased the chances of being a GLUT1DS. On the other hand, almost all children with seizures had refractory epilepsy, and KDT should be considered when two AEDS have failed. In our cohort, only six patients with GLUT1DS suspected were finally confirmed, but most children benefited from KDT. The time from debut to the onset of the diet was greater than 3 years. This time was estimated to be more than 8 years in some papers [13,17]. The age at the onset of symptoms was lower in our patients with epilepsy and in the SLC2A1 (+)-group, and the time from debut to the onset of treatment was significantly higher. Most studies describe a delay of at least 4 years from debut to the onset of the diet [13,17,19]. Therefore, KDT should be onset when a GLUT1DS is suspected, although the definitive diagnosis is not made.

The current standard treatment for GLUT1DS are the KDT, especially the CKD [4,6,12,19,20]. Recent reviews have reported that 60% of the patients were seizure-free after the implementation of the diet, and 80% of patients with movement disorders improved [3,13]. In our cohort, 31–54% of patients with epilepsy were seizure-free, and 80% of patients with a movement disorder improved.

Although CKD is the most accepted treatment, two-thirds of our patients were treated with MAD, and no significant differences in efficiency were found according to the type of KDT. Several case reports describe the use of MAD [8,9,21,22], and Amalou and coworkers [10] evaluated the effectiveness of MAD in 10 patients with GLUT1DS: Epilepsy improved in all patients, and movement disorders also enhanced. Fujii et al. [23] presented the outcome of 39 patients with GLUT1DS. MAD and CKD were used respectively in 17 (55%) and 11 patients (35%), and both were effective on seizures and movement disorders. MAD may be as effective as CKD for the treatment of confirmed and suspected GLUT1DS according to our results and those of the authors mentioned [10,23].

When a GLUT1DS is confirmed, KDT should be used life-long. However, CKD is a very restricted diet, and non-compliance is a frequent reason for withdrawal, as reported a while ago [13] and recent [19] referring figures of 18%. Considering that MAD may be as effective as CKD, and that MAD is less restrictive, the type of KDT chosen should be individualized [24]. Curiously, the three patients who abandoned the diet due to difficulties in compliance in our study were on a MAD. A possible reason that justifies difficulties in compliance of MAD may be the age of the patients, since the mean age at the onset of MAD was higher. CKD is usually indicated for young children in whom it is easier to control the diet since it is based on liquid formulas or mashed foods. However, as the child grows, the child's tastes can cause difficult compliance. All children who withdrew the diet in our study due to non-compliance were older than 3 years. Another cause that can lead to poorer compliance is the non-confirmation of GLUT1DS, which occurred in 2 of the children.

The adverse effects of KDT are quite common. Digestive [25,26], hepatic [26], and kidney problems [27–29] can appear, but are generally mild and easy to manage. In our cohort CKD seems to be as safe as MAD. Dyslipidemia [30,31] and kidney stones [27–29] are some of the most relevant long-term side effects. Hypercholesterolemia was very frequent in our cohort, but no patients were treated with lipid-lowering drugs, and, although CKD has a higher fat content diet, cholesterol was significantly higher in children who were on a MAD in the first few months. Dyslipidemia and cardiovascular risk have been studied. Short-term effects (after 12 weeks) on body fat distribution in 10 children affected by GLUT1DS, showed no alteration in the abdominal fat distribution [32]. Long-term, Heussinger and co-authors [33] followed 10 children and observed that the initial dyslipidemia may be transient, and they concluded that KDT do not increase long-term cardiovascular risk. Hypercalciuria was also common, but only one case had nephrocalcinosis in our cohort. All children with hypercalciuria were treated with oral citrates that prevent

kidney stone formation [29], but may lead to bone mineral loss. It should be noted that urinary calcium/creatinine ratio was higher in patients on a CKD. Therefore, permanent monitoring of urine calcium/creatinine levels should be done in all patients on a KDT, but it is especially important in those on a CKD.

Deficits have been described in plasma levels of selenium, magnesium, carnitine, and vitamin D in patients with refractory epilepsy and KDT [34–36], but few studies have been performed in patients with GLUT1DS [37]. All our children took a carbohydrate-free multivitamin and mineral supplement from the beginning of the diet, as established in current guidelines [24]. Mild deficiencies in fat-soluble vitamins were found, and low phosphorus levels appeared in some patients. Frequent monitoring of nutritional markers and micronutrients in blood was important to detect these alterations early and prescribe other supplements when necessary.

The effects of KDT on growth have been widely studied, but it remains controversial. Several studies have shown that children on a KDT for more than 6 months decreased their growth rate [38–42], especially younger children [39]. Recent studies showed that 20–30% of children on KDT could have growth retardation [43–45]. The decrease in growth may be reversed after patients are taken off the KDT [46], but KDT in GLUT1DS should be used life-long. Long-term treatment with KDT can significantly affect height, especially in those children who start the diet before the age of 2 years [47]. Ferraris and co-authors [43] retrospectively investigated the occurrence of linear growth retardation in 34 children on a KDT, 20 of them with GLUT1DS, of which 16 did not show growth retardation at 12 months. A prospective study was designed by Armeno et al. [48] to evaluate growth in 45 children on a KDT. They observed growth deceleration in 9%. In our study we did not find significant differences in the z-score of weight, height, and BMI according to the presence of the SLC2A1 mutation, nor in the baseline or throughout the follow-up. No significant differences were found in those anthropometric parameters after the onset of KDT compared to baseline, and according to the type of KDT. However, our cohort is small, and the number of patients treated with each type of KDT was not the same, so more studies (even multicenter) should be performed to determine the effect of KDT on growth in children with GLUT1DS.

## 5. Conclusions

GLUT1DS should be suspected in children with hypoglycorrhachia in the setting of normoglycemia and low-to-normal cerebrospinal fluid lactate, and refractory epilepsy or movement disorders, especially if they occur during exercise or fasting. In these cases, the analysis of the gene SLC2A1 should be performed and KDT started. Children in whom the genetic study is finally negative, may benefit from treatment. Furthermore, a delay in the treatment could lead to progressive neurological deterioration and they may be treated with ineffective and potentially harmful pharmacological treatments.

KDT for confirmed or suspected GLUT1DS should be initiated as soon as possible. No significant differences were found between different types of KDT. MAD was as effective and safe as CKD in our cohort, so the type of KDT chosen should be individualized. Side effects and deficiencies in vitamins and minerals can appear, but were usually mild and easy to treat in the study, so permanent monitoring is important. KDT should be used life-long in confirmed GLUT1DS. However, the effect of KDT on growth remains controversial.

**Author Contributions:** Conceptualization: J.R.H. and C.P.-G.; Data Curation: J.R.H.; Formal Analysis: J.R.H.; Investigation: B.G.A., B.G.F. and L.A.P.M.; Methodology: J.R.H. and E.C.V.; Project Administration: C.P.-G.; Resources: E.C.V., B.G.A., B.G.F., L.A.P.M. and C.P.-G.; Software: J.R.H.; Supervision: C.P.-G.; Validation: J.R.H., E.C.V. and C.P.-G.; Visualization: J.R.H.; Writing—Original Draft: J.R.H., L.G.G.-S. and C.P.-G.; Writing—Review & Editing: J.R.H., L.G.G.-S. and C.P.-G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee in Clinical Research of the University Children’s Hospital Niño Jesús (protocol code R-0002/15, date of approval 25 February 2015).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects (or their relatives) involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Conflicts of Interest:** Ruiz Herrero and González Gutiérrez-Solana have received honorarium for lectures and funding for travel from Nutricia. Cañedo Villarroya has received honorarium for lectures and funding for travel from Mead Johnson, Nestlé, Nutricia, Abbott, and Orphan. Puerta Macfarland has received honorarium for lectures from Nutricia. Pedrón Giner has served as consultant or received honorarium for lectures from Nutricia, Vitaflo, Nestlé, and Mead Johnson; and has received funding for travel from Nutricia, Vitaflo, and Nestlé. García Alcolea and Gómez Fernández have no conflict of interest.

## References

- De Vivo, D.C.; Trifiletti, R.R.; Jacobson, R.I.; Ronen, G.M.; Behmand, R.A.; Harik, S.I. Defective glucose transport across the blood-brain barrier as a cause of persistent hypoglycorrhachia, seizures, and developmental delay. *N. Engl. J. Med.* **1991**, *325*, 703–709. [\[CrossRef\]](#)
- Seidner, G.; Alvarez, M.G.; Yeh, J.I.; O’Driscoll, K.R.; Klepper, J.; Stump, T.S.; Wang, D.; Spinner, N.B.; Birnbaum, M.J.; De Vivo, D.C. GLUT-1 deficiency syndrome caused by haploinsufficiency of the blood-brain barrier hexose carrier. *Nat. Genet.* **1998**, *18*, 188–191. [\[CrossRef\]](#)
- Leen, W.G.; Klepper, J.; Verbeek, M.M.; Leferink, M.; Hofste, T.; Van Engelen, B.G.; Wevers, R.A.; Arthur, T.; Bahi-Buisson, N.; Ballhausen, D.; et al. Glucose transporter-1 deficiency syndrome: The expanding clinical and genetic spectrum of a treatable disorder. *Brain* **2010**, *133*, 655–670. [\[CrossRef\]](#)
- De Giorgis, V.; Veggiotti, P. GLUT1 deficiency syndrome 2013: Current state of the art. *Seizure* **2013**, *22*, 803–811. [\[CrossRef\]](#)
- Klepper, J. Absence of SLC2A1 mutations does not exclude glut1 deficiency syndrome. *Neuropediatrics* **2013**, *44*, 235–236. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Klepper, J.; Akman, C.; Armeno, M.; Auvin, S.; Cervenka, M.; Cross, H.J.; De Giorgis, V.; Della Marina, A.; Engelstad, K.; Heussinger, N.; et al. Glut1 Deficiency Syndrome (Glut1DS): State of the art in 2020 and recommendations of the international Glut1DS study group. *Epilepsia Open* **2020**, *5*, 354–365. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kossoff, E.H. International consensus statement on clinical implementation of the ketogenic diet: Agreement, flexibility, and controversy. *Epilepsia* **2008**, *49*, 11–13. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Leen, W.G.; Mewasingh, L.; Verbeek, M.M.; Kamsteeg, E.J.; van de Warrenburg, B.P.; Willemsen, M.A. Movement disorders in GLUT1 deficiency syndrome respond to the modified Atkins diet. *Mov. Disord.* **2013**, *28*, 1439–1442. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Ohshiro-Sasaki, A.; Shimbo, H.; Takano, K.; Wada, T.; Osaka, H. A three-year-old boy with glucose transporter type 1 deficiency syndrome presenting with episodic ataxia. *Pediatric Neurol.* **2014**, *50*, 99–100. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Amalou, S.; Gras, D.; Ilea, A.; Greneche, M.-O.; Francois, L.; Bellavoine, V.; Delanoe, C.; Auvin, S. Use of modified Atkins diet in glucose transporter type 1 deficiency syndrome. *Dev. Med. Child Neurol.* **2016**, *58*, 1193–1199. [\[CrossRef\]](#)
- Holliday, M.A.; Segar, W.E. Maintenance need for water in parenteral fluid therapy. *Pediatrics* **1957**, *19*, 823–832. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Klepper, K.J. GLUT1 deficiency syndrome in clinical practice. *Epilepsy Res.* **2012**, *100*, 272–277. [\[CrossRef\]](#)
- Pong, A.W.; Geary, B.R.; Engelstad, K.M.; Natarajan, A.; Yang, H.; De Vivo, D.C. Glucose transporter type I deficiency syndrome: Epilepsy phenotypes and outcomes. *Epilepsia* **2012**, *53*, 1503–1510. [\[CrossRef\]](#)
- Leary, L.D.; Wang, D.; Nordli, D.R.; Engelstad, K.; De Vivo, D.C. Seizure characterization and electroencephalographic features in Glut-1 deficiency syndrome. *Epilepsia* **2003**, *44*, 701–707. [\[CrossRef\]](#)
- Wang, D.; Pascual, J.M.; Yang, H.; Engelstad, K.; Jhung, S.; Sun, R.P.; De Vivo, D.C. Glut-1 deficiency syndrome: Clinical, genetic, and therapeutic aspects. *Ann. Neurol.* **2004**, *57*, 111–118. [\[CrossRef\]](#)
- Kass, H.R.; Winesett, S.P.; Bessone, S.K.; Turner, Z.; Kossoff, E.H. Use of dietary therapies amongst patients with GLUT1 deficiency syndrome. *Seizure* **2016**, *35*, 83–87. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Ramm-Petersen, A.; O’Nakken, K.; Skogseid, I.M.; Randby, H.; Skei, E.B.; Bindoff, A.L.; Selmer, K.K. Good outcome in patients with early dietary treatment of GLUT-1 deficiency syndrome: Results from a retrospective Norwegian study. *Dev. Med. Child Neurol.* **2013**, *55*, 440–447. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Legido, M.J.; Ledesma, C.C.; Cuesta, B.B.; Marin, L.L.; Extremera, V.C.; Pérez-Cerdá, C.; González, B.P.; Martín, E.L.; Gutiérrez-Solana, L.G. Estudio de pacientes pediátricos con fenotipo clínico y bioquímico de síndrome de déficit de transportador de glucosa cerebral (GLUT-1). *Neurología* **2019**, in press. [\[CrossRef\]](#)

19. Schwantje, M.; Verhagen, L.M.; van Hasselt, P.M.; Fuchs, S.A. Glucose transporter type 1 deficiency syndrome and the ketogenic diet. *J. Inher. Metab. Dis.* **2020**, *43*, 216–222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Tang, M.; Park, S.H.; De Vivo, D.C.; Monani, U.R. Therapeutic strategies for glucose transporter 1 deficiency syndrome. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **2019**, *6*, 1923–1932. [[CrossRef](#)]
21. Haberlandt, E.; Karall, D.; Jud, V.; Baumgartner, S.S.; Zotter, S.; Rostasy, K.; Bauman, M.; Scholl-Buergi, S. Glucose transporter type 1 deficiency syndrome effectively treated with modified Atkins diet. *Neuropediatrics* **2014**, *45*, 117–119. [[CrossRef](#)]
22. Ito, S.; Oguni, H.; Ito, Y.; Ishigaki, K.; Ohinata, J.; Osawa, M. Modified Atkins diet therapy for a case with glucose transporter type 1 deficiency syndrome. *Brain Dev.* **2008**, *30*, 226–228. [[CrossRef](#)]
23. Fujii, T.; Ito, Y.; Takahashi, S.; Shimono, K.; Natsume, J.; Yanagihara, K.; Oguni, H. Outcome of ketogenic diets in GLUT1 deficiency syndrome in Japan: A nationwide survey. *Brain Dev.* **2016**, *38*, 628–637. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Kossoff, E.H.; Zupec-Kania, B.A.; Auvin, S.; Ballaban-Gil, K.R.; Bergqvist, A.C.; Blackford, R.; Buchhalter, J.R.; Caraballo, R.H.; Cross, J.H.; Dahlin, M.G.; et al. Optimal clinical management of children receiving dietary therapies for epilepsy: Updated recommendations of the International Ketogenic Diet Study Group. *Epilepsia Open* **2018**, *3*, 175–192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Lin, A.; Turner, Z.; Doerrer, S.C.; Stanfield, A.; Kossoff, E.H. Complications during ketogenic diet initiation: Prevalence, treatment, and influence on seizure outcomes. *Pediatric Neurol.* **2017**, *68*, 35–39. [[CrossRef](#)]
26. Kang, H.C.; Chung, D.E.; Kim, D.W.; Kim, H.D. Early and late-onset complications of the ketogenic diet for intractable epilepsy. *Epilepsia* **2004**, *45*, 1116–1123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Kossoff, E.H.; Pyzik, P.L.; Furth, S.L.; Hladky, H.D.; Freeman, J.M.; Vining, E.P. Kidney stones, carbonic anhydrase inhibitors, and the ketogenic diet. *Epilepsia* **2002**, *43*, 1168–1171. [[CrossRef](#)]
28. Sampath, A.; Kossoff, E.H.; Furth, S.L.; Pyzik, P.L.; Vining, E.P. Kidney stones and the ketogenic diet: Risk factors and prevention. *J. Child Neurol.* **2007**, *22*, 375–378. [[CrossRef](#)]
29. McNally, M.A.; Pyzik, P.L.; Rubenstein, J.E.; Hamdy, R.F.; Kossoff, E.H. Empiric use of potassium citrate reduces kidney-stone incidence with the ketogenic diet. *Pediatrics* **2009**, *124*, e300–e304. [[CrossRef](#)]
30. 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.* **2016**, *116*, 529–534. [[CrossRef](#)]
31. Kwiterovich, P.O.; Vining, E.P.; Pyzik, P.; Skolasky, R.; Freeman, J.M. Effect of a high-fat ketogenic diet on plasma levels of lipids, lipoproteins, and apolipoproteins in children. *JAMA* **2003**, *290*, 912–920. [[CrossRef](#)]
32. Bertoli, S.; Neri, I.G.; Trentani, C.; Ferraris, C.; De Amicis, R.S.; Battezzati, A.; Veggiotti, P.; De Giorgis, V.; Tagliabue, A. Short-term effects of ketogenic diet on anthropometric parameters, body fat distribution, and inflammatory cytokine production in GLUT1 deficiency syndrome. *Nutrition* **2015**, *31*, 981–987. [[CrossRef](#)]
33. Heussinger, N.; Della Marina, A.; Beyerlein, A.; Leiendecker, B.; Hermann-Alves, S.; Pozza, R.D.; Klepper, J. 10 patients, 10 years—Long term follow-up of cardiovascular risk factors in Glut1 deficiency treated with ketogenic diet therapies: A prospective, multicenter case series. *Clin. Nutr.* **2018**, *37*, 2246–2251. [[CrossRef](#)]
34. Christodoulides, S.S.; Neal, E.G.; Fitzsimmons, G.; Chaffe, H.M.; Jeanes, Y.M.; Aitkenhead, H.; Cross, J.H. The effect of the classical and medium chain triglyceride ketogenic diet on vitamin and mineral levels. *J. Hum. Nutr. Diet.* **2012**, *25*, 16–26. [[CrossRef](#)]
35. Coppola, G.; Epifanio, G.; Auricchio, G.; Federico, R.R.; Resicato, G.; Pascotto, A. Plasma free carnitine in epilepsy children, adolescents and young adults treated with old and new antiepileptic drugs with or without ketogenic diet. *Brain Dev.* **2006**, *28*, 358–365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Berry-Kravis, E.; Booth, G.; Sanchez, A.C.; Woodbury-Kolb, J. Carnitine levels and the ketogenic diet. *Epilepsia* **2001**, *42*, 1445–1451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Cappuccio, G.; Pinelli, M.; Alagia, M.; Donti, T.; Day-Salvatore, D.-L.; Veggiotti, P.; De Giorgis, V.; Lunghi, S.; Vari, M.S.; Striano, P.; et al. Biochemical phenotyping unravels novel metabolic abnormalities and potential biomarkers associated with treatment of GLUT1 deficiency with ketogenic diet. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0184022. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. 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 diets. *Pediatrics* **2008**, *122*, e334–e340. [[CrossRef](#)]
39. Vining, E.P.; Pyzik, P.; McGrogan, J.; Hladky, H.; Anand, A.; Kriegler, S.; Freeman, J.M. Growth of children on the ketogenic diet. *Dev. Med. Child Neurol.* **2002**, *44*, 796–802. [[CrossRef](#)]
40. Williams, S.; Basualdo-Hammond, C.; Curtis, R.; Schuller, R. Growth retardation in children with epilepsy on the ketogenic diet: A retrospective chart review. *J. Am. Diet. Assoc.* **2002**, *102*, 405–407. [[CrossRef](#)]
41. Groleau, V.; Schall, J.I.; Stallings, V.A.; Bergqvist, C.A. Long-term impact of the ketogenic diet on growth and resting energy expenditure in children with intractable epilepsy. *Dev. Med. Child. Neurol.* **2014**, *56*, 898–904. [[CrossRef](#)]
42. Peterson, S.J.; Tangney, C.C.; Pimentel-Zablah, E.M.; Hjelmgren, B.; Booth, G.; Berry-Kravis, E. Changes in Growth and Seizure Reduction in Children on the Ketogenic Diet as a Treatment for Intractable Epilepsy. *J. Am. Diet. Assoc.* **2005**, *105*, 718–725. [[CrossRef](#)]
43. Ferraris, C.; Guglielmetti, M.; Pasca, L.; De Giorgis, V.; Ferraro, O.E.; Brambilla, I.; Leone, A.; De Amicis, R.; Bertoli, S.; Veggiotti, P.; et al. Impact of the ketogenic diet on linear growth in children: A single-center retrospective analysis of 34 cases. *Nutrients* **2019**, *11*, 1442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



44. Wibisono, C.; Rowe, N.; Beavis, E.; Kepreotes, H.; Mackie, F.E.; Lawson, J.A.; Cardamone, M. Ten-year single-center experience of the ketogenic diet: Factors influencing efficacy, tolerability, and compliance. *J. Pediatrics* **2015**, *166*, 1030–1036. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Lambrechts, D.; Kinderen, R.; Vles, S.; Louw, A.; Aldenkamp, A.; Majoie, M. The MCT-ketogenic diet as a treatment option in refractory childhood epilepsy: A prospective study with 2-year follow-up. *Epilepsy Behav.* **2015**, *51*, 261–266. [[CrossRef](#)]
46. Kim, J.T.; Kang, H.C.; Song, J.E.; Lee, M.J.; Lee, Y.J.; Lee, E.J.; Lee, J.S.; Kim, H.D. Catch-up growth after long-term implementation and weaning from ketogenic diet in pediatric epileptic patients. *Clin. Nutr.* **2013**, *32*, 98–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Ruiz Herrero, J.; Cañedo Villarroya, E.; García Peñas, J.J.; García Alcolea, B.; Gómez Fernández, B.; Puerta Macfarland, L.A.; Pedron Giner, C. Safety and effectiveness of the prolonged treatment of children with a ketogenic diet. *Nutrients* **2020**, *12*, 306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Armeno, M.; Verini, A.; Del Pino, M.; Araujo, M.B.; Mestre, G.; Reyes, G.; Caraballo, R.H. A prospective study on changes in nutritional status and growth following two years of Ketogenic Diet (KD) therapy in children with refractory epilepsy. *Nutrients* **2019**, *11*, 1596. [[CrossRef](#)]

## **7.3 TERCER ARTÍCULO: TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS EN EPILEPSIA: EXPERIENCIA EN 160 PACIENTES DURANTE 18 AÑOS.**

### **7.3.1 PRESENTACIÓN DEL ARTÍCULO**

#### **Autores:**

1. Jana Ruiz Herrero
2. Elvira Cañedo Villarroya
3. Juan José García Peñas
4. Beatriz García Alcolea
5. Begoña Gómez Fernández
6. Laura Andrea Puerta Macfarland
7. Consuelo Pedrón-Giner

**Revista:** Anales de Pediatría. ISSN: 1695-4033.

Factor de impacto año 2020: 1,5. Cite score año 2019: 1,1.

Revista oficial de la Asociación Española de Pediatría.

#### **Referencia completa:**

Ruiz Herrero J, CañedoVillarroya E, García Peñas JJ, García Alcolea B, Gómez Fernández B, Puerta Macfarland LA, Pedrón Giner C. **Terapias dietéticas cetogénicas en epilepsia: experiencia en 160 pacientes durante 18 años.** An Pediatr 2021;14: S1695-4033(21)00193-4. Doi: 10.1016/j.anpedi.2021.05.006.

## 7.3.2 ARTÍCULO PUBLICADO

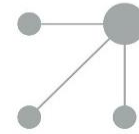
Model  
ANPEDI-3154; No. of Pages 12

ARTICLE IN PRESS

Anales de Pediatría xxx (xxxx) xxx-xxx

analesdepediatría

www.analesdepediatría.org



ORIGINAL

### Terapias dietéticas cetogénicas en epilepsia: experiencia en 160 pacientes durante 18 años

Jana Ruiz Herrero<sup>a,\*</sup>, Elvira Cañedo Villarroya<sup>b</sup>, Juan José García Peñas<sup>c</sup>,  
Beatriz García Alcolea<sup>b</sup>, Begoña Gómez Fernández<sup>b</sup>, Laura Andrea Puerta Macfarland<sup>b</sup>  
y Consuelo Pedrón-Giner<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Gastroenterología Infantil, Servicio de Pediatría, Hospital San Rafael, Madrid, España

<sup>b</sup> Sección de Gastroenterología y Nutrición, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, España

<sup>c</sup> Sección de Neurología, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, España

Recibido el 7 de abril de 2021; aceptado el 5 de mayo de 2021

#### PALABRAS CLAVE

Dieta cetogénica;  
Epilepsia infantil;  
Epilepsia refractaria;  
Síndrome de déficit  
de transportador de  
glucosa tipo 1;  
Crecimiento

#### Resumen

**Introducción:** Las terapias dietéticas cetogénicas (TDC) tienen efecto neuroprotector y anticonvulsivante, reducen las crisis epilépticas y mejoran el estado cognitivo en pacientes epilépticos. Nuestro propósito fue evaluar los efectos de las TDC en niños con epilepsia refractaria (eficacia, efectos secundarios, impacto en el estado nutricional y crecimiento).

**Métodos:** Se realizó un estudio observacional descriptivo retrospectivo y prospectivo en un hospital terciario español (enero de 2000-diciembre de 2018). Ciento sesenta pacientes pediátricos con epilepsia fueron tratados con TDC (82 varones; edad media 5 años 9 meses). Las convulsiones, los fármacos antiepilépticos, la antropometría, los efectos secundarios y los parámetros analíticos se controlaron al inicio del tratamiento y a los 3, 6, 12 y 24 meses.

**Resultados:** En estos intervalos los pacientes libres de crisis fueron: 13,7%, 12,5%, 14,4% y 10,6%, respectivamente, lográndose una reducción de las convulsiones  $\geq 50\%$  en el 41,9%, 37,5%, 28,7% y 16,2%. Los efectos secundarios fueron frecuentes, especialmente trastornos digestivos, hipercalciuria, hipoglucemia, disfunción hepática y dislipidemia. La prealbúmina, la proteína de unión al retinol, la vitamina A y el magnesio disminuyeron significativamente. La talla se vio afectada, especialmente en niños menores de 2 años.

**Conclusiones:** Las TDC son efectivas para la epilepsia refractaria infantil. Sin embargo, los efectos adversos son frecuentes y pueden afectar al estado nutricional y al crecimiento.

© 2021 Asociación Española de Pediatría. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [jana.ruizherrero@hotmail.com](mailto:jana.ruizherrero@hotmail.com) (J. Ruiz Herrero).

<https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2021.05.006>

1695-4033/© 2021 Asociación Española de Pediatría. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Cómo citar este artículo: J. Ruiz Herrero, E. Cañedo Villarroya, J.J. García Peñas et al., Terapias dietéticas cetogénicas en epilepsia: experiencia en 160 pacientes durante 18 años, Anales de Pediatría, <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2021.05.006>

**KEYWORDS**

Ketogenic diet;  
Pediatric epilepsy;  
Refractory epilepsy;  
Glucose transporter  
type 1 deficiency  
syndrome;  
Growth

**Ketogenic dietary therapies for epilepsy: Experience in 160 patients over 18 years****Abstract**

**Aim:** Ketogenic dietary therapies (KDT) produce anticonvulsant and neuroprotective effects, reduce seizures and improve the cognitive state in patients with epilepsy. Our purpose was to evaluate the effects of KDT in children with refractory epilepsy (effectiveness, side effects, impact on nutritional status and growth).

**Methods:** A retrospective and prospective observational descriptive study was conducted in a Spanish tertiary hospital (January 2000 to December 2018). One hundred sixty pediatric patients with epilepsy were treated with KDT (82 males; mean age 5 years 9 months). Seizures, anti-epileptic drugs, anthropometric measures, side effects, and laboratory assessment were monitored baseline and at 3, 6, 12 and 24 months after the onset of KDT.

**Results:** In these time intervals, the seizure-free patients were: 13.7, 12.5, 14.4 and 10.6%, respectively, and a reduction of seizures  $\geq 50\%$  was achieved in 41.9, 37.5, 28.7 and 16.2%. Side effects were frequent, especially digestive disorders, hypercalciuria, hypoglycemia, hepatic dysfunction and dyslipidemia. Prealbumin, retinol binding protein, vitamin A and magnesium decreased significantly. Height was affected, especially in children below 2 years.

**Conclusions:** KDT are effective for refractory epilepsy in children. However, adverse effects are frequent, and it may affect nutritional status and growth.

© 2021 Asociación Española de Pediatría. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

**Introducción**

La epilepsia es uno de los principales trastornos neurológicos infantiles. Los fármacos antiepilépticos (FAE) mejoran las convulsiones en la mayoría de los pacientes. Sin embargo, hasta un tercio (7-20% de los niños y 30-40% de los adultos)<sup>1,2</sup> pueden padecer epilepsia refractaria que puede asociarse con deterioro cognitivo, efectos adversos (EA) y mala calidad de vida. En estos casos las terapias dietéticas cetogénicas (TDC) son una alternativa terapéutica.

Existen diferentes tipos de TDC<sup>3</sup>. La dieta cetogénica clásica (DCC) proporciona un 87-90% de la ingesta calórica diaria como grasas<sup>3</sup>. La provisión de hidratos de carbono y proteínas varía en proporciones de 3:1 a 4:1 (3 a 4 gramos de grasa por 1 gramo de hidratos de carbono y proteínas). En la dieta cetogénica con triglicéridos de cadena media (TCM, DC-TCM) el 71% de la ingesta calórica total proviene de la grasa, siendo el 11% grasa natural y el 60% TCM<sup>4</sup>. La DC-MCT modificada permite un mayor contenido de grasas naturales (41%). La dieta de Atkins modificada (DAM) permite la ingesta libre de proteínas y grasas con restricción de hidratos de carbono (10 gramos/día)<sup>5</sup>. La dieta de bajo índice glucémico (DBIG) liberaliza la toma de hidratos de carbono (40-60 gramos/día), favoreciendo aquellos con índice glucémico  $< 50$ <sup>6</sup>. No existe evidencia clara de diferencias de eficacia entre DCC, DC-TCM<sup>7</sup> o DAM<sup>8</sup>. Algunos estudios sugieren que la DBIG también es eficaz<sup>9</sup>, a pesar de no inducir cetosis, y en un ensayo clínico aleatorizado reciente no fue inferior a la DCC<sup>10</sup>.

Las TDC pueden causar problemas digestivos<sup>11,12</sup>, hepáticos<sup>12</sup>, renales<sup>13,14</sup>, dislipidemia<sup>15</sup>, déficits nutricionales<sup>16,17</sup> y alteraciones del crecimiento<sup>18-22</sup>.

Los objetivos de este estudio fueron evaluar la eficacia de las TDC, sus EA y el impacto sobre el crecimiento y el estado nutricional. Se compararon diferentes tipos de TDC

y grupos de edad para identificar diferencias en los ítems estudiados.

**Pacientes y métodos**

Se recogieron de forma anónima los datos de todos los pacientes  $< 18$  años con epilepsia tratados con TDC en un hospital terciario entre enero de 2000 y diciembre de 2018. Es un estudio observacional descriptivo retrospectivo y prospectivo (desde mayo de 2015) aprobado por el Comité de Ética en Investigación Clínica del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús (R-0002/15). Los pacientes (o sus familiares) fueron informados de la investigación, firmaron un consentimiento informado y se sometieron a un examen basal y a los 3, 6, 12 y 24 meses.

Para la calibración de las dietas las recomendaciones energéticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>23</sup>, según edad y peso, se utilizaron cuando no se realizó una calorimetría indirecta. La ingesta proteica se calculó según las recomendaciones (1 g/kg/día en  $> 1$  año y 1,5 en lactantes)<sup>24</sup>. El método de Holliday-Segar<sup>25</sup> se empleó para estimar los requerimientos mínimos de líquidos, aunque se prescribió al menos la recomendación de la OMS<sup>26</sup>. Se pautaron suplementos de oligoelementos, vitaminas y minerales sin hidratos de carbono para alcanzar al menos la ingesta diaria recomendada<sup>26,27</sup> cuando se encontraron aportes insuficientes o deficiencias.

La eficacia se evaluó según la reducción del número de FAE y el porcentaje de reducción de crisis en comparación con el valor inicial: 100% (libre de crisis), 90-100%, 50-90%,  $< 50\%$ , 0% (sin mejoría) o empeoramiento.

Los EA se dividieron en precoces (primer mes) o tardíos. Se analizaron peso, talla e índice de masa corporal y se ajustaron por sexo y edad según las tablas de la OMS. La talla

se consideró normal cuando la puntuación z estaba entre  $-2$  y  $+2$ , alteración leve si z era  $< -2$  y  $\geq -3$  y alteración grave si z era  $< -3$ . La evaluación de laboratorio incluyó hemograma, perfil bioquímico y lipídico, gasometría, sedimento urinario y cocientes calcio, proteína y citrato/creatinina, prealbúmina, proteína transportadora de retinol, vitaminas A, D, E, B9, B12, cinc, selenio, paratohormona y carnitina.

Los datos se analizaron con el software SPSS Statistics versión 16.0. Los datos cuantitativos se presentan como media y desviación estándar (DE) para distribuciones normales, y mediana y rango o rango intercuartílico en caso contrario. Los datos cualitativos se expresan como porcentaje. Se realizó un análisis por intención de tratar.

Se comparó la eficacia de 3 grupos de dieta: DCC (relación 3:1 y 4:1), DC-TCM (clásica o modificada) y DAM. Para detectar diferencias entre los parámetros antropométricos basalmente y en diferentes intervalos de seguimiento según el tipo de TDC y grupo de edad ( $< 2$  años, 2-5 años, 5-10 años y  $> 10$  años) se aplicó el modelo de análisis de varianza de medidas repetidas (ANOVA) para datos apareados. Se utilizó el test exacto de Fisher para comparar la eficacia entre diferentes TDC. Se empleó la «t» de Student para datos apareados para comparar los valores analíticos basales y a los 12 y 24 meses. Se utilizaron ANOVA y la «t» de Student para muestras independientes para comparar dichos indicadores según el tipo de TDC. Se consideraron significativos valores de  $p \leq 0,05$ .

## Resultados

Se trataron 160 pacientes con TDC, 71 desde mayo de 2015. Sus características se especifican en la [tabla 1](#). Todos padecían epilepsia refractaria, excepto un paciente que no había recibido FAE por sospecha de síndrome de deficiencia del transportador cerebral de la glucosa tipo 1 (SD-GLUT1). La [tabla 2](#) muestra las causas de la epilepsia. La mediana de edad al inicio de la epilepsia fue de 291 días (rango intercuartílico = 936,2). El 90% tenía convulsiones diarias. El promedio de FAE utilizados antes de la TDC fue de 6 (rango 0-16), y el 59% presentó EA. Otros tratamientos utilizados fueron: estimulador del nervio vago (5), cirugía (7), corticoides (48), gammaglobulina (15) y otros como vitamina B6 (47%). Doce recibieron previamente TDC, con buena respuesta en 5.

La edad media al inicio de la TDC fue de 5 años y 9 meses (rango: 79 días-17 años y 4 meses). El tiempo medio desde el inicio de los síntomas hasta el tratamiento con TDC fue de 3 años y 10 meses (rango 7 días-14 años y 6 meses).

Antes de la TDC se encontraron algunas alteraciones en marcadores nutricionales ([tabla 3](#)), y el 16,8% presentaba una ingesta deficiente de vitaminas y oligoelementos.

La [tabla 1](#) muestra los tipos de dieta utilizados. Entre 2009 y 2014 se siguieron las recomendaciones del Grupo Internacional para el Estudio de la Dieta Cetogénica<sup>28</sup>. Desde 2015 se utilizó el protocolo del propio departamento de nutrición. La DCC se indicó en pacientes con sonda nasogástrica (SNG) o gastrostomía,  $< 2$  años, o en estatus. Se seleccionó la DAM para niños  $> 2$  años. Las dietas se introdujeron aumentando progresivamente la ratio cetogénica, adecuándose a la tolerancia y los EA, sin restricción de líquidos.

Todos los pacientes  $< 2$  años (excepto 2) comenzaron DCC, ratio 3:1. Las DAM y DC-TCM solo se pautaron en  $> 2$  años. Se administró DBIG en 4 casos para mejorar el cumplimiento. Todas las DAM se administraron por vía oral. Todas las dietas administradas por sonda fueron DCC (excepto una DC-TCM modificada). El 25% comenzó en régimen ambulatorio (todas DAM). Se utilizó el ayuno en 15 (12 DC-TCM que comenzaron en 2006 o antes, y 3 DCC en epilepsia grave). Las calorías se restringieron en 4 niños que comenzaron antes de 2014 (75-83% de las recomendaciones diarias). El tiempo medio para alcanzar cetosis ( $> 2,4 \mu\text{mol/l}$ ) fue 4,3 días (DE: 3,9; rango 12 horas-30 días). El beta-hidroxibutirato fue significativamente mayor en las DCC durante todo el seguimiento (excepto a los 6 meses).

## Eficacia de las terapias dietéticas cetogénicas

La eficacia global se muestra en la [tabla 4](#), y por grupos de edad en la [figura 1](#). Cuatro lactantes no completaron 3 meses (2 por ineficacia y 2 fallecieron).

La DCC fue más eficaz a los 3 y 12 meses ( $p < 0,05$ ). Según las diferentes etiologías en vez de las TDC fueron eficaces en el 45-10% de las epilepsias estructurales, en el 79-47% de las enfermedades metabólicas y en el 59-19% de los trastornos genéticos, a lo largo del seguimiento. Los FAE se redujeron en 30, 13, 9 y 9 niños en los diferentes intervalos. El porcentaje de pacientes que tomaba  $\leq 2$  FAE aumentó de un 34% antes de la dieta hasta un 41-56% a lo largo del seguimiento.

Se suspendió la TDC en 126 ([tabla 1](#) y [fig. 2](#)). La ineficacia fue la primera causa de abandono en todos los grupos de edad y tipos de TDC, seguida del incumplimiento en la DAM (17/12) y los EA en la DCC (6/11). Ningún niño  $< 2$  años abandonó la dieta por incumplimiento.

Tres lactantes (2,4%) murieron durante la terapia, sin relación con ella. Todos eran niños con encefalopatía con DCC ratio 3:1, con  $> 10$  convulsiones/día y al menos 4 FAE.

## Efectos secundarios de las terapias dietéticas cetogénicas

Setenta y siete pacientes (48%) presentaron EA precoces ([tabla 5](#)). Los más frecuentes fueron: problemas digestivos (25%), hipoglucemia (18%; 90% asintomática) e hipercalcemia (11%). Otros fueron: dislipidemia (10), somnolencia/decaimiento (9; 2 con hipoglucemia, uno con hiperamonemia y uno con hiperketonemia), deshidratación (4), acidosis (3) y anorexia (2). En 6 sujetos los EA precoces conllevaron la retirada de la dieta: 2 DAM (por decaimiento y somnolencia, y por acidosis —relacionada con topiramato— respectivamente), 3 DCC ratio 3:1 (por vómitos, hiperamonemia e hipertrigliceridemia —relacionada con deficiencia de carnitina y toma de valproico— y urticaria recurrente relacionada con alergia leve a proteínas de leche de vaca) y una DC-MCT (por vómitos y diarrea).

Los EA tardíos fueron frecuentes. En la [tabla 3](#) se presentan los parámetros analíticos que se alteraron y el porcentaje de pacientes que sufrió dichas alteraciones. El colesterol fue superior al valor basal en todos los intervalos de tiempo ( $p \leq 0,002$ ). La hipertrigliceridemia se produjo hasta los 12 meses ( $p \leq 0,007$ ). Ningún paciente precisó fármacos hipolipemiantes. La alteración hepática más

**Tabla 1** Características de los pacientes del estudio y de las terapias dietéticas cetogénicas

	Pacientes con TDC (n = 160)
<b>Género</b>	Varón, 82 (51%) Mujer, 78 (49%)
<b>Retraso psicomotor/discapacidad intelectual</b>	73%
<b>Tipo de crisis</b>	Tónico-clónica generalizada, 10 (6,2%) Mioclónica, 27 (16,9%) Tónica, 30 (18,7%) Focal, 37 (23%) Atónica, 3 (1,9%) Ausencia, 7 (4,4%) Clónica, 6 (3,7%) Varios, 40 (25%)
<b>Edad al inicio de la epilepsia</b>	Recién nacido, 21 (13,1%) Lactante, 68 (42,5%) 1 a 5 años, 54 (33,7%) 5 a 10 años, 12 (7,5%) > 10 años, 5 (3,1%)
<b>Número de crisis antes del inicio de la TDC</b>	≤ 1/día, 16 (10%) 2-10/día, 89 (55,6%) > 10/día, 35 (21,9%) Incontables, 3 (1,9%) Desconocido, 5 (3,1%)
<b>Edad al inicio de la TDC</b>	Estatus epiléptico, 12 (7,5%) Lactante, 25 (15,6%) 1 a 2 años, 15 (9,4%) 2 a 5 años, 45 (28,1%) 5 a 10 años, 40 (25%) > 10 años, 35 (21,9%)
<b>Tipo de TDC</b>	DCC, 3:1; 68 (42,5%) DCC, 4:1; 16 (10%) DAM, 58 (36,2%) DC-TCM, 2 (1,2%) DC-TCM, modificada, 16 (10%)
<b>Vía de administración</b>	Oral, 120 (75%) SNG, 24 (15%) Gastrostomía, 16 (10%)
<b>Mediana de duración de la TDC (rango)</b>	259 días (5 días-9 años y 6 meses)
<b>Motivos de retirada de la TDC<sup>a</sup></b>	Ineficacia, 76 (60,3%) Incumplimiento, 17 (13,5%) Efectos adversos, 11 (8,7%) Duración > 2 años, 10 (8%) Pérdida de seguimiento, 5 (4%) Fallecimiento, 3 (2,5%) Otras, 4 (3%)

DAM: dieta de Atkins modificada; DCC: dieta cetogénica clásica; DC-TCM: dieta cetogénica con triglicéridos de cadena media; SNG: sonda nasogástrica; TDC: terapia dietética cetogénica.

<sup>a</sup> Porcentajes calculados sobre el total de pacientes que abandonan la dieta.

frecuente fue la elevación de la gammaglutamiltranspeptidasa (GGT). Sin embargo, esta se redujo significativamente a los 3 meses ( $p=0,008$ ). La hipercalcemia fue común, pero solo un niño tuvo nefrocalcinosis (0,62%). Todos los individuos con hipercalcemia fueron tratados con citrato potásico. Los problemas gastrointestinales fueron frecuentes (10-15%), siendo el más común el estreñimiento, que se trató con polietilenglicol.

Los niveles de colesterol fueron superiores en las DAM a los 3 meses. Los triglicéridos fueron superiores en las

DCC y la urea en las DAM durante todo el seguimiento. El valor del ácido úrico y las relaciones calcio/creatinina y proteína/creatinina urinarias fueron superiores en las DCC a los 6 meses.

#### Evolución nutricional y cambios antropométricos

La **figura 3** muestra los cambios antropométricos. El porcentaje de pacientes con un z de talla < -2 fue: 14,4% basalmente y 15,3%, 17,7%, 21,6% y 24,1% en

Tabla 2 Etiología de la epilepsia

Etiología	Frecuencia (%)	Causa específica
<i>Desconocida</i>	29 (18,1)	
<i>Metabólica</i>	24 (15)	11 SD-GLUT1 (5 confirmados genéticamente) 9 enfermedad mitocondrial 2 lipofuscinosis neuronal cerioidea (conocidas <i>a posteriori</i> ) Una hipoglucemia neonatal grave Un déficit de PDH
<i>Estructural</i>	43 (26,9)	22 malformaciones del desarrollo cortical (15 displasia, 3 lisencefalia, 2 polimicrogiria, una hemimegalencefalia, una heterotopia subcortical) 16 daños cerebrales hipóxico-isquémicos (un déficit de proteína C, una mutación del factor VIII, una meningitis, una sepsis, una leucemia, 9 enfermedades perinatales, un infarto cerebral, una complicación de cirugía cardíaca compleja) 2 túberes corticales (complejo esclerosis tuberosa) Una malformación cerebral compleja (megalecefalia y anomalía de migración neuronal hemisférica [polimicrogiria y heterotopias nodulares periventriculares]) y quiste aracnoideo gigante Una agenesia de cuerpo calloso Un angioma leptomeníngeo (Sturge Weber)
<i>Genética</i>	39 (24,4)	28 mutaciones genéticas (6 CDKL5; 4 SCN1A [síndrome de Dravet]; 3 KCNQ2; 3 STXBP1; 2 SLC9; 2 MECP2 ligado a X; un SCN2A (encefalopatía epiléptica precoz); un CHRNA4 (epilepsia nocturna del lóbulo temporal); un SCN1B; un RBFOX1; un CACNA1H; un CNTNAP2 (asociado a displasia y síndrome Pitt Hopkins like); un PTPN11 (síndrome de Noonan); un PHOX2B (síndrome de Ondine) 11 trastornos cromosómicos (3 trisomía 21 [síndrome de Down]; 3 inversión-duplicación de la región proximal del cromosoma 15; una deleción 1p; una deleción 11q14; un síndrome de Angelman; un cromosoma 17 en anillo; una duplicación 16p)
<i>Infeciosa</i>	6 (3,7)	3 Virus herpes simple 2 Streptococcus pneumoniae Un citomegalovirus (perinatal)
<i>Inmune</i>	4 (2,5)	2 confirmadas (anticuerpos antiNMDA positivos)
<i>Síndromes</i>	15 (9,4)	3 síndrome de Lennox-Gastaut 3 síndrome de West 3 FIRES 4 síndrome de Doose Un síndrome de Ohtahara Un síndrome de Landau Kleffner

CACNA1H: *calcium voltage-gated channel subunit alpha 1H*; CDKL5: *cyclin dependent kinase-like 5*; CHRNA4: *cholinergic receptor nicotinic alpha 4 subunit*; CNTNAP2: *contactin associated protein like 2*; FIRES: síndrome epiléptico relacionado con infección febril; KCNQ2: *potassium voltage-gated channel subfamily Q member 2*; MECP2: *methyl-CpG binding protein 2*; NMDA: *N-methyl-D-aspartate*; PDH: *piruvato deshidrogenasa*; PHOX2B: *paired like homeobox 2B*; RBFOX1: *RNA binding fox-1 homolog 1*; SCN1A: *sodium voltage-gated channel alpha subunit 1*; SCN2A: *sodium voltage-gated channel alpha subunit 2*; SCN1B: *sodium voltage-gated channel beta subunit 1*; SD-GLUT1: síndrome de deficiencia del transportador cerebral de la glucosa tipo 1; SLC9: *solute carrier family 9*; STXBP1: *syntaxin binding protein 1*; PTPN11: *protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11*.

los diferentes intervalos de seguimiento. De forma global se encontraron diferencias significativas en el z de talla a los 12 meses ( $-0,781 \pm 1,66$ ) en comparación con el valor basal ( $-0,312 \pm 1,70$ ) ( $p=0,015$ ) y a los 24 meses ( $-0,927 \pm 1,20$ ) en comparación con el valor basal ( $-0,310 \pm 1,23$ ) ( $p=0,023$ ). Al comparar la repercusión sobre la talla en los distintos grupos de edad se observó un mayor impacto en los niños más pequeños (fig. 3 B), aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. En función del tipo de dieta se observó una disminución en la puntuación z del peso a los 3 meses ( $p=0,009$ ) y 12 meses ( $p=0,005$ )

en pacientes con DCC en comparación con las otras dietas, pero no hubo diferencias en la talla ni en el índice de masa corporal.

Se observaron aumentos de vitamina D ( $p=0,05$ ), ácido fólico ( $p<0,001$ ), ferritina ( $p=0,009$ ), selenio ( $p<0,001$ ) y carnitina ( $p=0,008$ ) a los 12 meses en comparación con el valor inicial, y de ferritina ( $p=0,047$ ) y carnitina ( $p \leq 0,02$ ) a los 24 meses. Se redujeron prealbúmina ( $p \leq 0,034$ ), proteína transportadora de retinol ( $p \leq 0,025$ ) y magnesio ( $p \leq 0,04$ ) a los 12 y 24 meses y vitamina A ( $p=0,03$ ) a los 12 meses.

Tabla 3 Evolución de parámetros de laboratorio en sangre y orina

Intervalo de tiempo (número de pacientes)	Valores de referencia				Media (DE)				Número de pacientes por encima o por debajo del valor de referencia (%) <sup>a</sup>				
	Basal (160)	3 m (126)	6 m (95)	24 m (32)	Basal	3 m	6 m	24 m	Basal	3 m	6 m	12 m	24 m
<b>Marcadores nutricionales en sangre</b>													
Prealbúmina (mg/dl)	15-40	21,3 (6,5)	18,5 (4,7)	18,4 (4,5)	19 (6,2)	17,8 (3,8)	16 (10)	15 (24,2)	21 (16,6)	19 (20)	15 (24,2)	7 (21,9)	7 (21,9)
RBP (mg/dl)	2,5-6,9	3,5 (1,2)	2,6 (1,3)	2,6 (1,1)	2,7 (1,0)	2,6 (0,7)	32 (20)	20 (32,3)	20 (15,9)	22 (23,2)	20 (32,3)	7 (21,9)	7 (21,9)
Ferritina (ng/ml)	7-140 (< 15 a)	46,8 (57)	42,6 (43)	51,9 (44)	58,4 (37)	55,3 (39,7)	4 (2,5)	0	3 (2,4)	0	0	1 (3)	1 (3)
	15-175 (≥ 15 a)												
<b>Micronutrientes</b>													
Magnesio (mg/dl)	1,5-2,5	2,1 (0,3)	2,0 (0,2)	2,1 (0,2)	2,0 (0,2)	1,97 (0,1)	1 (0,6)	0	1 (0,8)	0	0	0	0
Selenio (µg/l)	70-120	71,2 (21)	-	87,7 (14)	85,7 (21)	87,5 (14,5)	31 (19,3)	2 (2,1)	-	2 (2,1)	4 (6,4)	1 (3)	1 (3)
Cinc (µg/dl)	70-150	91,2 (32)	-	102,5 (24)	95,7 (24)	101,4 (17,3)	12 (7,5)	2 (2,1)	-	2 (2,1)	4 (6,4)	0	0
Carnitina total o levocarnitina (µmol/l)	21,5-64,5	55,6 (25)	-	84,8 (47)	81,2 (40)	69 (31,4)	17 (10,6)	2 (2,1)	-	2 (2,1)	5 (8)	1 (3)	1 (3)
	20-50	42,1 (18)	-	47,2 (24)	46,5 (18)	47 (16,7)							
Vitamina A (mg/l)	0,2-0,6	0,43 (0,2)	0,37 (0,1)	0,35 (0,1)	0,35 (0,1)	0,36 (0,2)	3 (1,9)	1 (1)	1 (0,8)	1 (1)	4 (6,4)	1 (3)	1 (3)
Vitamina E (mg/l)	3-9 (< 12 a)	5,6 (3,9)	4,6 (1,8)	5,1 (1,2)	4,8 (1,4)	5,0 (1,2)	9 (5,6)	4 (4,2)	3 (2,4)	4 (4,2)	6 (9,7)	2 (6,2)	2 (6,2)
	5-20 (≥ 12 a)												
Ácido fólico (B9) (ng/ml)	3,9-23,9	12,1 (6,2)	16,6 (11)	16,9 (5,8)	19,1 (6,4)	17 (5,4)	5 (3,1)	0	0	0	0	0	0
Vitamina B12 (pg/ml)	250-914	814 (624)	955 (559)	876 (355)	897 (533)	916 (489)	3 (1,9)	0	0	0	0	0	0
25-hidroxi-vitamina D (ng/ml)	20-80	28,6 (11)	35,8 (12)	37,8 (14)	34,4 (14)	31 (10)	25 (15,6)	3 (3,2)	2 (1,6)	3 (3,2)	5 (8)	3 (9,4)	3 (9,4)
Calcio (mg/dl)	8,8-10,8	9,6 (0,4)	9,6 (0,4)	9,6 (0,4)	9,6 (0,4)	9,6 (0,3)	3 (1,9)	1 (1)	0	1 (1)	0	0	0
Fosforo (mg/dl)	4,5-6,5	5,0 (0,8)	4,9 (0,7)	4,9 (0,7)	4,7 (0,7)	4,8 (0,5)	31 (19,4)	20 (21)	24 (19,0)	20 (21)	24 (38,7)	9 (28)	9 (28)



Tabla 3 (continuación)

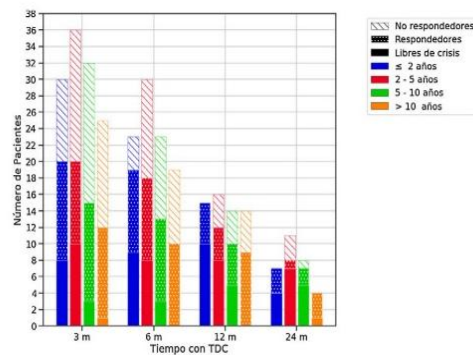
Intervalo de tiempo (número de pacientes)	Valores de referencia				Media (DE)				Número de pacientes por encima o por debajo del valor de referencia (%) <sup>a</sup>						
	Basal (160)	3 m (126)	6 m (95)	12 m (62)	24 m (32)	Basal	3 m	6 m	12 m	24 m	Basal	3 m	6 m	12 m	24 m
<b>Perfil lipídico</b>															
Colesterol (mg/dl)	100-200	164 (37)	195 (61)	197 (53)	196 (53)	195 (44)	23 (14,4)	39 (31)	32 (33,7)	27 (43,5)	14 (43,7)				
Triglicéridos (mg/dl)	35-115	81 (50)	117 (87)	108 (61)	115 (95)	88 (60)	27 (16,9)	27 (21,4)	20 (21)	10 (16,1)	3 (9,4)				
<b>Marcadores hepáticos</b>															
AST (U/l)	28-50	33,2 (16)	30,1 (14)	31,7 (17)	33,7 (35)	27,7 (6,7)	16 (10)	7 (5,5)	6 (6,3)	5 (8)	0				
ALT (U/l)	15-50	19,3 (16)	20,6 (14)	20,5 (13)	23,7 (38)	19 (8,2)	4 (2,5)	3 (2,4)	4 (4,2)	2 (3,2)	0				
GGT (U/l)	8-30	52,9 (110)	33,7 (65)	31,5 (56)	27,9 (23)	27 (24,4)	56 (35)	18 (14,3)	12 (12,6)	13 (21)	6 (18,7)				
<b>Gasometría</b>															
pH	7,35-7,45	7,4 (0,04)	7,3 (0,03)	7,3 (0,04)	7,3 (0,04)	7,3 (0,04)	6 (3,7)	7 (5,5)	5 (5,3)	5 (8)	3 (9,4)				
Bicarbonato (mmol/l)	21-29	24,4 (6,5)	22,3 (3,5)	27,7 (7,9)	21,9 (3,8)	21,5 (2,9)	12 (7,5)	24 (19,0)	8 (8,4)	13 (21)	7 (21,9)				
<b>Hormonas</b>															
IGF-1 (ng/ml)	49-288	108 (77)	-	117 (110)	-	81,7 (49,5)	10 (6,2)	-	9 (9,5)	-	4 (12,5)				
PTH (pg/ml)	15-80	38,9 (22)	27,0 (11)	32,4 (14)	-	30,6 (12,2)	6 (3,7)	2 (1,6)	4 (4,2)	3 (4,8)	2 (6,2)				
<b>Marcadores urinarios</b>															
Cal- cio/creatinina (mg/mg)	≤ 0,8 (0-6 m)	0,16 (0,17)	0,3 (0,25)	0,26 (0,24)	0,27 (0,33)	0,29 (0,25)	19 (11,9)	40 (31,7)	27 (28,4)	16 (25,8)	15 (46,9)				
Proteína/creatinina (mg/mg)	≤ 0,2 (≥ 1 a)	0,24 (0,15)	0,33 (0,19)	0,24 (0,16)	0,31 (0,44)	0,23 (0,28)	12 (7,5)	6 (4,8)	5 (5,3)	4 (6,4)	6 (18,7)				
Citrato/creatinina (mg/mg)	≥ 0,4	0,8 (0,63)	1,3 (2,7)	0,8 (0,7)	0,9 (0,9)	0,6 (0,35)	12 (7,5)	9 (7,1)	7 (7,4)	11 (17,7)	4 (12,5)				
<b>Cuerpos cetónicos</b>															
Beta-hidroxiacetoacido (mmol/l)	> 2,4	-	3,1 (1,8)	3,0 (1,7)	3,5 (1,7)	3,0 (1,7)	-	47 (37,3)	29 (30,5)	27 (43,5)	15 (46,9)				

a: años; ALT: alanino aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; GGT: gamma glutamil transpeptidasa; m: meses; IGF-1: factor de crecimiento insulínico tipo 1; PTH: hormona paratiroidea; RBP: proteína transportadora de retinol.  
<sup>a</sup> Pacientes con niveles por debajo de los valores de referencia de: marcadores nutricionales en sangre, micronutrientes, gasometría (pH < 7,30) y hormonas. Pacientes con niveles por encima de los valores de referencia de: perfil lipídico, marcadores hepáticos, marcadores urinarios y cuerpos cetónicos.

**Tabla 4** Eficacia de las terapias dietéticas cetogénicas

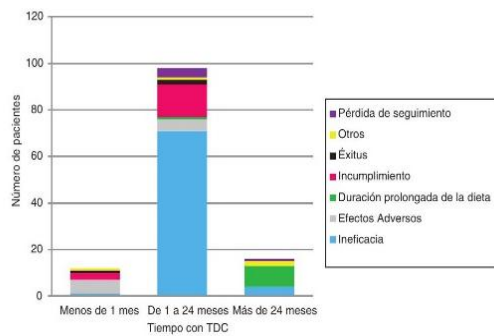
Eficacia <sup>a</sup>	3 meses (n = 126)	6 meses (n = 95)	12 meses (n = 62)	24 meses (n = 32)
Total de pacientes respondedores	67 (41,9%)	60 (37,5%)	46 (28,7%)	26 (16,2%)
Buena respuesta	31 (19,4%)	24 (15%)	13 (8%)	7 (4,4%)
Respuesta excelente	14 (8,7%)	16 (10%)	10 (6,2%)	2 (1,2%)
Libres de crisis	22 (13,7%)	20 (12,5%)	23 (14,4%)	17 (10,6%)

<sup>a</sup> La eficacia de la dieta se calculó comparando el número de crisis en cada periodo de seguimiento con las crisis antes de comenzar la dieta. Se consideraron respondedores los pacientes que presentaron una reducción de las crisis  $\geq 50\%$ . Se consideró buena respuesta si la reducción fue del 50-90%, respuesta excelente si la reducción era  $> 90\%$  y libres de crisis los que no habían tenido ninguna crisis epiléptica. Los porcentajes se han calculado por intención de tratar teniendo en cuenta el total de la muestra (160 pacientes).



**Figura 1** Eficacia de las terapias dietéticas cetogénicas (TDC) a lo largo del seguimiento en función de la edad al inicio de la dieta.

El color de las barras hace referencia a la edad de los pacientes al inicio de la dieta y el relleno a la respuesta. Se consideraron respondedores los pacientes que lograron una reducción de crisis de al menos un 50% con respecto al estado basal. m: Meses.



**Figura 2** Motivos de retirada de las terapias dietéticas cetogénicas (TDC) a lo largo del seguimiento.

**Discusión**

El presente estudio presenta la serie española más numerosa de pacientes pediátricos epilépticos tratados con TDC, y describe su eficacia y seguridad. En trabajos anteriores el 15% de los pacientes quedaban libres de crisis y  $> 30\%$  presentaba una reducción superior al 50%<sup>7,29-31</sup>. No se han

**Tabla 5** Efectos adversos precoces de las terapias dietéticas cetogénicas

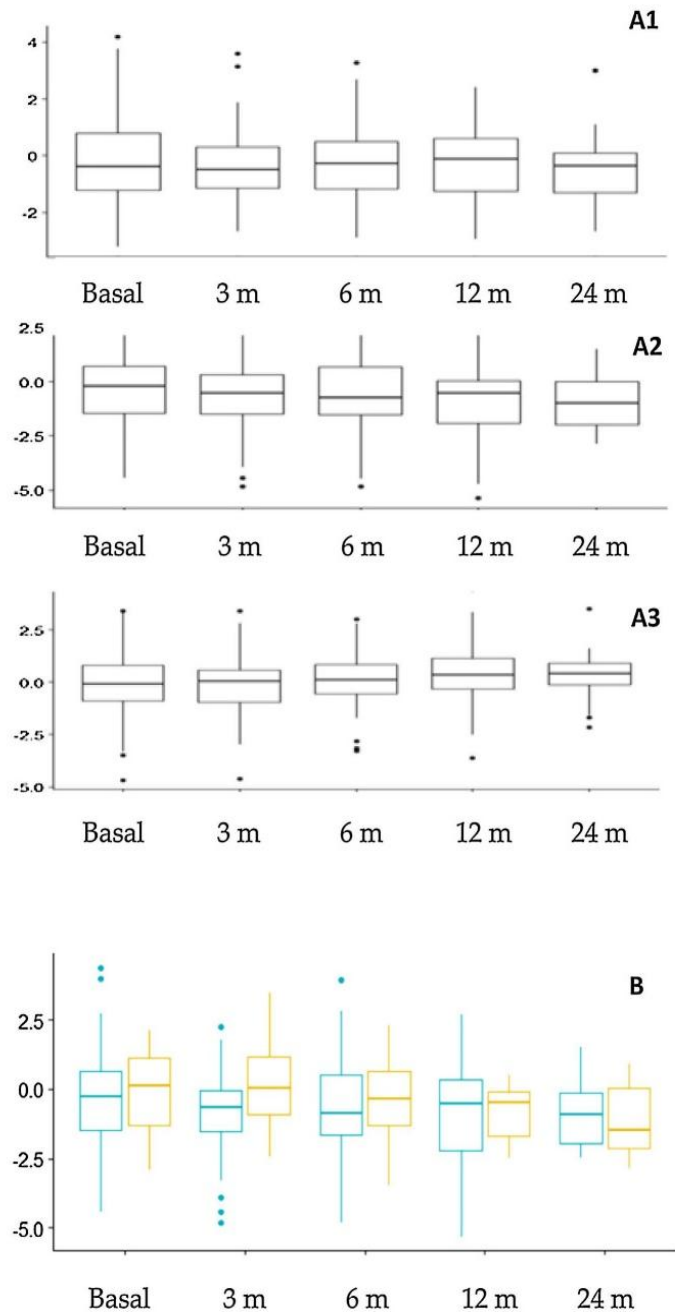
Tipo de dieta	Número de pacientes con efectos adversos precoces (%) <sup>a</sup>
DCC ratio 3:1 (n = 68)	35 (51,5)
DCC ratio 4:1 (n = 16)	11 (68,7)
DAM (n = 58)	23 (39,7)
DC-TCM (n = 2)	1 (50)
DC-TCM modificada (n = 16)	7 (43,7)

DAM: dieta de Atkins modificada; DCC: dieta cetogénica clásica; DC-TCM: dieta cetogénica con triglicéridos de cadena media.

<sup>a</sup> El porcentaje está calculado teniendo en cuenta el total de niños que comenzó cada tipo de dieta.

encontrado diferencias de eficacia en función de la edad, el tipo de convulsiones o de la dieta<sup>4,7,8</sup>. En nuestra cohorte el 12-15% quedó libres de crisis y el 41-16% presentó buena respuesta. Observamos que la DCC fue más efectiva, pero solo a los 3 y 12 meses. Algunos estudios aleatorizados han mostrado esta tendencia, aunque sus resultados no fueron estadísticamente significativos<sup>9</sup>.

A pesar de ser un tratamiento eficaz, la ineficacia es el motivo más frecuente de abandono en nuestra serie. La selección del paciente es importante para el éxito de las TDC. Se han demostrado más beneficios en<sup>32</sup>: SD-GLUT1, deficiencia de piruvato deshidrogenasa (PDH), síndromes de Doose, Ohtahara, Dravet y Angelman, enfermedad mitocondrial por deficiencia del complejo I y esclerosis tuberosa. Una cuarta parte de nuestros niños presentaba alguna de estas entidades. Quince de los pacientes con esos trastornos recibieron la TDC durante al menos 2 años, y la reducción de las convulsiones fue superior al 90% en todos los casos. Los pacientes con enfermedad metabólica fueron los que con mayor frecuencia quedaron libres de crisis, probablemente porque la mitad de ellos padecían SD-GLUT1 o deficiencia de PDH. Las TDC son el *gold estándar* para ambos trastornos, en los que el metabolismo cerebral está comprometido y las TDC proporcionan un sustrato alternativo. Entre los pacientes con enfermedad estructural la dieta también fue eficaz, pero en menos de la mitad de los casos. En este grupo etiológico las TDC pueden servir de puente hasta poder realizar el tratamiento quirúrgico definitivo, permitiendo una mejoría, aunque sea parcial, de las crisis y, en ocasiones, una reducción de los FAE y sus EA.



**Figura 3** Cambios antropométricos. A. Evolución de la puntuación z de peso (A1), talla (A2) e índice de masa corporal (A3) a lo largo del seguimiento. B. Comparación de la evolución del z score de talla según la edad al inicio de TDC. Naranja (derecha): Pacientes que comenzaron TDC *antes* de los 2 años de edad. Azul (izquierda): pacientes que comenzaron TDC *después* de los 2 años de edad.  
m: Meses; TDC: terapias dietéticas cetogénicas.

Los lactantes también se benefician de las TDC. Observamos que el 16-28% quedaron libres de crisis, y el 24-60% tuvo una buena respuesta. Nordli et al.<sup>33</sup> reportaron datos similares, y una revisión reciente concluye que las TDC, a pesar

de lo que se pensaba en el pasado, son seguras y eficaces para el tratamiento de la epilepsia refractaria, el SD-GLUT1 y la deficiencia de PDH en niños  $\leq 2$  años<sup>34</sup>. En este grupo de edad debe considerarse su uso precozmente debido a que

el cumplimiento es más fácil y la DCC debe ser de primera elección<sup>32</sup>.

Los EA no fueron una causa frecuente de retirada (excepto durante el primer mes) y fueron generalmente leves, transitorios y fáciles de tratar. Los EA digestivos fueron muy prevalentes, aunque menos que en otros estudios en los que ocurrieron en más de la mitad de los niños<sup>11,12</sup>. La hipercalcemia es un EA temido, ya que es asintomática y puede derivar en complicaciones graves como la nefrolitiasis. La hipercalcemia fue muy común, pero nuestra incidencia de litiasis fue mucho menor a lo reportado<sup>14</sup>. La monitorización permanente del cociente calcio/creatinina urinario y el uso temprano de citrato potásico cuando aparece la hipercalcemia probablemente sean las razones de nuestra baja incidencia. La dislipidemia fue también frecuente y se presentó precozmente, como en otras series<sup>15</sup>. El riesgo cardiovascular a largo plazo es controvertido, y se ha descrito la normalización del perfil lipídico a los 12 meses<sup>15</sup>. La hipercolesterolemia se produjo durante todo el seguimiento, mientras que nuestra incidencia de hipertrigliceridemia disminuyó al año. La dislipidemia pudo controlarse solo con modificaciones dietéticas, reemplazando las grasas saturadas (utilizadas para mejorar la palatabilidad de la dieta) por monoinsaturadas y poliinsaturadas.

Otra desventaja de las TDC es la restricción dietética. De hecho, la segunda razón para la retirada en nuestra cohorte fueron las dificultades de cumplimiento. Curiosamente, aunque la DCC es más restrictiva, el incumplimiento fue más frecuente entre los pacientes con DAM. La edad podría estar implicada en esta paradoja. La DCC suele indicarse en niños pequeños en los que es fácil controlar la alimentación, ya que se basa en fórmulas líquidas o alimentos triturados. A medida que el niño crece el cumplimiento puede volverse difícil. Esto, unido al hecho de que la DCC parece ser más eficaz en niños pequeños<sup>8</sup>, refuerza la indicación de DCC como primera opción en <2 años. Sin embargo, cuando aparecen dificultades de cumplimiento la sustitución de DCC o DAM por dietas menos restrictivas (como DBIG) puede ayudar a mantener el tratamiento.

El impacto de las TDC sobre el estado nutricional ha sido ampliamente estudiado<sup>16,17</sup>. La ingesta de calcio y vitamina D disminuye en las TDC. Además, sus niveles suelen estar bajos en niños con epilepsia grave, y esto puede conllevar la aparición de efectos graves como fracturas. En nuestra cohorte los niveles de selenio, carnitina y vitamina D, que generalmente se reducen con las TDC, mejoraron tras comenzar la dieta, ya que el déficit fue detectado basalmente y se prescribieron los suplementos pertinentes. Por ello, conviene destacar la importancia de una adecuada evaluación inicial. El efecto sobre el crecimiento es controvertido. El retraso del crecimiento puede afectar al 20-30%<sup>18-22,35</sup>, pero puede revertirse tras la retirada<sup>36</sup>. El tratamiento a largo plazo puede afectar significativamente a la talla, especialmente en los más pequeños<sup>37</sup>. Observamos diferencias estadísticamente significativas en los valores de la puntuación z de la talla durante el seguimiento, y el 15-24% de nuestros pacientes presentó valores <-2, especialmente los menores de 2 años al inicio de la TDC. Algunas causas relacionadas con el retraso del crecimiento incluyen la ingesta inadecuada de energía y proteínas, cetosis<sup>21,22</sup>,

acidosis y cambios endocrinos<sup>35</sup>. No encontramos diferencias significativas en la evolución del crecimiento según el tipo de dieta, que fue suficiente en proteínas en todos los casos. Sin embargo, debe considerarse que los niños <2 años siguieron DCC, y es precisamente este grupo de pacientes el más vulnerable. Sería útil identificar a los sujetos con mayor riesgo de retraso de crecimiento antes del inicio de TDC (<2 años) y durante el tratamiento (acidosis, cetosis, cambios endocrinos) para realizar un seguimiento más estrecho. Las TDC suelen mantenerse al menos 2 años. Sin embargo, en los espasmos infantiles (un tipo de convulsión altamente específica del periodo de lactante), no se encontraron diferencias en la tasa de recaída entre los pacientes libres de crisis que interrumpieron la dieta a los 8 meses o 2 años<sup>38</sup>. En vista del posible efecto sobre el crecimiento, especialmente en los lactantes, en estos casos se debe considerar una menor duración de la dieta<sup>39</sup>.

Los mecanismos de acción de las TDC continúan investigándose. La cetosis es uno de los más estudiados. Aunque menos de la mitad de nuestros pacientes presentaron niveles óptimos de beta-hidroxibutirato, la mayoría mejoraron. Esto sugiere la existencia de efectos anticonvulsivantes y neuroprotectores a través de otros mecanismos.

Nuestro trabajo presenta algunas limitaciones. Se trata de un estudio observacional y retrospectivo, el número de pacientes en cada grupo no fue el mismo y los protocolos de tratamiento utilizados no fueron exactamente iguales durante el periodo de estudio. Esto dificulta la extrapolación de los resultados a la práctica clínica, especialmente el hallazgo de que la DCC puede ser más eficaz. Además, es difícil determinar si las TDC son las únicas responsables del deterioro del crecimiento. La epilepsia en sí misma, enfermedades subyacentes y otros tratamientos pueden contribuir al impacto sobre el crecimiento.

En conclusión, las TDC son eficaces contra la epilepsia refractaria infantil. Los EA son frecuentes pero leves y fáciles de tratar. Los pacientes con TDC requieren un seguimiento estrecho por parte de personal cualificado con el fin de identificar y tratar los EA y controlar su crecimiento, ya que puede alterarse, especialmente en los niños de menor edad. Además, las TDC deben considerarse un tratamiento dinámico, pudiendo realizarse modificaciones dietéticas para reducir los EA, mejorar el cumplimiento o atenuar el impacto en el estado nutricional.

## Financiación

Este estudio no ha sido financiado por ninguna entidad.

## Conflicto de intereses

La Dra. Jana Ruiz Herrero ha participado en 2 cursos de dieta cetogénica patrocinados por Nutricia y ha recibido financiación para viajes de Nutricia.

La Dr. Cañedo Villarroya ha recibido honorarios y apoyo no financiero de Nutricia, Mead Johnson, Nestlé, Abbott y Orphan.

El Dr. García Peñas ha recibido honorarios de Nutricia, Sanofi, UCB, Eisai/Esteve, Bial y GW.

La Sra. Puerta Macfarland ha participado en 2 cursos de dieta cetogénica patrocinados por Nutricia.

La Dra. Consuelo Pedrón Giner ha desempeñado labores de consultora y ha recibido honorarios por conferencias de Nutricia, Vitaflor, Nestlé y Mead Jhonson; y ha recibido financiación para viajes de Nutricia, Vitaflor y Nestlé.

Las Sra. García Alcolea y Gómez Fernández no tienen conflicto de intereses que declarar.

## Bibliografía

- Xue-Ping W, Hai-Jiao W, Li-Na Z, Xu D, Ling L. Risk factors for drug-resistant epilepsy: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98:e16402.
- García-Ramos R, García Pastor A, Masjuan J, Sánchez C, Gil A. FEEN: Informe sociosanitario FEEN sobre la epilepsia en España. *Neurología*. 2011;26:548-55.
- Kossoff EH. International consensus statement on clinical implementation of the ketogenic diet: Agreement, flexibility, and controversy. *Epilepsia*. 2008;49 Suppl 8:11-3.
- Huttenlocher PR, Wilbourn AJ, Signore JM. Medium-chain triglycerides as a therapy for intractable childhood epilepsy. *Neurology*. 1971;21:1097-103.
- Kossoff EH, Dorward JL. The modified Atkins diet. *Epilepsia*. 2008;49 Suppl 8:37-41.
- Pfeifer HH, Thiele EA. Low-glycemic index treatment: A liberalized ketogenic diet for treatment of intractable epilepsy. *Neurology*. 2005;65:1810-2.
- Neal EG, Chaffe H, Schwartz RH, Lawson MS, Edwards N, Fitzsimmons G, et al. The ketogenic diet for the treatment of childhood epilepsy: A randomised controlled trial. *Lancet Neurol*. 2008;7:500-6.
- Kim JA, Yoon JR, Lee EJ, Lee JS, Kim JT, Kim HD, et al. Efficacy of the classic ketogenic and the modified Atkins diets in refractory childhood epilepsy. *Epilepsia*. 2016;57:51-8.
- Kim SH, Kang HC, Lee EJ, Lee JS, Kim HD. Low glycemic index treatment in patients with drug-resistant epilepsy. *Brain Dev*. 2017;39:687-92.
- Sondhi V, Agarwala A, Pandey RM, Chakrabarty B, Jauhari P, Lodha R, et al. Efficacy of ketogenic diet modified atkins diet, and low glycemic index therapy diet among children with drug-resistant epilepsy: A randomized clinical trial. *JAMA Pediatr*. 2020;174:944-51.
- Lin A, Turner Z, Doerr SC, Stanfield A, Kossoff EH. Complications during ketogenic diet initiation: Prevalence, treatment, and influence on seizure outcomes. *Pediatr Neurol*. 2017;68:35-9.
- Kang HC, Chung DE, Kim DW, Kim HD. Early and late-onset complications of the ketogenic diet for intractable epilepsy. *Epilepsia*. 2004;45:1116-23.
- Sampath A, Kossoff EH, Furth SL, Pyzik PL, Vining EP. Kidney stones and the ketogenic diet: Risk factors and prevention. *J Child Neurol*. 2007;22:375-8.
- McNally MA, Pyzik PL, Rubenstein JE, Hamdy RF, Kossoff EH. Empiric use of oral potassium citrate reduces symptomatic kidney stone incidence with the ketogenic diet. *Pediatrics*. 2009;124:e300-4.
- Kwiterovich PO, Vining EP, Pyzik P, Skolasky R, Freeman JM. Effect of a high-fat ketogenic diet on plasma levels of lipids, lipoproteins, and apolipoproteins in children. *JAMA*. 2003;290:912-20.
- Christodoulides SS, Neal EG, Fitzsimmons G, Chaffe HM, Jeanes YM, Aitkenhead H, et al. The effect of the classical and medium chain triglyceride ketogenic diet on vitamin and mineral levels. *J Hum Nutr Diet*. 2012;25:16-26.
- Coppola G, Epifanio G, Auricchio G, Federico RR, Resicoto G, Pascotto A. Plasma free carnitine in epilepsy children, adolescents and young adults treated with old and new antiepileptic drugs with or without ketogenic diet. *Brain Dev*. 2006;28:358-65.
- Neal EG, Chaffe HM, Edwards N, Lawson MS, Schwartz RH, Cross JH, et al. Growth of children on classical and medium chain triglyceride diets. *Pediatrics*. 2008;122:e334-40.
- Vining EP, Pyzik P, McGrogan J, Hladky H, Anand A, Kriegler S, et al. Growth of children on the ketogenic diet. *Dev Med Child Neurol*. 2002;44:796-802.
- Groleau V, Schall JI, Stallings VA, Bergqvist CA. Long-term impact of the ketogenic diet on growth and resting energy expenditure in children with intractable epilepsy. *Dev Med Child Neurol*. 2014;56:898-904.
- Peterson SJ, Tangney CC, Pimentel-Zablah EM, Hjelmgren B, Booth G, Berry-Karvis E. Changes in growth and seizure reduction in children on the ketogenic diet as a treatment for intractable epilepsy. *J Am Diet Assoc*. 2005;105:718-25.
- Spulber G, Spulber S, Hagen L, Dahlin M. Growth dependence on insulin-like growth factor-1 during the ketogenic diet. *Epilepsia*. 2009;50:297-303.
- World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations, United Nations University. Human Energy Requirements. Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation, Rome, Italy, 17-24 October 2001. Rome, 2004. Disponible en: [www.fao.org/ag/agn/nutrition/requirements.pubs.en.stm](http://www.fao.org/ag/agn/nutrition/requirements.pubs.en.stm).
- Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation on Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition (2002: Geneva, Switzerland). Protein and Amino acid Requirements in Human Nutrition: Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. WHO technical report series; no.935; WHO Press: Geneva, The Switzerland, 2007. Disponible en: [https://www.who.int/nutrition/publications/nutrientrequirements/WHO\\_TRS\\_935/en/](https://www.who.int/nutrition/publications/nutrientrequirements/WHO_TRS_935/en/).
- Holliday MA, Segar WE. Maintenance need for water in parenteral fluid therapy. *Pediatrics*. 1957;19:823-32.
- Institute of Medicine 2006. Dietary reference intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements. Washington, DC: The National Academies Press.
- Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética (FESNAD). Ingestas Dietéticas de Referencia (IDR) para la población española. *Act Diet*. 2010;14(4):196-7.
- Kossoff EH, Zupec-Kania BA, Amark PE, Ballaban-Gil KR, Bergqvist AGC, Blackford R, et al. Optimal clinical management of children receiving the ketogenic diet: Recommendations of the International Ketogenic Diet Study Group. *Epilepsia*. 2009;50:304-17.
- Caraballo R, Vaccarezza M, Cersósimo R, Ríos V, Soraru A, Arroyo H, et al. Long-term follow-up of the ketogenic diet for refractory epilepsy: Multicenter Argentinean experience in 216 pediatric patients. *Seizure*. 2011;20:640-5.
- Henderson CB, Filloux FM, Alder SC, Lyon JL, Caplin DA. Efficacy of the ketogenic diet as a treatment option for epilepsy: Meta-analysis. *J Child Neurol*. 2006;21:193-8.
- Keene DL. A systematic review of the use of the ketogenic diet in childhood epilepsy. *Pediatr Neurol*. 2006;35:1-5.
- Updated recommendations of the International Ketogenic Diet Study Group. Kossoff EH, Zupec-Kania BA, Auvin S, Ballaban-Gil KR, Bergqvist C, Blackford R, et al. Optimal clinical management of children receiving dietary therapies for epilepsy. *Epilepsia Open*. 2018;3:175-92.
- Nordli DR, Kuroda MM, Carroll J, Koenigsberger DY, Hirsch LJ, Bruner HJ, et al. Experience with the ketogenic diet in infants. *Pediatrics*. 2001;108:129-33.
- Falsaperla R, D'Angelo G, Praticò AD, Mauceri L, Barbagallo M, Pavone P, et al. Ketogenic diet for infants with epilepsy: A literature review. *Epilepsy Behav*. 2020;112:107361.
- Ferraris C, Guglielmetti M, Pasca L, de Giorgis V, Ferraro OE, Brambilla I, et al. Impact of the ketogenic diet on linear growth

J. Ruiz Herrero, E. Cañedo Villarroya, J.J. García Peñas et al.

---

- in children: A single-center retrospective analysis of 34 cases. *Nutrients*. 2019;11:1442.
36. Kim JT, Kang HC, Song JE, Lee MJ, Lee YJ, Lee EJ, et al. Catch-up growth after long-term implementation and weaning from ketogenic diet in pediatric epileptic patients. *Clin Nut*. 2013;32:98–103.
37. Ruiz Herrero J, Cañedo Villarroya E, García Peñas JJ, García Alcolea B, Gómez Fernández B, Puerta Macfarland LA, et al. Safety and effectiveness of the prolonged treatment of children with a ketogenic diet. *Nutrients*. 2020;12:306.
38. Kang HC, Lee YJ, Lee JS, Lee EJ, Eom S, You SJ, et al. Comparison of short- versus long-term ketogenic diet for intractable infantile spasms. *Epilepsia*. 2011;52:781–7.
39. Van der Low E, van de Hurk D, Neal E, Leiendecker B, Fitzsimon G, Doroty L, et al. Ketogenic diet guidelines for infants with refractory epilepsy. *Eur J Paediatr Neurol*. 2016;20:798–809.

## **7.4 CUARTO ARTÍCULO: EFFICACY AND SAFETY OF KETOGENIC DIETARY THERAPIES IN INFANCY. A SINGLE-CENTER EXPERIENCE IN 42 INFANTS LESS THAN TWO YEARS OF AGE.**

### **7.4.1 PRESENTACIÓN DEL ARTÍCULO**

#### **Autores:**

1. Jana Ruiz Herrero
2. Elvira Cañedo Villarroya
3. Isabel Pérez Sebastián
4. Beatriz Bernardino Cuesta
5. Consuelo Pedrón-Giner

**Revista:** Seizure- European Journal of Epilepsy. ISSN: 1059-1311.

Factor de impacto año 2020: 3,184. Factor de impacto de los últimos 5 años: 3,729.

Cite score año 2020: 5,0.

#### **Referencia completa:**

Ruiz Herrero J, Cañedo Villarroya E, Pérez-Sebastián I, Bernardino-Cuesta B, Pedrón-Giner C. **Efficacy and safety of ketogenic dietary therapies in infancy. A single-center experience in 42 infants less than two years of age.** Seizure 2021;92: 106-111. Doi: 10.1016/j.seizure.2021.08.018.

## 7.4.2 ARTÍCULO PUBLICADO

Seizure: European Journal of Epilepsy 92 (2021) 106–111



Contents lists available at ScienceDirect

Seizure: European Journal of Epilepsy

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/seizure](http://www.elsevier.com/locate/seizure)



### Efficacy and safety of ketogenic dietary therapies in infancy. A single-center experience in 42 infants less than two years of age

Jana Ruiz-Herrero<sup>a,\*</sup>, Elvira Cañedo-Villarroya<sup>b</sup>, Isabel Pérez-Sebastián<sup>c</sup>,  
Beatriz Bernardino-Cuesta<sup>d</sup>, Consuelo Pedrón-Giner<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Pediatric Gastroenterology, Pediatric Service, San Rafael Hospital, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Department of Gastroenterology and Nutrition, University Children's Hospital Niño Jesús, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Department of Pediatric Neurology, Pediatric Service, University Hospital La Moraleja, Madrid, Spain

<sup>d</sup> Department of Neurology, University Children's Hospital Niño Jesús, Madrid, Spain

#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

Ketogenic dietary therapies  
Classic ketogenic diet  
Infancy  
Epilepsy  
Drug resistant epilepsy

#### ABSTRACT

**Purpose:** Ketogenic dietary therapies (KDT) are high-fat and low-carbohydrate diets that may achieve seizure control and improve cognitive state. We describe our KDT experience in infants (children less than two years of age).

**Research methods & procedures:** We conducted a retrospective, descriptive and observational study of 42 infants treated with KDT between 2000-2018.

**Results:** The types of KDT started were: classic ketogenic diet ratio 3:1 (40), ratio 4:1 (1) and modified ketogenic diet with medium-chain triglycerides (1). Four patients switched to a modified Atkins diet. During follow-up, 79%, 57%, 38% and 17% of infants remained on KDT at 3, 6, 12 and 24 months, respectively. Seizure reduction  $\geq 50\%$  compared to baseline was achieved in 50%, 45%, 38% and 17% at 3, 6, 12 and 24 months, respectively. Seizure control was excellent (reduction  $>90\%$ ) in 33%, 31%, 26% and 12%, and seizure-free infants were 9, 9, 10 and 4, at different follow-up intervals, respectively. Sixty-three percent of infants with West syndrome were responders to KDT. Mean length of KDT was 390 days (16 days-4.9 years). Ineffectiveness was the reason for withdrawal in 50% of patients. Early adverse effects (during first month) occurred in 40% of infants. The most frequent early side effects were asymptomatic hypoglycemia and gastrointestinal disturbances. Late-onset side effects occurred in 55-14% of infants during therapy, and most frequent were hypercalciuria and dyslipidaemia.

**Conclusion:** KDT are useful and effective treatments in infancy. Side effects are frequent but mild and easy to manage.

#### 1. Introduction

Epilepsy is one of the major neurological disorders in childhood, and its incidence is higher during the first two years of life [1]. Seizure in infants may lead to severe cognitive problems and may seriously affect psychomotor development [2]. In addition, some severe epileptic encephalopathies typically appear in the first months of life. Pharmacological treatment of epilepsy in infancy is often ineffective, and up to one third of infants may have drug resistant epilepsy. In this group of patients, the use of multiple ineffective antiepileptic medicines (ASMs) may lead to progressive deterioration and the appearance of side effects that may worsen the patient's condition.

The ketogenic dietary therapies (KDT) are effective treatments for drug resistant epilepsy in childhood [3–7]. Most KDT are high-fat, low-carbohydrate diets. KDT are unbalanced diets that may lead to nutritional deficiencies and growth retardation. Infancy is a critical period for feeding, growth and cognitive development, so in the past, KDT were not recommended for infants. However, recent papers have described the effectiveness and safety of KDT in these ages [8–10], and guidelines for the management of KDT in infants have been published [11].

Classic ketogenic diet (CKD) 3:1 ratio (3 g of fat to 1 g of carbohydrates plus protein) is the most used KDT in infants because it allows sufficient protein intake [11]. Other ratios may be used based on ketosis,

\* Corresponding author at: San Rafael Hospital, Serrano Street, 199, 2016, Madrid, Spain.

E-mail addresses: [jana.ruizherrero@hotmail.com](mailto:jana.ruizherrero@hotmail.com) (J. Ruiz-Herrero), [consuelocarmen.pedron@salud.madrid.org](mailto:consuelocarmen.pedron@salud.madrid.org) (C. Pedrón-Giner).

<https://doi.org/10.1016/j.seizure.2021.08.018>

Received 10 February 2021; Received in revised form 24 June 2021; Accepted 25 August 2021

Available online 29 August 2021

1059-1311/© 2021 The Author(s). Published by Elsevier Ltd on behalf of British Epilepsy Association. This is an open access article under the CC BY-NC-ND

license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



side effects, and growth [11]. In the ketogenic diet with medium-chain triglycerides (MCT, KD-MCT), 71% of the total caloric intake comes from fat sources, 11% as natural food fat and 60% as MCT [12]. The modified KD-MCT allows higher natural food fat (41%). The modified Atkins diet (MAD) is a less restricted type of KDT that only restricts carbohydrates intake to 10 grams per day [13].

We describe our experience in infants (<2 years-old) with epilepsy. Our aim is to assess effectiveness, side effects, growth development and impact on nutritional status in infants on a KDT.

## 2. Methods

Medical patient's records of all the children who were on a KDT at the Niño Jesús Pediatric Hospital of Madrid (Spain) between January 2000 and December 2018 were reviewed. All infants (<2 year-old) were recruited for this retrospective observational descriptive study. Data were collected anonymously, the Committee for Ethics in Clinical Research approved the investigation (R-0002/15), and the relatives were informed and signed an informed consent.

Demographic data and information about the etiology of epilepsy, treatments used, KDT implemented, efficiency of KDT, adverse effects, laboratory blood and urine analyses, and anthropometry were collected. Anthropometric parameters were adjusted by sex and age according to the growth charts of the World Health Organization (WHO).

Patients underwent a thorough examination prior to KDT and then after the 1st, 3rd, 6th, 12th and 24th month, or before being weaned off the diet or being discharged. The effectiveness of KDT was measured by a reduction in ASMs and seizures. The reduction in seizures was graduated comparing to baseline as follows: 100% (seizure-freedom), 90%–100% improvement, 50%–90%, <50%, 0% (no improvement), or increase of the amount of seizures.

The diet started before 2009 was implemented following the John Radcliffe Hospital protocol [14]. Between 2009 and 2014, the recommendations of the International Ketogenic Diet Study Group [15] were followed to implement KDT. Since 2015, a protocol developed in our nutrition department was used, with similar recommendations to those published in recent guidelines [11,16]. The WHO energy requirements, on the basis of age and weight, were used. Energy requirements were calculated also in the basis of a food diary. Protein intake was calculated according to daily recommendations (1 g/kg/day in children > 1 year, and 1.5 in children ≤ 1 year). Needs of liquids were calculated according to Holliday–Segar method. All KDT were started in an inpatient setting. Most of the diets (40/42) were introduced increasing the ketogenic ratio progressively, without fasting or liquid restriction. Caloric restriction to 80% of basal energy needs was used in the introduction of the modified KD-MCT. KDT were administered orally in 29 patients (69%). Nasogastric tube was used in 12 (29%) and gastrostomy tube in 1 (2%). The type of diet and the route was modified in 9 children. Two patients needed a reduction in the ketogenic ratio. Four patients on a CKD switched to a MAD 4–35 months after the onset of KDT, all of them were ≥ 21 months-old and were on a KDT 16–60 months. Two patients needed a gastrostomy tube, and one infant who started KDT by nasogastric tube could continue orally 15 days after the onset. Only 15 patients were exclusively breastfed before treatment, and only two for at least six months. In all cases, breastfeeding was replaced by the ketogenic formula.

Variables were registered in an Excel program table and statistical analyses were carried out with SPSS version 16.0. Quantitative data were presented as mean and standard deviation for normal distributions, and median and interquartile range (IQR, 25th percentile 75th percentile) for data that do not follow normal distribution. Qualitative data were expressed as a percentage. Data were analysed on an intention-to-treat basis. Missing data were addressed by a complete case analysis. Loss to follow-up was addressed as missing data.

## 3. Results

Forty-two infants (21 males) started on a KDT. All of them had drug resistant epilepsy except one patient. She was suspected to have a glucose transporter type 1 deficiency syndrome (GLUT1DS) without seizure who had not been treated with ASMs. Mean number of ASMs tested prior KDT was 4.6 (± 2.3, range 0–10). Fourteen patients (33%) were treated with >5 ASMs, and 43% of children suffered side-effects from ASMs. Other treatments tested prior to KDT were: epilepsy surgery (1), gamma globulin (1), corticosteroids (6), adrenocorticotropic hormone (ACTH) (9), and other such as vitamin B6 and cofactors (31).

The specific etiology was unknown in 10 infants. Genetic disorders were the most frequent diagnosis (Table 1). Before the onset of KDT, two infants were in status epilepticus, and in five it could not be possible to count the number of daily seizure, so frequent they were. The median number of seizures among children who could count them was 7 per day (IQR 3–15). All patients with epilepsy had daily seizure. Most frequently type of seizures reported were tonic (33.3%), focal onset seizure (26.2%) and various type (14.3%). Generalized tonic-clonic seizures (4), myoclonic seizures (3), and clonic seizures (2) were less frequent. Only the patient with Angelman syndrome had typical absences. Eleven infants had West syndrome and two met the criteria of migrating focal epilepsy.

Median age at the beginning of symptoms was 3.9 months (IQR 53–

**Table 1**  
Etiological diagnosis of infants on a ketogenic dietary therapy.

Etiology	Frequency	Percent	Specific Etiology
Unknown	10	24	
Metabolic	6	14	3 GLUT1DS (1 confirmed SLC2A1 gene mutation) 2 mitochondrial diseases 1 neuronal ceroid lipofuscinoses
Structural	10	24	6 malformations of cortical development (5 cortical dysplasia, 1 lissencephaly) 2 cortical tuber (tuberous sclerosis complex) 1 leptomeningeal angioma (Sturge Weber) 1 hypoxic-ischemic encephalopathy (sepsis related)
Genetic disorders	14	33	10 gene mutation disorders 3 CDKL5 1 KCNQ2 1 STXBPI 1 SCN2A 1 CHRNA4 1 RBFOX1 1 CNTNAP2 (associated with dysplasia and Pitt Hopkins like syndrome) 1 PHOX2B (Ondine syndrome)) 4 chromosomal disorders 1 trisomy 21 (Down syndrome) 1 chromosome 15 duplication 1 chromosome 1p deletion 1 chromosome 15q deletion (Angelman syndrome)
Infection	2	5	1 Herpes simplex virus meningoencephalitis 1 Streptococcus pneumoniae meningitis

GLUT1DS: glucose transporter type 1 deficiency syndrome; SLC2A1: solute carrier family 2 member 1. CDKL5: cyclin dependent kinase-like 5; KCNQ2: potassium voltage-gated channel subfamily Q member 2; STXBPI: syntaxin binding protein 1; SCN2A: sodium voltage-gated channel alpha subunit 2; CHRNA4: cholinergic receptor nicotinic alpha 4 subunit; RBFOX1: RNA binding fox-1 homolog 1; CNTNAP2: contactin associated protein like 2; PHOX2B: paired like homeobox 2B.

181 days). Debut occurred within the first month of life in 21%, and in 76% within the first six months.

Median age at the onset of KDT was 7.7 months (IQR 4.5–16.7 months). Sixty-four patients started KDT <12 months-old, and 38% <6 months-old. Median time from debut to the onset of the diet was 114 days (IQR 64–281). Five patients started the diet within the first month of symptoms, 43% within three months from debut, and 79% within twelve months.

Only one infant was on a KDT between 2005 and 2010. Since 2010, 2–8 infants per year started a KDT. CKD 3:1 ratio was used in 40 patients. A modified KD-MCT was used only in a 21 months-old girl with structural epilepsy in 2005. A CKD 4:1 ratio was started in an 18 months-old boy with structural epilepsy in 2013. Both were withdrawn before 2 months of treatment due to ineffectiveness.

KDT was effective (seizure reduction  $\geq 50\%$  compared to baseline) in a half of patients in the first six months. Seizure control was excellent (seizure reduction  $>90\%$ ) in more than a quarter of our patients during the first year, and some patients were completely seizure-free (Table 2). Fig. 1 represents effectiveness according to type of seizure. According to the three main causes of epilepsy in our cohort, KDT was effective, throughout the follow-up, in 83–33% of children with metabolic disease, 43–14% of patients with a genetic disorder, and 30–10% of children with structural epilepsy. Patients with monogenic epilepsies and a seizure reduction  $\geq 50\%$  had mutations in CDKL5, KCNQ2 and STBP1. Within the patients with chromosomal disorders, KDT was effective only in the patient with Down syndrome, who was seizure-free. Among infants with West syndrome, were responders to KDT 63% of patients at 3 and 6 months, and only one of the patients with migrating focal epilepsy had a good response. The number of ASMs was reduced throughout the follow-up, specially in the first months from the onset of KDT (Table 3).

Median levels of betahydroxybutyrate were 4–4.4 mmol/L throughout the follow-up. Four patients at 3 months, and 2 at 6, 12 and 24 months, had low levels of ketones (<2.4 mmol/L) in blood monitoring.

Mean length of KDT was 390 days (16 days–4.9 years). Two patients withdrew within first month of therapy, 9 (21%) within 3 months, and 18 (43%) within 6 months. Seventeen infants (40%) were on a KDT for  $\geq 1$  year. Ineffectiveness was the reason for withdrawal in 50% of patients. Only 4 children stopped KDT due to side effects or poor tolerability (vomiting 16 days after the onset of KDT, hypertransaminasemia 4.5 months after, severe acidosis and dehydration 5 months after, and hypercalciuria and bone fracture due to poor liquid intake and parental refusal to nasogastric tube 21 months after). Three boys died during treatment from underlying disease. Six infants were on a KDT for more than two years. Of these, 3 continued with the diet when their medical record was reviewed, and the other three withdrew for prolonged treatment, without relapses after withdrawal.

Early adverse effects (during the first month) occurred in 40% of infants. The most frequent early side effects were asymptomatic hypoglycemia (9/42) and gastrointestinal disturbances (4/42), such as vomiting, constipation and diarrhea. At 3 and 6 months from the onset of KDT, 55% and 40% of infants suffered from late-onset side effects. Those percentages were reduced to 29% and 14% at 12 and 24 months. Most frequent late-onset adverse effects were hypercalciuria and dyslipidaemia (Table 4).

**Table 2**  
Effectiveness of ketogenic dietary therapies on seizure reduction.

Seizure reduction compared to baseline*	$\geq 50\%$	$\geq 90\%$	100%
3 months (n=33, 79%)	21 (50%)	14 (33%)	9 (21%)
6 months (n=24, 57%)	19 (45%)	13 (31%)	9 (21%)
12 months (n=16, 38%)	16 (38%)	11 (26%)	10 (24%)
24 months (n=7, 17%)	7 (17%)	5 (12%)	4 (9.5%)

\* The percentage of patients in the boxes has been calculated by intention to treat.

Before KDT, some disturbances in micronutrients and nutritional markers in blood were found. There were observed low levels of: prealbumin (<15 mg/dl) in 6 patients, retinol binding protein (RBP) (<2.5 mg/dl) in 4, selenium (<70 mcg/L) in 15, zinc (<70 mcg/dl) and phosphorus (<4.5 mg/dl) in 5, and vitamin B12 (<250 pg/ml), carnitine (<33  $\mu\text{mol/L}$ ), 25-hydroxyvitamin D (<20 ng/ml), and vitamin A (<0.2 mg/L) in 1. The only patient with a baseline vitamin D deficiency had also a vitamin B12 deficit. All patients with baseline zinc deficiency also had baseline selenium deficiency.

Throughout the follow-up, vitamin A, E and D were deficient in one child each. At 6 months, one child had zinc deficiency and two selenium deficit. At 12 months, 2, 4 and 2 children had deficits in zinc, selenium and phosphorus, respectively. At 24 months, deficiencies in phosphorus and selenium were observed in one child each. All these nutrient deficiencies were observed in patients other than those who were deficient at baseline, except for one child with baseline selenium deficiency who was also deficient at 12 months. Prealbumin and RBP was below normal values in 7 and 5 patients each at 6 and 12 months, and in 2 and 3 children, respectively, at 24 months. One of these patients had low levels of RBP from baseline and in all time slices. Only two children with baseline prealbumin below normal values had low levels at 6 and 12 months and only at 12 months, respectively.

Mild alteration of height (z score <-2) was observed in 14% of children baseline. Only one of the 6 patients with baseline height impairment continued with a height z score <-2 at 3 and 6 months. Two other patients with normal baseline z score of height had a decrease below -2 at 3 months and 12 months, respectively. Both children had a mild alteration of height at 24 months (Table 5 and Fig. S1). Only one child had a severe alteration of growth (z score of height <-3) at 6 months. Weight was normal in most patients baseline and after KDT. The z-score of body mass index (BMI) and head circumference were altered in some infants, especially at baseline (Table 5).

#### 4. Discussion

KDT were not recommended for infancy in the past because they were considered inappropriate and unsafe at this stage of life. In our hospital, KDT has been onset in childhood since 2000. However, it was not until 10 years later when we began to prescribe them routinely in children younger than 2 years old. Our study confirms that KDT are useful and safety treatments for infants. At 6 months, 45–50% of infants in our cohort had a good response, and a quarter had an excellent response or were seizure-free. Nordli and coauthors [17] first described the use of KDT in 32 infants and their results were similar. Twenty percent of their patients were seizure-free, and an additional 35% had a good response. More recent studies confirmed the good results of KDT in the treatment of infantile spasms [18–21], the most common seizure type in infants. Some studies have even shown that KDT are as effective as ACTH and have lower rates of side effects and relapse [22]. In our cohort, more than half of the infants with spasms and West syndrome were diet responders. Another epileptic syndrome in infants in which KDT has been described to be effective is the migrating focal epilepsy [23,24]. In our series, there were only two patients with this syndrome, and KDT was effective in only one of them. The patients with a metabolic disease were the most frequently responders in our cohort, probably because a half of our patients in this group suffered from GLUT1DS, and KDT is the gold standard treatment for the disorders in which brain metabolism is compromised, due to KDT provides an alternative substrate. Two recent reviews concluded that KDT are safe and effective for the treatment of drug resistant epilepsy, GLUT1DS and pyruvate dehydrogenase deficiency in children  $\leq 2$  years [25,26]. Comparing effectiveness of KDT in infants versus older children, seizure freedom is more often achieved and maintained in infants, and acceptance is better [27].

The onset of epilepsy in the first years of life is usually associated with poor prognosis, intractability, and even increased death risk [2]. In our study, three patients (7%) died from underlying disease, and 30%

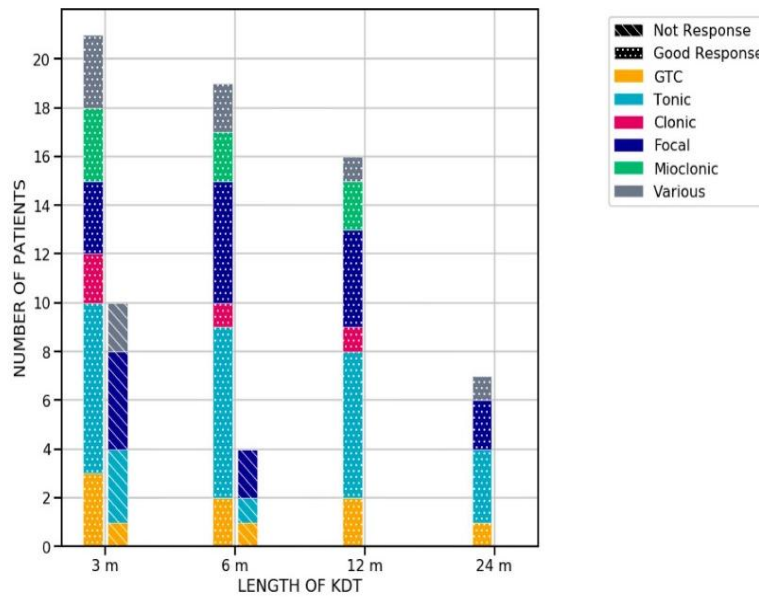


Fig. 1. Effectiveness of ketogenic dietary therapies according to type of seizures. KDT: ketogenic dietary therapies. m: months. GTC: generalized tonic clonic.

**Table 3**  
Effectiveness of ketogenic dietary therapies (KDT) on the number of antiseizure medicines (ASMs) prescribed.

	A month prior to KDT	3 months*	6 months*	12 months	24 months
Number of ASMs prescribed	3 (7%)	5 (12%)	5 (12%)	4	3 (7%)
≤ One ASM	13 (31%)	14	7 (17%)	6 (14%)	1
Two ASMs	13 (31%)	(33%)	8 (19%)	5 (12%)	(2.4%)
Three ASMs	13 (31%)	11	3 (7%)	5 (12%)	2
≥ Four ASMs		(26%)	1	1	(4.8%)
		1 (2.4%)		(2.4%)	1
					(2.4%)
Patients in whom the number of ASMs was reduced	-	16 (35%)	4 (9.5%)	2 (4.8%)	2 (4.8%)
Mean of ASMs prescribed (SD)	3 (1.4)	2.3 (0.8)	2.4 (1.1)	2.2 (0.9)	2.1 (1.2)

SD: standard deviation. \*Number of ASMs was not registered in two patients at 3 months and in one at 6 months.

of infants were tube-fed. The need for a feed tube was indicative of how severe the patients were, but it was also an opportunity to start the diet, since the tube facilitated the management of KDT. Although the age at the onset of KDT was not related to seizure outcome in a recent paper [28], the control of seizures should be achieved as soon as possible, in order to avoid a progressive neurological deterioration, and ineffective and potentially harmful pharmacological treatments. In our cohort, the delay in the onset of KDT from the onset of symptoms was 4 months, and the mean ASMs tested before the diet was four. The International League Against Epilepsy defined drug resistant epilepsy as failure of adequate trials of two tolerated and appropriately chosen and used ASMs schedules [29]. Maybe an earlier use of the diet would have improved the results of our patients.

The most frequent used and recommended type of KDT in infancy is CKD ratio 3:1 [11,30] because it meets protein requirements for a proper growth. The ratio can be adjusted based on acceptance, adverse effects, ketosis, or intercurrent situations. In younger infants, the use of

**Table 4**  
Early and late-onset secondary effects of ketogenic dietary therapies in infants.

Side effects*	≤ 1 month	1-3 months	3-6 months	6-12 months	≥ 24 months
GI disturbance	4	1	2	1	1
Hypoglycemia	9	1	1	0	0
Hypercalciuria	2	6	7	2	1
Acidosis	0	0	2	6	1
Hypertriglyceridemia	1	19	12	3	0
Hypercholesterolemia	1	5	8	7	3
Hyperuricemia	1	6	7	3	2
Increased liver enzymes	0	8	3	4	1
Dehydration	0	1	1	1	1
Anorexia	0	1	0	0	0

\* Hypoglycemia: glucose <50 mg/dL. Hypercalciuria: urine calcium/creatinine ratio >0.50. Acidosis: pH <7.30. Hypertriglyceridemia: tryglicerides >115 mg/dL. Hypercholesterolemia: cholesterol >200 mg/dL. Hyperuricemia: uric acid >6 mg/dL. Increased liver enzymes: aspartate aminotransferase (AST) >50 IU/L and/or alanine aminotransferase (ALT) >50 IU/L and/or gamma glutamyl transpeptidase (GGT) >35 IU/L.

commercialized formulas facilitates compliance and its management by caregivers. Most of the infants in our cohort were formula-fed before KDT, as their neurological status probably made breastfeeding difficult. We replaced breastfeeding for the ketogenic formula in all cases, but there are even studies in infants on a CKD maintaining breastfeeding [31]. However, with the beginning of solid food, problems of adherence may appear. In these cases, the diet must be individualized, and it is even possible to switch CKD to a less restrictive KDT such as MAD, as we did in four patients with good outcome and prolonged duration of therapy.

Side effects were frequent in our cohort, but only four infants withdrew due to adverse effects or poor tolerability. Our data are similar to those published by Dressler in a recent review [30]. Most frequent side effects were hypoglycemia and gastrointestinal disturbances in a short-term, and dyslipidemia and hypercalciuria in a long-term. Side effects were mild and were alleviated with dietary modifications or commonly used drugs. A recent randomized controlled trial showed that KDT had fewer and less severe side effects than ACTH for infantile spasms [32], so KDT should be considered safe therapies in infancy.

**Table 5**

Z-score of body mass index (BMI), height, weight, and head circumference, and number of patients with alterations in those z-score, baseline and throughout the follow-up.

Time on the Diet		Baseline	3 Months	6 Months	12 Months	24 Months
BMI	z < -2	4	2	1	1	0
	z > +2	1	0	1	2	1
	Mean z-score (SD)	-0.2 (1.24)	-0.32 (1.14)	-0.04 (1.26)	0.65 (1.8)	0.49 (1.7)
Height	z < -2	6	2	2	1	2
	Mean z-score (SD)	-0.15 (1.5)	0.22 (1.55)	-0.43 (1.38)	-0.77 (0.98)	-1.09 (1.5)
Weight	z < -2	1	1	1	0	1
	z > +2	0	0	0	0	1
	Mean z-score (SD)	-0.29 (1.09)	-0.1 (1.06)	-0.31 (0.91)	-0.03 (1.10)	-0.44 (1.8)
Head circumference	z < -2	6	5	3	2	2
	z > +2	1	2	1	1	0
	Mean z-score (SD)	-0.86 (1.77)	-0.44 (1.92)	-0.8 (1.52)	-0.72 (2.4)	-1.2 (1.5)

SD: standard deviation

Nutritional deficiencies have been reported in children on KDT. Selenium, carnitine, magnesium and other nutrients have been described to be deficient in these diets [33,34]. In addition, children with drug resistant epilepsy are at risk of vitamin D deficiency [35], and taking anticonvulsant medication may be associated with other deficiencies [34]. In our study, the most frequent deficiencies observed before KDT were zinc, selenium, and phosphorus. These deficits improved after the onset of KDT. Only one patient had vitamin D deficiency baseline, probably because all infants younger than 1 year are supplemented with the recommended daily requirements of vitamin D in Spain.

Growth retardation in children on a KDT has been reported [36,37] as we have shown in our cohort, and younger children may be at greater risk [38], especially after prolonged treatment [39]. In a study on infantile spasms, no differences in the rate of seizure relapse were found between seizure-free patients who discontinued the diet at 8 months or 2 years [40], so a shorter length of KDT should be considered in these cases [11].

Although the number of patients in our study is small, it is higher than some other previously published cohorts. Despite our sample size and the retrospective design, the present paper adds evidence to support the effectiveness and safety of KDT in infants.

## 5. Conclusion

KDT are effective and safety treatments for epilepsy in infancy. The most accepted type of KDT is CKD ratio 3:1. Adverse effects, although common, are usually mild and easy to treat. Close monitoring is important to detect side effects, nutritional deficiencies, and anthropometric disturbances. Growth should be closely controlled in this crucial stage of life, and modifications in protein or calories intake should be done if height or weight are affected.

## Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.seizure.2021.08.018](https://doi.org/10.1016/j.seizure.2021.08.018).

## References

- Wirrell EC, Grossardt BR, Wong-Kissiel LC, Nickels KC. Incidence and classification of new-onset epilepsy and epilepsy syndromes in children in Olmsted County, Minnesota from 1980–2004: a population-based study. *Epilepsy Res* 2011;95(1–2): 110–8. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2011.03.009>.
- Wirrell E, Wong-Kissiel L, Mandrekar J, Nickels KC. Predictors and course of medically intractable epilepsy in young children presenting before 36 months of age: a retrospective, population-based study. *Epilepsia* 2012;53(9):1563–9. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03562.x>.
- Vining EP, Freeman JM, Ballaban-Gil K, Camfield CS, Camfield PR, Holmes GL, et al. A multicenter study of the efficacy of the ketogenic diet. *Arch Neurol* 1998;55(11):1433–7. <https://doi.org/10.1001/archneur.55.11.1433>.
- Freeman JM, Vining EP, Pillas DJ, Pyzik PL, Casey JC, Kelly LM. Efficacy of the ketogenic diet-1998: a prospective evaluation of intervention in 150 children. *Pediatrics* 1998;102(6):1358–63. <https://doi.org/10.1542/peds.102.6.1358>.
- Henderson CB, Filloux FM, Alder SC, Lyon JL, Caplin DA. Efficacy of the ketogenic diet as a treatment option for epilepsy: meta-analysis. *J Child Neurol* 2006;21(3): 193–8. <https://doi.org/10.2310/7010.2006.00044>.
- Neal EG, Chaffe H, Schwartz RH, Lawson MS, Edwards N, Fitzsimmons G, Whitney A, Cross JH. The ketogenic diet for the treatment of childhood epilepsy: a randomized controlled trial. *Lancet Neurol* 2008;7(6):500–6. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70092-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70092-9).
- Kim JA, Yoon JR, Lee EJ, Lee JS, Kim JT, Kim HD, Kang HC. Efficacy of the classic ketogenic and the modified Atkins diets in refractory childhood epilepsy. *Epilepsia* 2016;57:51–8. <https://doi.org/10.1111/epi.13256>.
- Wirrell E, Eckert S, Wong-Kissiel L, Payne E, Nickels K. Ketogenic diet therapy in infants: efficacy and tolerability. *Pediatr Neurol* 2018;82:13–8. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2017.10.018>.
- Ismayilova N, Leung MA, Kumar R, Smith M, Williams RE. Ketogenic diet therapy in infants less than two years of age for medically refractory epilepsy. *Seizure* 2018; 57:5–7. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2018.02.014>.
- Riantarini I, Kim HD, Ko A, Kim SH, Kang HC, Lee JS, et al. Short- and long-term seizure-free outcomes of dietary treatment in infants according to etiology. *Seizure* 2019;71:100–4. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2019.06.002>.
- Van der Louw E, van den Hurk D, Neal E, Leidecker B, Fitzsimmon G, Dority L, et al. Ketogenic diet guidelines for infants with refractory epilepsy. *Eur J Paediatr Neurol* 2016;20(6):798–809. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2016.07.009>.
- Huttenlocher PR, Wilbourn AJ, Signore JM. Medium-chain triglycerides as a therapy for intractable childhood epilepsy. *Neurology* 1971;21:1097–103. <https://doi.org/10.1212/wnl.21.11.1097>.
- Kossoff EH, Dorward JL. The modified Atkins diet. *Epilepsia* 2008;49(Suppl 8): 37–41. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01831.x>.
- Schwartz RH, Eaton J, Bower BD, Aynsley-Green A. Ketogenic diets in the treatment of epilepsy: short term clinical effects. *Dev Med Child Neurol* 1989;31: 145–51.
- Kossoff EH, Zupec-Kania BA, Amark PE, Ballaban-Gil KR, Bergqvist AGC, 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. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01765.x>.
- Kossoff EH, Zupec-Kania BA, Auvin S, Ballaban-Gil KR, Bergqvist AGC BR, Buchhalter JR, Caraballo RH, Cross JH, Dahlin MG, et al. Optimal clinical management of children receiving dietary therapies for epilepsy: updated recommendations of the International ketogenic diet study group. *Epilepsia Open* 2018;3:175–92. <https://doi.org/10.1002/epi4.12225>.
- Nordli DR, Kuroda MM, Carroll J, Koenigsberger DY, Hirsch LJ, Bruner HJ, et al. Experience with the ketogenic diet in infants. *Pediatrics* 2001;108(1):129–33. <https://doi.org/10.1542/peds.108.1.129>.
- Eun SH, Kang HC, Kim DW, Kim HD. Ketogenic diet for treatment of infantile spasms. *Brain Dev* 2006;28(9):566–71. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2006.03.011>. *Brain Dev.* 2006;28(9):566–71.
- Pires ME, Ilea A, Bourel E, Bellavoine V, Merdaru D, Berquin P, et al. Ketogenic diet for infantile spasms refractory to first-line treatments: an open prospective study. *Epilepsy Res* 2013;105(1–2):189–94. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2012.11.009>.
- Kayyali HR, Gustafson M, Myers T, Thompson L, Williams M, Abdelmoity A. Ketogenic diet efficacy in the treatment of intractable epileptic spasms. *Pediatr Neurol* 2014;50(3):224–7. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2013.11.021>.
- Hong AM, Turner Z, Hamdy RF, Kossoff EH. Infantile spasms treated with the ketogenic diet: prospective single-center experience in 104 consecutive infants. *Epilepsia* 2010;51(8):1403–7. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02586.x>.
- Kossoff EH, Hedderick EF, Turner Z, Freeman JM. A case-control evaluation of the ketogenic diet versus ACTH for new-onset infantile spasms. *Epilepsia* 2008;49(9): 1504–9. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01606.x>.

- [23] Caraballo R, Noli D, Cachia P. Epilepsy of infancy with migrating focal seizures: three patients treated with the ketogenic diet. *Epileptic Disord* 2015;17(2):194–7. <https://doi.org/10.1684/epd.2015.0741>.
- [24] Armeno M, Verini A, Araujo MB, Reyes G, Caraballo RH. Ketogenic parenteral nutrition in three paediatric patients with epilepsy with migrating focal seizures. *Epileptic Disord* 2019;21(5):443–8. <https://doi.org/10.1684/epd.2019.1095>.
- [25] Falsaperla R, D'Angelo G, Praticò AD, Mauceri L, Barbagallo M, Pavone P, et al. Ketogenic diet for infants with epilepsy: a literature review. *Epilepsy Behav* 2020; 112:107361. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2020.107361>.
- [26] Lyons L, Schoeler NE, Langan D, Cross JH. Use of ketogenic diet therapy in infants with epilepsy: a systematic review and meta-analysis. *Epilepsia* 2020;61:1261–81. <https://doi.org/10.1111/epi.16543>.
- [27] Dressler A, Trimmel-Schwahofer P, Reithofer E, Gröppel G, Mühlebner A, Samuelli S, et al. The ketogenic diet in infants - advantages of early use. *Epilepsy Res* 2015;116:53–8. <https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2015.06.015>.
- [28] Kim SH, Shaw A, Blackford R, Lowman W, Laux LC, Millichap JJ, et al. The ketogenic diet in children 3 years of age or younger: a 10-year single-center experience. *Sci Rep* 2019;9(1):8736. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45147-6>.
- [29] Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, Brodie MJ, Hauser WA, Mathern G, Moshé SL, Perucca E, Wiebe S, French J. Definition of drug resistant epilepsy. Consensus proposal by the ad hoc task force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia* 2010;51(6):1069–77. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02397.x>. Jun.
- [30] Dressler A, Trimmel-Schwahofer P. The ketogenic diet for infants: how long can you go? *Epilepsy Res* 2020;164:106339. <https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2020.106339>.
- [31] Le Pichon JB, Thompson L, Gustafson M, Abdelmoity A. Initiating the ketogenic diet in infants with treatment refractory epilepsy while maintaining a breast milk diet. *Seizure* 2019;69:41–3. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2019.03.017>.
- [32] Dressler A, Benninger F, Trimmel-Schwahofer P, Gröppel G, Porsche B, Abraham K. Efficacy and tolerability of the ketogenic diet versus high-dose adrenocorticotrophic hormone for infantile spasms: a single-center parallel-cohort randomized controlled trial. *Epilepsia* 2019;60(3):441–51. <https://doi.org/10.1111/epi.14679>.
- [33] Christodoulides SS, Neal EG, Fitzsimmons G, et al. The effect of the classical and medium chain triglyceride ketogenic diet on vitamin and mineral levels. *J Hum Nutr Diet* 2012;25:16–26. <https://doi.org/10.1111/j.1365-277X.2011.01172.x>.
- [34] Coppola G, Epifanio G, Auricchio G, et al. Plasma free carnitine in epilepsy children, adolescents and young adults treated with old and new antiepileptic drugs with or without ketogenic diet. *Brain Dev* 2006;28:358–65. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2005.11.005>.
- [35] Bergqvist AG, Schall JI, Stallings VA. Vitamin D status in children with intractable epilepsy, and impact of the ketogenic diet. *Epilepsia* 2007;48:66–71. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00803.x>.
- [36] Groleau V, Schall JI, Stallings VA, Bergqvist CA. Long-term impact of the ketogenic diet on growth and resting energy expenditure in children with intractable epilepsy. *Dev Med Child Neurol* 2014;56:898–904. <https://doi.org/10.1111/dmcn.12462>.
- [37] Ferraris C, Guglielmetti M, Pasca L, De Giorgis V, Ferraro OE, Brambilla I, et al. Impact of the ketogenic diet on linear growth in children: a single-center retrospective analysis of 34 cases. *Nutrients* 2019;11(7):1442. <https://doi.org/10.3390/nu11071442>.
- [38] Vining EP, Pyzik P, McGrogan J, Hladky H, Anand A, Krieglger S, et al. Growth of children on the ketogenic diet. *Dev Med Child Neurol* 2002;44(12):796–802. <https://doi.org/10.1017/s0012162201002961>.
- [39] Ruiz Herrero J, Cañedo Villarroya E, García Peñas JJ, García Alcolea B, Gómez Fernández B, Puerta Macfarland LA, et al. Safety and effectiveness of the prolonged treatment of children with a ketogenic diet. *Nutrients* 2020;12(2):306. <https://doi.org/10.3390/nu12020306>.
- [40] Kang HC, Lee YJ, Lee JS, Lee EJ, Eom S, You SJ, et al. Comparison of short- versus long-term ketogenic diet for intractable infantile spasms. *Epilepsia* 2011;52(4): 781–7. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02940.x>.

## **7.5 QUINTO ARTÍCULO: TRANSCRIPTOMIC PROFILE OF EPILEPTIC CHILDREN TREATED WITH KETOGENIC THERAPIES.**

### **7.5.1 PRESENTACIÓN DEL ARTÍCULO**

#### **Autores:**

1. Jana Ruiz Herrero
2. Gloria Olaso-González
3. Eva Serna
4. Elvira Cañedo Villarroya
5. Ángela García Correas
6. Juan Gambini
7. Mari Carmen Gómez Cabrera
8. Consuelo Pedrón-Giner
9. José Viña

**Revista:** Journal of Integrative Neuroscience. ISSN: 0219-6352.

Factor de impacto año 2020: 2,117. Cite score año 2020: 1,8.

#### **Referencia completa:**

Ruiz Herrero J, Olaso-González G, Serna E, Cañedo-Villarroya E, Correas AG, Gambini J, Gómez-Cabrera MC, Pedrón-Giner C, Viña J. Transcriptomic profile of epileptic children treated with ketogenic therapies. En prensa.

## 7.5.2 ARTÍCULO PUBLICADO



Original Research

## Transcriptomic profile of epileptic children treated with ketogenic therapies

Jana Ruiz-Herrero<sup>1,\*†</sup>, Gloria Olaso-Gonzalez<sup>2,\*†</sup>, Eva Serna<sup>2</sup>, Elvira Cañedo-Villarroya<sup>3</sup>, Angela G. Correas<sup>2</sup>, Juan Gambini<sup>2</sup>, Mari Carmen Gomez-Cabrera<sup>2</sup>, Consuelo Pedrón-Giner<sup>3,§</sup>, Jose Vina<sup>2,§</sup>

<sup>1</sup> Department of Pediatric Gastroenterology, Pediatric Service, San Rafael Hospital, 2016 Madrid, Spain

<sup>2</sup> Freshage Research Group, Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Valencia, CIBERFES, Fundación Investigación Hospital Clínico Universitario/INCLIVA, 46010 Valencia, Spain

<sup>3</sup> Department of Gastroenterology and Nutrition, Niño Jesús Pediatric Hospital, 28009 Madrid, Spain

\*Correspondence: gloria.olaso@uv.es (Gloria Olaso-Gonzalez); jana.ruizherrero@hotmail.com (Jana Ruiz-Herrero)

† These authors contributed equally.

§ These authors jointly supervised this work.

DOI:10.31083/?

This is an open access article under the CC BY 4.0 license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Submitted: 5 August 2021 Revised: 6 September 2021 Accepted: 22 September 2021 Published: ???

**Background:** Ketogenic dietary therapies (KDT) are used as a treatment in childhood epilepsy. However, their mechanism has not yet been established. The main objective of this study was to determine the changes in the transcriptomic profile induced by KDT in children with epilepsy in order to shed light on its possible mechanisms. **Methods:** Eight children with refractory epilepsy were enrolled in the study. Peripheral blood mononuclear cells were obtained before and after the children were treated with KDT for a minimum of 6 months. RNA was extracted and mRNA and miRNA profiling were performed and analyzed. **Results:** Our intervention with KDT significantly reduced the seizure number in seven of the eight paediatric patients treated and caused important changes in their gene expression profile. Our study reveals modifications in the transcription of 4630 genes and 230 miRNAs. We found that the genes involved in the protection against epileptic crises were among those mainly changed. These genes collectively encode for ion channels, neurotransmitter receptors, and synapse structural proteins. **Conclusions:** Together our results explain the possible mechanisms of KDT and reinforce its clinical importance in the treatment of epilepsy.

### Keywords

Epilepsy; Ketogenic diet; Ketogenic dietary therapies; Transcriptome; Anticonvulsant; Synapsis; miRNome

### 1. Introduction

The global incidence of epilepsy is about 60 per 100,000 inhabitants per year, and up to a third of patients may suffer from refractory epilepsy [1, 2]. An alternative treatment to antiseizure medications (ASM) are the ketogenic dietary therapies (KDT), which have been used as a treatment for refractory epilepsy in children since the 1920s [3]. The most commonly-used KDT are Classic KD (CKD), KD (ketogenic diet) with medium chain triglycerides (MCT, MCT-KD) and the modified Atkins diet (MAD) [4]. CKD is a high-fat diet (about 90% of the energy intake) with mostly long chain triglycerides (LCT), very low carbohydrate content and ad-

equate amount of proteins [5]. The most commonly recommended ratios are 3:1 or 4:1, which means that for every 3 or 4 g of fat, 1 g of protein and carbohydrates is administered. The MCT-KD was proposed in 1971 by Huttenlocher and co-workers [6]. In this diet, part of the fat is supplied in the form of MCT oil. MCT are quickly metabolized, ketosis is achieved faster, and ratios 1.2:1 can be used. The MAD is less restrictive than the previous ones because, although carbohydrates are limited to 10 g/day, a free intake of proteins and lipids is allowed [7]. In clinical practice it is also common to supplement the MAD with preparations containing CKD components to increase ketosis [8]. Regardless of the type of KDT, they all seem to be neuroprotective and there is no clear evidence for different efficiency between CKD and MCT-KD [9] or MAD [10]. However, the molecular pathways involved in these antiseizure mechanisms have not yet been established.

Recent research highlights the role of ketone bodies and polyunsaturated fatty acids in the modulation of the KD-induced neuroprotection [4, 11–13]. The neuroprotective mechanisms include an increase in the cellular mitochondrial function and biogenesis [14], a decrease in oxidative stress [15], changes in potassium channels [15, 16], an increase in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) [17] and in the purinergic and GABAergic neurotransmission [18], attenuation of neuroinflammation, or even changes in gut microbiota [13, 19].

Epigenetic processes are related to changes in neuronal activity and epileptogenesis. Molecular mediators of epigenetics include non-coding RNAs, methylation of DNA and histone modifications [20]. Therapies for epilepsy, including KDT, may bear an influence on epigenetic processes [21].

Transcriptomic analysis allows the study of changes in gene expression in different human diseases as well as the effect of potential interventions with clinical relevance [22]. A

massive analysis of gene expression allows the detection of broad coordinated trends which cannot be discerned by more targeted assays.

Our major aim was to determine the changes in gene expression induced by a 6-month treatment with KDT in children with epilepsy to shed light on the potential mechanisms of this type of diets. This is, as far as we are aware, the first transcriptomic study in epileptic children who have followed KDT.

## 2. Materials and methods

All methods were performed in accordance with the relevant guidelines [23] and regulations. All experimental procedures were approved by the Committee on Ethics in Clinical Research and an informed consent was signed before obtaining the samples.

### 2.1 Patients and intervention

Eight children with refractory epilepsy and treated with KDT were recruited for our study at the University Children's Hospital Niño Jesús of Madrid (Spain). The effect of KDT on epilepsy was quantified according to the reduction in the number of seizures comparing to the baseline state [24]. The parents quantified the number of seizures suffered by the children in the month prior to starting the diet and this was considered the number of baseline seizures. In each follow-up evaluation the parents reported the number of seizures per month that the children had suffered. The percentage of seizure reduction in each medical check-up was calculated taking into account the baseline value, as follows: 100% (seizure-freedom), 90%–100% improvement, 50%–90%, <50%, 0% (no improvement), or increase of seizures.

### 2.2 Sample collection

Blood (approximately 5 mL) was drawn into a VACU-TAINER CPT (BD, Franklin Lakes, NJ) containing sodium heparin as anticoagulant and was gently inverted five times. Blood was immediately processed according to the manufacturer's instructions by centrifugation at  $3000 \times g$  at room temperature for 15 minutes. The supernatant (plasma) was removed and the buffy coat containing mononuclear cells collected. Mononuclear cells were washed twice in PBS and frozen at  $-80^\circ\text{C}$  for subsequent RNA isolation.

### 2.3 RNA extraction

Total RNA was isolated from mononuclear cells using the Trizol reagent (TRIzol, Invitrogen, Thermo-Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA). RNA integrity number (RIN) was tested with the 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and RNA concentration and purity were determined using a spectrophotometer (GeneQuant, GE Healthcare Biosciences, German).

### 2.4 Gene expression profiling

mRNA profiling was performed using Clariom D-Human Array (Life technologies, SIF: A28139434). This array comprises >542,000 transcripts constituting over 134,000 gene-

level probe sets. Microarray experiments were conducted according to the manufacturer's instructions (Life technologies, SIF: A28139434). 300 ng of total RNA were labeled using Genechip WT Plus Reagent Kit. The labeling reaction was hybridized on the Human Gene Array in Hybridization Oven 645 at  $45^\circ\text{C}$  for 16 hours. The sixteen arrays for each group were stained with Fluidics Station 450 using fluidics script FS450\_0001, then scanned on GeneChip Scanner 3000 7G. GeneChip Command Console software supplied by Life technologies was used to perform the gene expression analysis.

### 2.5 Small non-coding RNAs expression profiling

Small non-coding RNA expression profiling was performed by using GeneChip miRNA 4.0 Array (Life technologies, SIF: A28139434). Microarray experiments were conducted according to the manufacturer's instructions. 300 ng of total RNA were labeled with FlashTag Biotin HSR RNA Labeling Kit (Life technologies, SIF: A28139434). The labelling reaction was hybridized on the miRNA Array in Affymetrix Hybridization Oven 645 at  $48^\circ\text{C}$  for 18 h. The arrays were stained with Fluidics Station 450 using fluidics script FS450\_0002, and then scanned on GeneChip Scanner 3000 7G. GeneChip Command Console software supplied by Life technologies (Thermo Fisher Scientific, OR, USA) was used to perform expression analysis. miRNA probe outliers were defined as per the manufacturer's instructions (Life technologies) and further analyzed for data summarization, normalization, and quality control by using the web-based miRNA QC Tool software (Affymetrix Inc., Germany).

### 2.6 Microarray data analysis

Data (.CEL files) were analyzed and statistically filtered using software Partek Genomic Suite 6.4 (Partek Inc., St. Louis, MO). Input files were normalized with the RMA algorithm for gene array on core metaprobesets. A one-way ANOVA was performed with the Partek Genomics Suite across all samples. A  $p$  value  $\leq 0.05$  was considered statistically significant. The imported data were analyzed by Principal Components Analysis (PCA) to determine the significant sources of variability in the data. The selected genes were analyzed by using the Pathway Studio v8 software (Ariadne software provided by Elsevier, Netherlands) to perform a Biological Enrichment Analysis, which is a computational method that determines if a defined set of genes shows statistically significance between two different biological states, in our study, before and after the treatment with KDT. This method, as described by Mootha *et al.* [25], works by ranking the complete gene set using the fold change values (omitting the corrected  $p$ -values), providing significant processes, in which most genes related share the same expression profile. The gene set enrichment analysis allows detecting those genes describing a concrete phenotype in small sample size experiments.



**Table 1. Patients and KD intervention characteristics.**

Patient	A	B	C	D	E	F	G	H
Gender	Male	Female	Male	Male	Female	Male	Female	Female
Age of onset of epilepsy	9 m	15 d	4 m	6 m	3 m	19 m	9 y, 11 m	3 m
Aetiology of epilepsy	Down synd.	CDKL5 mut.	RBFOX1 mut.	Severe asphyxia	SCN1A mut.	Anti-NMDA receptor encephalitis	SCN9A mut.	UK
Duration from seizure onset to initiation of the KDT	12 d	2 m	11 d	6 y, 3 m	2 y, 1 m	12 m	3 y, 4 m	2 m
Age at the beginning of the intervention	9 m, 12 d	2 m, 15 d	4 m, 11 d	6 y, 9 m	2 y, 4 m	2 y, 7 m	13 y, 3 m	5 m
Type of KDT	CDK 3:1	CDK 3:1	CDK 3:1	CDK 4:1	MAD	CDK 3:1	MAD	CDK 3:1
Efficacy in seizure reduction:								
3 months	100%	-	-	90–100%	-	<50%	-	100%
6 months	100%	50–90%	<50%	90–100%	0%	90–100%	90–100%	100%
12 months	100%	90–100%	100%	90–100%	0%	50–90%	100%	100%
24 months	100%	100%	-	-	0%	50–90%	-	100%
BHB blood levels ( $\mu\text{mol/L}$ )								
3 months	3.8	6	-	1.4	2.1	5.4	0.4	3.9
6 months	2.6	-	5.4	0.4	2	4.4	1.1	4.2
12 months	5	3.8	-	0.1	2.4	3.3	1.5	3.7
24 months	5.9	-	-	1.6	1.8	4.3	-	2.6
Length of the KDT	29 m	20 m	9 m	26 m	22 m	24 m	23 m	29 m

m, months; y, years; d, days; UK, unknown; synd, syndrome; mut, mutation; CDKL5, cyclin dependent kinase-like 5; RBFOX1, RNA binding fox-1; SCN1A, sodium voltage-gated channel alpha subunit 1; NMDA, N-methyl-D-aspartate; SCN9A, sodium voltage-gated channel alpha subunit 9; KDT, ketogenic dietary therapies; CKD, classic ketogenic diet; MAD, Modified Atkins Diet; BHB,  $\beta$ -Hydroxybutyrate.

**Table 2. Biological processes regulated by the mRNA differently expressed in the patients treated with KDT.**

	Biological process	p-value	Number of genes
1	Multicellular organismal development	$5.61 \times 10^{-9}$	36
2	Synaptic transmission	$3.40 \times 10^{-7}$	19
3	Protein homooligomerization	$5.97 \times 10^{-6}$	11
4	Cell differentiation	$5.00 \times 10^{-5}$	22
5	Response to denervation involved in regulation of muscle adaptation	$5.54 \times 10^{-5}$	3
6	Potassium ion transmembrane transport	$6.99 \times 10^{-5}$	8
7	Transmembrane transport	$7.11 \times 10^{-5}$	20
8	Protein ubiquitination	$8.62 \times 10^{-5}$	13
9	Nervous system development	$1.09 \times 10^{-4}$	16
10	Small molecule metabolic process	$1.12 \times 10^{-4}$	30

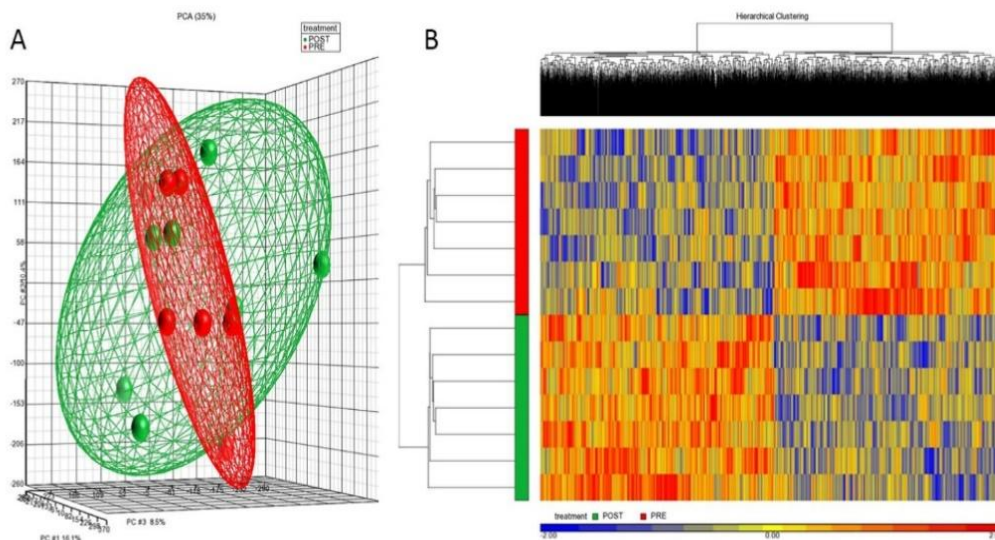
Top ten biological processes whose gene expression change after intervention with KDT (>6 months) in epileptic children according to PS analysis.

### 3. Results

Eight children with refractory epilepsy were treated with a KDT (Table 1 and **Supplementary Table 1**). The age at seizure onset was very variable and seizure type was as follows: 3 focal onset, 2 generalized tonic-clonic, 2 tonic, 1 multiple. Six children had seizures daily (1–50 seizures/day) and 2 of them had seizures monthly (1–2 seizures/month). The median number of ASM used before the onset of KDT was 4 (range 2–8) and no patient was treated with epilepsy surgery prior to KDT. The average age of the patients at the beginning of the diet was 19 months, while an average of 7 months elapsed from the onset of the seizures to the onset of the treat-

ment.

Six patients followed a CKD and two of them a MAD. ASM were prescribed concomitantly with KDT in all cases. The nutritional routes were: nasogastric tube (one patient), gastrostomy tube (one patient) and oral feeding (six patients). The onset of KDT was carried out in hospital admission in 6 patients who started CKD, without fasting or caloric restriction, and the fat content of the diet was progressively increased in all cases. Effectiveness of KDT in seizure reduction is in Table 1. Only one patient did not reduce the number of seizures with KDT (Patient E). However, she achieved a faster recovery from the seizures and her cognitive status



**Fig. 1. Transcriptomic analysis of PBMCs before and after a KD intervention in epileptic paediatric patients.** (A) Principal components analysis (PCA) displays clear spatial separation in the expression between the two groups of samples identified by unsupervised hierarchical clustering. In the 3-dimensional plot, the three principal components PC#1, #2 and #3 of all samples with over 20,000 well-annotated genes and their respective variations are expressed on the x-, y- and z-axis. The total percentage of PCA mapping variability is 35%. Each data point represents one sample. The ellipsoids highlight the partitioning of the different samples. Assignment of samples by colour: pre-intervention (red) and post-intervention (green). (B) Heatmap of pre-intervention (red bar) and post-intervention (green bar) samples and 4630 genes derived from ANOVA. Each line represents a patient and each column a gene. Up-regulated genes are represented in red and down-regulated genes in blue. This shows a complete separation of transcriptomic profile pre- (red) and post- (green) intervention. Images obtained by using The Pathway Studio Software (Ariadne software, <https://www.pathwaystudio.com>).

subjectively and significantly improved during the treatment. Four patients had early secondary effects. Throughout the follow-up, these side effects occurred in some patients, most of them were considered mild: hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, constipation, hypercalciuria, hypocitratemia, proteinuria, acidosis, and elevation of plasma gamma-glutamyl transferase (GGT) activity. The duration of KDT ranged from 9 to 24 months. Three patients discontinued the diet throughout the follow-up (one due to side effects and two because the diet became ineffective in the long-term).

### 3.1 Treatment with the KDT changes the mRNA expression profile in epileptic paediatric patients

The peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) gene expression profile from the paediatric patients treated with the KDT for at least 6 months, significantly differed from the pre-intervention one. 4630 mRNAs differentially expressed ( $p < 0.05$ ) were found. Three-dimensional unsupervised PCA showed two clustered groups that included the pre- and post-intervention samples (Fig. 1A). The unsupervised hierarchical clustering (heatmap) also showed significant differences in the gene expression from the two groups of samples (Fig. 1B).

According to Pathway Studio, of the 10 biological pathways that show the highest statistically significant treatment-induced change in their gene expression, we can highlight the following ones: synaptic transmission (19 genes involved,  $p$ -value  $3.40 \times 10^{-7}$ ), potassium ion transmembrane transport

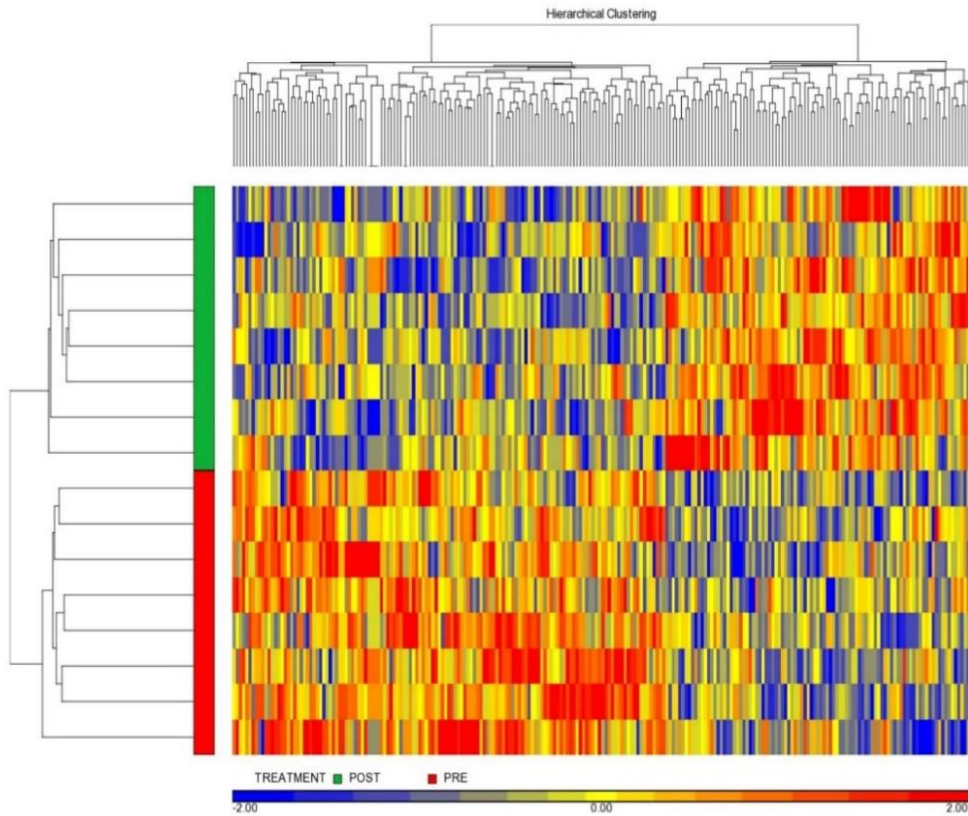
(8 genes involved,  $p$ -value  $6.99 \times 10^{-5}$ ), and nervous system development (16 genes involved,  $p$ -value  $1.09 \times 10^{-4}$ ). Table 2 shows the top ten modulated biological processes according to Pathway Studio.

### 3.2 Synaptic transmission genes modified by the KDT are mainly down-regulated

Most of the genes involved in synaptic transmission are down-regulated after KDT (16 vs 3 genes). Potassium channels *KCNJ12*, *KCNMA1*, *KCNK6* and *KCNA10* are down-regulated, while only a  $\text{Ca}^{2+}$  channel (*CACNA1C*) is up-regulated in the treated patients (See Table 3). The receptors for some of the main neurotransmitters are down-regulated after KDT: orexin receptor (*HCRT1* and *HCRT2*), melatonin receptor (*MTNR1B*), serotonin receptor (*HTR6*), glutamate receptor (*GRM3*), and cholinergic receptors (*CHRN3*).

### 3.3 Different miRNA expression profile in epileptic paediatric patients before and after the treatment with KDT

A global analysis of miRNA expression (miRNome) indicates that there are 230 miRNAs which are expressed differently before and after KDT. Fig. 2 shows the heatmap of the expression profile of these mRNA regulators. If additionally the miRNAs are restricted with a fold change  $> |1.3|$ , 11 relevant miRNAs whose expression differs after KDT in PMBCs are found: miR-3978, miR-6726-3p, miR-130a-3p, miR-4758, miR-6745, miR-532, and miR-185-5p (down-regulated after the KDT); and miR-4538, miR-602, miR-330-5p, and miR-4673 (up-regulated after the KDT). As



**Fig. 2.** Heatmap of pre-intervention (red bar) and post-intervention (green bar) samples of 230 miRNA derived from ANOVA. Each line represents a patient and each column a miRNA. Up-regulated miRNAs are represented in red and down-regulated miRNAs in blue. Image obtained by using The Pathway Studio Software (Ariadne software, Elsevier, <https://www.pathwaystudio.com>).

**Table 3.** Fold-change in the expression of genes involved in synaptic transmission after KDT.

Gene	Protein encoded	Fold change
<i>KCNJ12</i>	Kir2.2. ATP-sensitive inward rectifier potassium channel 12	-1.164
<i>KCNMA1</i>	KCa1.1. Ca <sup>2+</sup> -activated potassium channel subunit alpha-1	-1.279
<i>KCNK6</i>	K <sub>2P</sub> 6.1. potassium channel subfamily K member 6	-1.17
<i>SLC22A2</i>	Solute carrier family 22 member 2	-1.175
<i>CACNA1C</i>	Ca <sup>2+</sup> voltage-gated channel subunit alpha1 C	1.183
<i>KCNA10</i>	KCNA10. potassium voltage-gated channel subfamily A member 10	-1.277
<i>MAOA</i>	Monoamine oxidase A	-1.196
<i>FGF12</i>	Fibroblast Growth Factor 12	1.193
<i>PRKCG</i>	Protein kinase C gamma	-1.175
<i>GNG10</i>	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-10	-1.175
<i>HCRTR1</i>	Hypocretin receptor type 1	-1.168
<i>HCRTR2</i>	Hypocretin receptor type 2	-1.183
<i>HTR6</i>	5HTR6. 5-Hydroxytryptamine Receptor 6	-1.331
<i>MTNR1B</i>	Melatonin Receptor 1B	-1.193
<i>GRM3</i>	Glutamate Metabotropic Receptor 3	-1.175
<i>DOC2A</i>	Double C2-like domain-containing protein alpha	1.21
<i>CHRN3</i>	Neuronal acetylcholine receptor subunit beta-3	-1.231
<i>DLGAP1</i>	Disks large-associated protein 1 (DAP-1)	-1.166
<i>BSN</i>	Bassoon presynaptic cytomatrix protein	-1.084

with mRNA analysis, the miRNA expression profile before and after KDT intervention allowed complete separation of each case (no green bars intertwined with the red ones or vice versa).

#### 3.4 Gene and miRNAs expression combined analysis

A combined analysis of the miRNAs and mRNAs that change significantly with KDT intervention was also carried out (see the list of genes and miRNAs in the Supplementary Information). Several of the selected miRNAs regulate genes whose expression change with the intervention (see Fig. 3). All the relevant changes in mRNA and miRNAs (and their physiopathological significance) are summarized in Fig. 4. The results show that 8 genes related to the nervous system modulate their expression after KDT and are known to be regulated by the miRNAs modified during the intervention. These genes are: CDH2 (regulated by miRNA-199b-5p), NEGR1 (regulated by miRNA-875-5p), NEDD4 (regulated by miRNA-9-5p), FGF12 (regulated by miRNA-9-5p and miRNA-93-5p), CNTN2 (regulated by miRNA-185-5p), BSN (regulated by miRNA-185-5p and miRNA-153-3p), CACNA1C (miRNA-323a-3p and miRNA-153-3p), and DOC2A (regulated by miRNA-153-3p).

#### 4. Discussion

The results show that synaptic transmission is the most relevant biological pathway related to epilepsy, targeted by our intervention with KDT in epileptic children. In general, genes which encode proteins involved in this pathway are down-regulated after the intervention. These genes are basically: ion channels, neurotransmitter receptors, and structural synapse proteins.

Regarding the changes in the expression of ion channels, of the four potassium channels whose expression varies with KDT, three of them have been previously linked to epilepsy: Kir 2.2, whose up-regulation has been described in epilepsy [26]; KCNMA1, a  $Ca^{2+}$ -dependent potassium channel of the family known as BK proposed to be responsible of higher neuronal excitability [27]; and KCNK6, whose up-regulation contributes to epileptic seizures [28]. CACNA1C, which encodes an L-type  $Ca^{2+}$  voltage-gated  $Ca^{2+}$  channel (Cav 1.2), is the only ion channel up-regulated after KDT. It has been described mutations in this gene lead to epileptic phenotypes [29], and its dysfunction has been also associated to other neurological disorders such as autism and bipolar disease [30].

The results show a KD-induced down-regulation of several genes encoding neurotransmitters' receptors in epileptic children: orexin, serotonin, melatonin, glutamatergic and cholinergic receptor. Antagonists of the orexin receptors, HCTR1 and HCTR2, can reduce seizures in animal models [31]. Serotonin receptor 5-HT6 seems to be involved in the regulation of cognition, feeding, and, possibly, affective state and seizures [32]. Blockade of the 5-HT6/mTOR pathway can be used as a target for epileptic treatment [33]. It has been found that the expression of melatonin receptors, MT1 and

MT2, is increased in the hippocampus of pilocarpine-induced epileptic rats during the epileptic state, while it decreases in a chronic state [34]. Glutamatergic systems are involved in the control of excitation and inhibition. Higher expression of mGlu2/3 receptors have been found in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy [35]. Finally, the results also show a decrease in the expression of CHRN3, a cholinergic receptor, already been described as a possible gene associated with epilepsy [36].

On the other hand, MAOA is the enzyme of the external mitochondrial membrane that degrades neurotransmitters. Its inhibition has anticonvulsant effects [37]. The KDT down-regulated the MAOA expression.

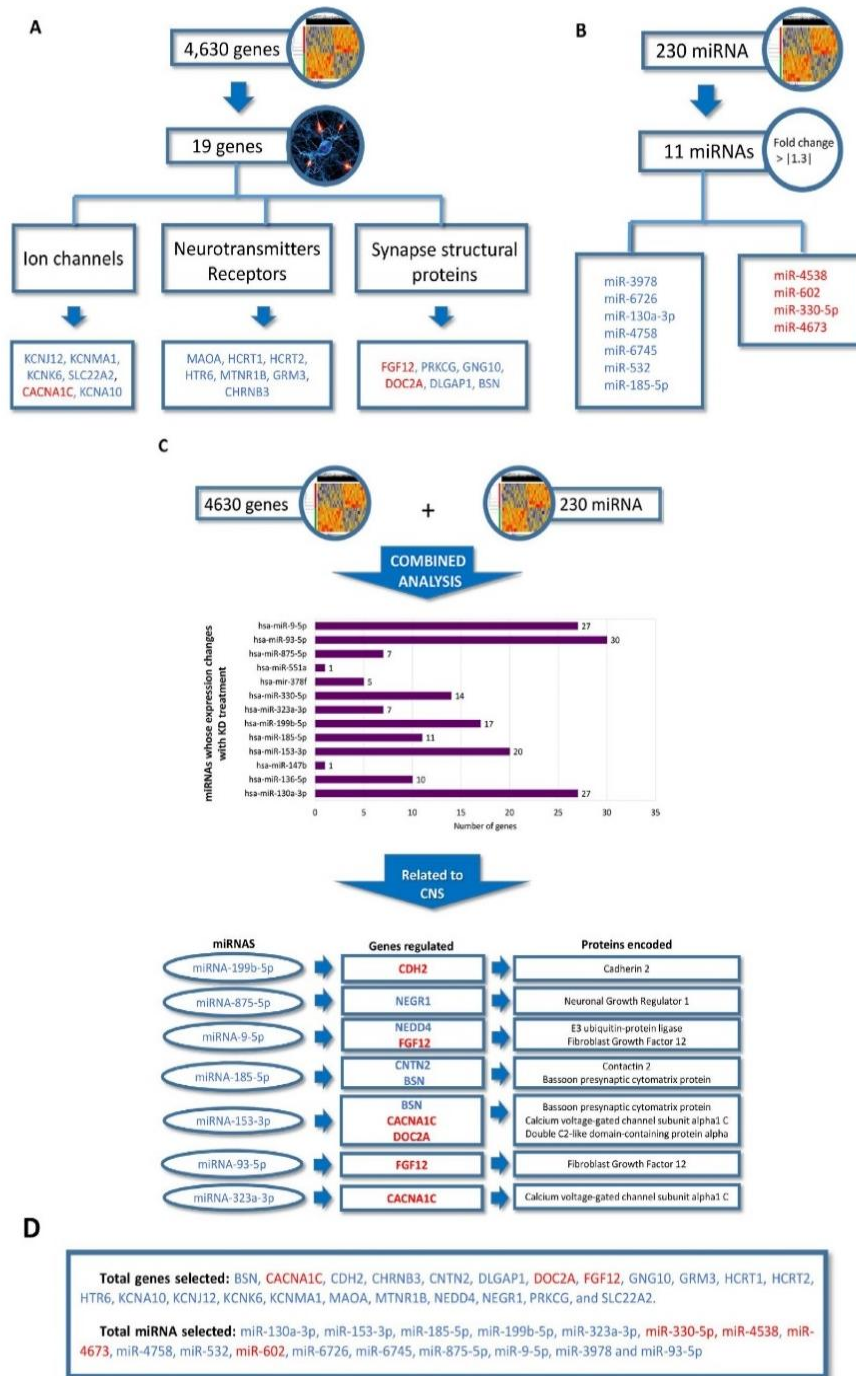
Some structural synapse proteins have shown also different gene expression after the KDT. DLGAP1 indirectly interacts with a voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channel subunit that can modulate AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) glutamate receptors and slow their deactivation, thereby increasing neuronal excitability [38]. Our results show that the KDT down-regulates this signalling pathway and therefore decreases excitability. Several studies in animal models indicate that the deletion of the chromosome where the DOC2A gene is encoded [39, 40] causes seizures. The treatment, by inducing an overexpression of this gene may explain the reductions in the number of seizures in our patients. PRKCG encodes the gamma subunit of PRKC, a protein kinase enzyme involved in many metabolic pathways, which has been associated to epilepsy [41]. It has been described that its inhibition has anticonvulsant effects [42]. KDT down-regulate this gene in our study.

In general, the changes we have seen in the gene expression related to synaptic transmission fit with a decrease in neuronal excitability, explaining at least part of the therapeutic effect of KDT in epilepsy.

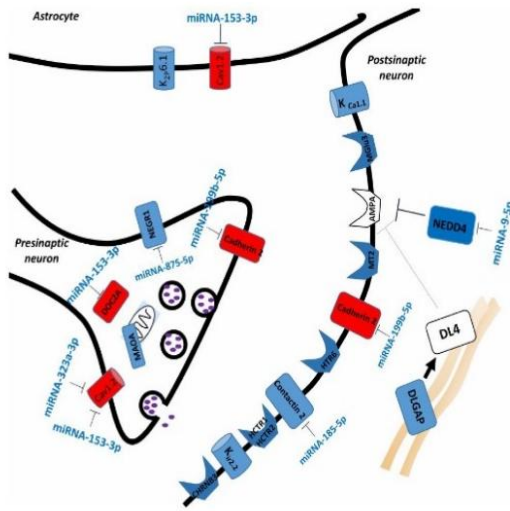
Changes in miRNAs expression are especially important since they regulate the translation of mRNA and therefore control gene expression. Some of the miRNAs whose expression changed more significantly after KDT are involved in antioxidant pathways. It has been previously shown that glucose-induced oscillations of miR-185-5p impairs the cellular antioxidant response in humans through the deregulation of GPx-1 [43]. KDT reduce the oscillation in glucose levels and consequently, in our study, we have found a down-regulation in the expression of miR-185-5p.

On the other hand, miR-330 has been related to the stability of hippocampal neurons [44]. A protective role of this miRNA has been assigned in neurological disorders as Alzheimer's disease [45]. miR-330-3p is up-regulated by PUFA enriched diets [46] and our results also show an up-regulation of this miRNA after fat enriched KDT.

The combined analysis of both (miRNAs and mRNA) transcriptomic results shows that miR-330-5p regulates the expression of 14 genes and miR-185-5p regulates the expression of 11 genes, two of them related to the central nervous system (CNS): CNTN2 and BSN. Other miRNAs which



**Fig. 3. Genes and miRNAs with biological relevance in our study.** In all panels, blue indicates genes or miRNAs that are down-regulated and red those that are up-regulated. Each panel shows our selection strategy. (A) From 4630 genes differently expressed after KDT, the 19 involved in the synaptic transmission pathway have been selected to be discussed. Protein encoded by these genes can be found in Table 2. (B) From 230 miRNAs differently expressed after KDT, the 11 which have a fold-change > |1.3| have been selected to be discussed. (C) From the combine analysis of miRNAs and genes whose expression changes with KDT, those related to the central nervous system (CNS) were selected. (D) List of genes and miRNAs selected through strategy A, B and C, and which finally are discussed.



**Fig. 4. Treatment with KDT (>6 months) in refractory epileptic children change the transcriptomic profile of genes involved in epileptic processes that encode ion channels, neurotransmitter receptors, and synapse structural proteins.** The down-regulated genes and miRNAs are shown in blue, whereas those up-regulated are shown in red.

regulate CNS related genes are miRNA-199b-5p, miRNA-875-5p, miRNA-9-5p, miRNA-93-5p, miRNA-153-3p, and miRNA-323a-3p. Almost all the CNS-genes regulated by these miRNAs have been previously discussed. There are four additional genes regulated by these miRNAs that deserve to be briefly mentioned: CDH2, NEGR1, NEDD4 and CNTN2. Cadherin 2 and contactin 2, encoded by the CDH2 and the CNTN2 genes, respectively, are membrane proteins whose gene deletion has been linked to epilepsy [47, 48]. The KD-induced down-regulation of miRNA-199-5p (CDH2 expression regulator) and miRNA-185-5p (CNTN2 regulator) should be accompanied with an increased expression of these membrane proteins. However, this was the case only for CDH2. CNTN2 was slightly down-regulated in our patients after the treatment. A paradoxical result regarding the NEGR1 gene that is regulated by miRNA-875-5 was also found. It encodes a neuronal growth regulator related to axon regeneration whose deficiency increases seizures susceptibility [49]. The results show a down-regulation of miRNA-875-5 after KDT that is not accompanied with an up-regulation of NEGR1 expression. Finally, we studied a well-known epilepsy associated gene, i.e., NEDD4, known to be regulated by miRNA-9-5p [50]. Using loss of function studies, it has been found that mice deficient in Nedd4-2 increase their seizure susceptibility [50]. Our results show a down-regulation of miRNA-9-5p by KDT in the epileptic children. However, this was not accompanied with a concomitant increase in NEDD4 expression in the patients. Collectively our data show the complexity of the gene regulation and strengthen the idea that it involves not only miRNAs.

## 5. Limitations of the study

We have performed the transcriptional study in the epileptic paediatric patients in PBMCs to reduce the invasiveness of the study. We are assuming that KDT may have a similar effect on the nervous system cells than that found in blood mononuclear cells. We are aware that changes in gene expression varies from one tissue to another, but we would like to emphasize that the vast majority of transcriptomic human studies, especially in patients, are usually performed in blood cells [51, 52]. In addition, despite the coherence between the different individuals in the study and the fact that our results are consistent with the clinical effects of KDT, the number of patients analyzed is small, and this makes it difficult to generalize our results.

## 6. Conclusions

Treatment with KDT for more than 6 months reduces the number of seizures in epileptic paediatric patients and induces significant changes in their gene expression profile. Our study reveals changes at the transcriptomic level in genes encoding ion channels, neurotransmitter receptors, and synapse structural proteins. These findings may explain the effect of the diet on the epileptic crises. Our results contribute to understand the mechanisms of action of KDT and reinforce their clinical importance in the epilepsy treatment.

## Abbreviations

ASM, antiseizure medications; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; BHB,  $\beta$ -Hydroxybutyrate; BMI, body mass index; BSN, bassoon presynaptic cytomatrix protein; CACNA1C,  $Ca^{2+}$  voltage-gated channel subunit alpha1 C; CDKL5, cyclin dependent kinase-like 5; CHRN3, Neuronal acetylcholine receptor subunit beta-3; DLGAP1, Disks large-associated protein 1; DOC2A, Double C2-like domain-containing protein alpha; CKD, classic ketogenic diet; FGF12, fibroblast growth factor 12; GGT gamma-glutamyl transferase; GNG10, Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-10; GRM3, Glutamate Metabotropic Receptor 3; HCRTR1, hypocretin receptor type 1; HCRTR2, hypocretin receptor type 2; KCNA10, potassium voltage-gated channel subfamily A member 10; KCNJ12, Kir2.2. ATP-sensitive inward rectifier potassium channel 12; KCNK6, K2P6.1. potassium channel subfamily K member 6; KCNMA1, KCa1.1.  $Ca^{2+}$ -activated potassium channel subunit alpha-1; KD, ketogenic diet; KDT, ketogenic dietary therapies; LCT, long chain triglycerides; MAD, modified Atkins diet; MAOA, monoamine oxidase A; MCT-KD, ketogenic diet with medium chain triglycerides; MTNR1B, Melatonin Receptor 1B; NMDA, N-methyl-D-aspartate; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; PCA, principal components analysis; PRKCG, Protein kinase C gamma; RBFOX1, RNA binding fox-1; SCN1A, sodium voltage-gated channel alpha subunit 1; SCN9A, sodium voltage-gated channel alpha subunit 9; SLC22A2, solute carrier family 22 member 2.

### Author contributions

JRH, GOG, CPG, and JV planned the experiments. ES, AGC and GOG performed the transcriptomic experiments and JG, MCGC and JV supervised the experiment. CPG supervised each clinical step. GOG and JV wrote the first draft and all authors commented criticized, and reviewed the manuscript. All authors accepted the final version of the manuscript.

### Ethics approval and consent to participate

All experimental procedures were approved by the Committee on Ethics in Clinical Research of the University Children's Hospital Niño Jesús of Madrid (R-0002/15). All patients or their relatives were fully informed of the aims and scope of the research and signed an informed consent.

### Acknowledgment

We thank Mrs Marilyn Noyes for her kind help in reviewing the manuscript.

### Funding

This work was supported by Sira Carrasco Grant 2015 from SEGHP, Instituto de Salud Carlos III and FEDER [grant number PIE15/00013], SAF2016-75508 -R from the Spanish Ministry of Education and Science (MEC), CB16/10/00435 (CIBERFES), PROMETEOII2014/056 from Conselleria de Sanitat de la Generalitat Valenciana and EU Funded CM1001 and FRAILOMIC-HEALTH.2012.2.1.1-2, ADVANTAGE-724099 Joint Action (HP-JA) 3rd EU Health Program and DIALBFRAIL-LATAM (825546 H2020-SC1-BHC).

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### Supplementary material

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at [https://??.](https://?)

### References

- [1] Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S, Patten SB, Kwon C, Dykeman J, *et al.* Prevalence and incidence of epilepsy. *Neurology*. 2017; 88: 296–303.
- [2] Beghi E. The Epidemiology of Epilepsy. *Neuroepidemiology*. 2020; 54: 185–191.
- [3] Wilder R. The effects of ketonemia on the course of epilepsy. *Mayo Clinic Proceedings*. 1921; 2: 307–308.
- [4] Gasior M, Rogawski MA, Hartman AL. Neuroprotective and disease-modifying effects of the ketogenic diet. *Behavioural Pharmacology*. 2006; 17: 431–439.
- [5] Kossoff EH. International consensus statement on clinical implementation of the ketogenic diet: agreement, flexibility, and controversy. *Epilepsia*. 2009; 49: 11–13.
- [6] Huttenlocher PR, Wilbourn AJ, Signore JM. Medium-chain triglycerides as a therapy for intractable childhood epilepsy. *Neurology*. 1971; 21: 1097–1097.
- [7] Kossoff EH, Dorward JL. The modified Atkins diet. *Epilepsia*. 2008; 49: 37–41.
- [8] Kossoff EH, Dorward JL, Turner Z, Pyzik PL. Prospective study of the modified Atkins diet in combination with a ketogenic liquid supplement during the initial month. *Journal of Child Neurology*. 2011; 26: 147–151.
- [9] Neal EG, Chaffe H, Schwartz RH, Lawson MS, Edwards N, Fitzsimmons G, *et al.* The ketogenic diet for the treatment of childhood epilepsy: a randomised controlled trial. *The Lancet. Neurology*. 2008; 7: 500–506.
- [10] Kim JA, Yoon J, Lee EJ, Lee JS, Kim JT, Kim HD, *et al.* Efficacy of the classic ketogenic and the modified Atkins diets in refractory childhood epilepsy. *Epilepsia*. 2016; 57: 51–58.
- [11] Bough KJ, Wetherington J, Hassel B, Pare JF, Gawryluk JW, Greene JG, *et al.* Mitochondrial biogenesis in the anticonvulsant mechanism of the ketogenic diet. *Annals of Neurology*. 2006; 60: 223–235.
- [12] Maalouf M, Rho JM, Mattson MP. The neuroprotective properties of calorie restriction, the ketogenic diet, and ketone bodies. *Brain Research Reviews*. 2009; 59: 293–315.
- [13] Boison D. New insights into the mechanisms of the ketogenic diet. *Current Opinion in Neurology*. 2017; 30: 187–192.
- [14] Bough KJ, Rho JM. Anticonvulsant Mechanisms of the Ketogenic Diet. *Epilepsia*. 2007; 48: 43–58.
- [15] Kim DY, Abdelwahab MG, Lee SH, O'Neill D, Thompson RJ, Duff HJ, *et al.* Ketones prevent oxidative impairment of hippocampal synaptic integrity through KATP channels. *PLoS ONE*. 2015; 10: e0119316.
- [16] Ma W, Berg J, Yellen G. Ketogenic diet metabolites reduce firing in central neurons by opening K(ATP) channels. *The Journal of Neuroscience*. 2007; 27: 3618–3625.
- [17] Genzer Y, Dadon M, Burg C, Chapnik N, Froy O. Effect of dietary fat and the circadian clock on the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2016; 430: 49–55.
- [18] Freeman J, Veggiotti P, Lanzi G, Tagliabue A, Perucca E. The ketogenic diet: from molecular mechanisms to clinical effects. *Epilepsy Research*. 2006; 68: 145–180.
- [19] Newell C, Bomhof MR, Reimer RA, Hittel DS, Rho JM, Shearer J. Ketogenic diet modifies the gut microbiota in a murine model of autism spectrum disorder. *Molecular Autism*. 2016; 7: 37.
- [20] Kobow K, Reid CA, van Vliet EA, Becker AJ, Carvill GL, Goldman AM, *et al.* Epigenetics explained: a topic "primer" for the epilepsy community by the ILAE GeneticsEpigenetics Task Force. *Epileptic Disorders*. 2020; 22: 127–141.
- [21] Schoeler NE, Leu C, Balestrini S, Mudge JM, Steward CA, Frankish A, *et al.* Genome-wide association study: Exploring the genetic basis for responsiveness to ketogenic dietary therapies for drug-resistant epilepsy. *Epilepsia*. 2018; 59: 1557–1566.
- [22] Lowe R, Shirley N, Bleackley M, Dolan S, Shafee T. Transcriptomics technologies. *PLoS Computational Biology*. 2017; 13: e1005457.
- [23] Kossoff EH, Zuperc-Kania BA, Auvin S, Ballaban-Gil KR, Christina Bergqvist AG, Blackford R, *et al.* Optimal clinical management of children receiving dietary therapies for epilepsy: Updated recommendations of the International Ketogenic Diet Study Group. *Epilepsia Open*. 2018; 3: 175–192.
- [24] Huttenlocher PR. Ketonemia and seizures: metabolic and anticonvulsant effects of two ketogenic diets in childhood epilepsy. *Pediatric Research*. 1976; 10: 536–540.
- [25] Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson K, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, *et al.* PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nature Genetics*. 2003; 34: 267–273.
- [26] Young CC, Stegen M, Bernard R, Müller M, Bischofberger J, Veh RW, *et al.* Upregulation of inward rectifier K+(Kir2) channels in dentate gyrus granule cells in temporal lobe epilepsy. *The Journal of Physiology*. 2009; 587: 4213–4233.
- [27] N'Gouemo P. Targeting BK (big potassium) channels in epilepsy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2011; 15: 1283–1295.

- [28] Kim J, Kwak S, Kang T. Upregulated TWIK-related acid-sensitive K<sup>+</sup>-channel-2 in neurons and perivascular astrocytes in the hippocampus of experimental temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 2009; 50: 654–663.
- [29] Bozarth X, Dines JN, Cong Q, Mirzaa GM, Foss K, Merrit JL, *et al.* Expanding clinical phenotype in CACNA1C related disorders: From neonatal onset severe epileptic encephalopathy to late-onset epilepsy. *American Journal of Medical Genetics*. 2018; 176: 2733–2739.
- [30] Gargus JJ. Genetic calcium signaling abnormalities in the central nervous system: seizures, migraine, and autism. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009; 1151: 133–156.
- [31] Roundtree HM, Simeone TA, Johnson C, Matthews SA, Samson KK, Simeone KA. Orexin Receptor Antagonism Improves Sleep and Reduces Seizures in Kcna1-null Mice. *Sleep*. 2016; 39: 357–368.
- [32] Quiedeville A, Boulouard M, Da Silva Costa-Aze V, Dauphin F, Bouet V, Freret T. 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonists as treatment for age-related cognitive decline. *Reviews in the Neurosciences*. 2014; 25: 417–427.
- [33] Wang L, Lv Y, Deng W, Peng X, Xiao Z, Xi Z, *et al.* 5-HT<sub>6</sub> Receptor Recruitment of mTOR Modulates Seizure Activity in Epilepsy. *Molecular Neurobiology*. 2017; 51: 1292–1299.
- [34] Rocha AKADA, de Lima E, Amaral F, Peres R, Cipolla-Neto J, Amado D. Altered MT1 and MT2 melatonin receptors expression in the hippocampus of pilocarpine-induced epileptic rats. *Epilepsy & Behavior*. 2017; 71: 23–34.
- [35] Tang FR, Chia SC, Chen PM, Gao H, Lee WL, Yeo TS, *et al.* Metabotropic glutamate receptor 2/3 in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy, and of rats and mice after pilocarpine-induced status epilepticus. *Epilepsy Research*. 2004; 59: 167–180.
- [36] Wang J, Lin Z, Liu L, Xu H, Shi Y, Yi Y, *et al.* Epilepsy-associated genes. *Seizure*. 2017; 44: 11–20.
- [37] Löscher W, Lehmann H, Teschendorf HJ, Traut M, Gross G. Inhibition of monoamine oxidase type a, but not type B, is an effective means of inducing anticonvulsant activity in the kindling model of epilepsy. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1999; 288: 984–992.
- [38] Rasmussen AH, Rasmussen HB, Silaharoglu A. The DLGAP family: neuronal expression, function and role in brain disorders. *Molecular Brain*. 2017; 10: 43.
- [39] Walsh KM, Bracken MB. Copy number variation in the dosage-sensitive 16p11.2 interval accounts for only a small proportion of autism incidence: a systematic review and meta-analysis. *Genetics in Medicine*. 2011; 13: 377–384.
- [40] McCammon JM, Blaker-Lee A, Chen X, Sive H. The 16p11.2 homologs fam57ba and doc2a generate certain brain and body phenotypes. *Human Molecular Genetics*. 2017; 26: 3699–3712.
- [41] Liu J, Schenker M, Ghiasvand S, Berdichevsky Y. Kinase Inhibitors with Antiepileptic Properties Identified with a Novel in Vitro Screening Platform. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20: 2502.
- [42] Gajda Z, Török R, Horváth Z, Szántai-Kis C, Orfi L, Kéri G, *et al.* Protein kinase inhibitor as a potential candidate for epilepsy treatment. *Epilepsia*. 2011; 52: 579–588.
- [43] La Sala L, Cattaneo M, De Nigris V, Pujadas G, Testa R, Bonfigli AR, *et al.* Oscillating glucose induces microRNA-185 and impairs an efficient antioxidant response in human endothelial cells. *Cardiovascular Diabetology*. 2016; 15: 71.
- [44] Cohen JE, Lee PR, Fields RD. Systematic identification of 3'-UTR regulatory elements in activity-dependent mRNA stability in hippocampal neurons. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 2014; 369: 20130509
- [45] Zhou Y, Wang Z, Li W, Hong H, Chen J, Tian Y, *et al.* Protective effects of microRNA-330 on amyloid  $\beta$ -protein production, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease by targeting VAV1 via the MAPK signaling pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2018; 119: 5437–5448.
- [46] Ortega FJ, Cardona-Alvarado MI, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Moreno M, Sabater M, *et al.* Circulating profiling reveals the effect of a polyunsaturated fatty acid-enriched diet on common microRNAs. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2016; 26: 1095–1101.
- [47] Verhoeven WM, Egger JI, Knegt AC, Zuydam J, Kleefstra T. Absence epilepsy and the CHD2 gene: an adolescent male with moderate intellectual disability, short-lasting psychoses, and an interstitial deletion in 15q26.1-q26.2. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 2016; 12: 1135–1139.
- [48] Stogmann E, Reinthaler E, Eltawil S, El Etribi MA, Hemedi M, El Nahhas N, *et al.* Autosomal recessive cortical myoclonic tremor and epilepsy: association with a mutation in the potassium channel associated gene CNTN2. *Brain*. 2013; 136: 1155–1160.
- [49] Singh K, Loreth D, Pöttker B, Hefti K, Innos J, Schwald K, *et al.* Neuronal Growth and Behavioral Alterations in Mice Deficient for the Psychiatric Disease-Associated Negr1 Gene. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2018; 11: 30.
- [50] Zhu J, Lee KY, Jewett KA, Man H, Chung HJ, Tsai N. Epilepsy-associated gene Nedd4-2 mediates neuronal activity and seizure susceptibility through AMPA receptors. *PLoS Genetics*. 2017; 13: e1006634.
- [51] Borrás C, Abdelaziz KM, Gambini J, Serna E, Inglés M, de la Fuente M, *et al.* Human exceptional longevity: transcriptome from centenarians is distinct from septuagenarians and reveals a role of Bcl-xL in successful aging. *Aging*. 2016; 8: 3185–3208.
- [52] Serna E, Gambini J, Borrás C, Abdelaziz KM, Belenguier A, Sanchez P, *et al.* Centenarians, but not octogenarians, up-regulate the expression of microRNAs. *Scientific Reports*. 2012; 2: 961.



## **7.6 OTROS RESULTADOS**

### **7.6.1 CAMBIOS METABOLÓMICOS INDUCIDOS POR LAS TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS**

Se analizó el suero de 14 muestras correspondientes a 7 niños. Siete muestras fueron tomadas antes de iniciar la dieta y 7 después. La figura 12A representa el PCA de las 14 determinaciones. Se representan las muestras sobre dos ejes en los que las variables son la combinación lineal de todos los metabolitos analizados en cada muestra. Observamos que, en general, las muestras post-dieta tendían a localizarse en el lado izquierdo del gráfico, mientras que las muestras basales lo hacían en la parte derecha. En la figura 12B aparecen representadas las mismas muestras, pero en este caso se fuerza a que se separen los grupos de muestras de “antes” y de “después” mediante un análisis discriminante de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y se observa un resultado similar. Sin embargo, dos pacientes fueron una excepción a esta tendencia. No encontramos diferencias clínicas que pudieran justificar esta diferente distribución de su perfil metabólico, salvo que uno de ellos no respondió adecuadamente a la terapia y tras la extracción de la muestra a los 6 meses se suspendió el tratamiento. La tabla 4 muestra las características de estos pacientes.

Los metabolitos que más contribuyeron a separar ambas muestras se representan en la figura 13 y la tabla 5. Destacaron los siguientes: betahidroxibutirato, acetoacetato, acetona, VLDL + LDL, glucosa, glutamina, alanina, glicina, valina, isoleucina+leucina y piruvato.

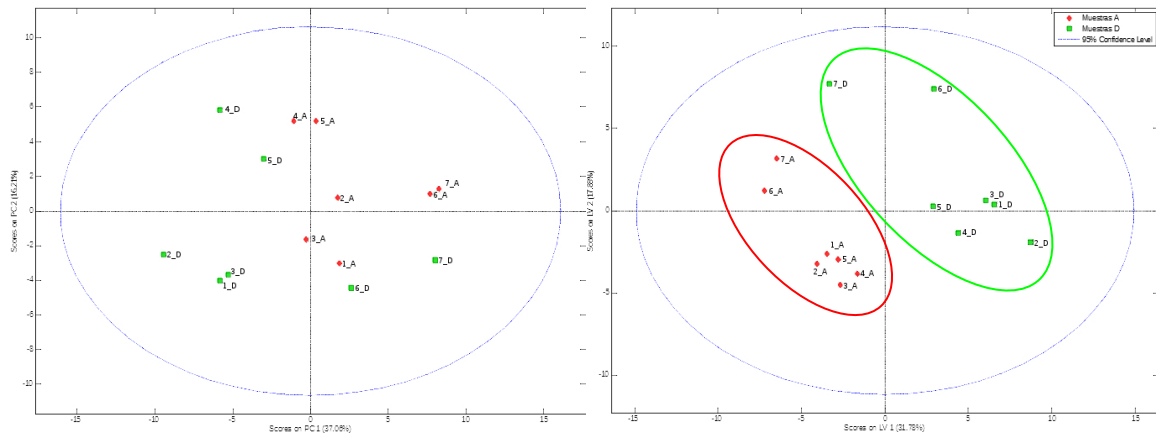


Figura 12. Análisis metabólico antes y después del tratamiento con terapias dietéticas cetogénicas. A. Análisis por componentes principales (PCA). B. Análisis discriminante de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). Cada número de seis cifras corresponde a un paciente. La letra A indica que la muestra fue tomada antes (rojo) y la D que fue tomada después (verde) de la intervención.

Tabla 4. Características de los pacientes en los que se llevó a cabo el análisis metabólico.

PACIENTE	1	2	3	4	5	6	7
<b>Sexo</b>	Varón	Mujer	Varón	Varón	Mujer	Varón	Mujer
<b>Edad debut</b>	3 meses 27 días	15 días	9 meses	3 años	7 meses	2 días	1 año 7 meses
<b>Etiología</b>	Genética (RBFOX1)	Genética (CDKL5)	Genética (trisomía 21)	Criptogénica	Estructural (lisencefalia)	Estructural (isquemia)	Estructural (malformación focal)
<b>Tipo crisis</b>	Focales	Tónico-clónicas	Tónicas	Atónicas	Tónicas	Focales	Focales
<b>Nº FAEs pre-dieta</b>	5	2	3	7	4	4	10
<b>Tiempo de evolución</b>	11 días	2 meses 15 días	12 días	3 años 3 meses	5 años 6 meses	5 años 6 meses	9 años 5 meses
<b>Tipo TDC</b>	DCC 3:1	DCC 3:1	DCC 3:1	DAM	DAM	DCC 3:1	DAM
<b>Respuesta 3 meses</b>	SÍ (<50%)	SÍ (50-90%)	SÍ (100%)	SÍ (cognitivo y EEG)	SÍ (50-90%)	SÍ (100%)	NO (0%)
<b>Respuesta 6 meses</b>	SÍ (100%)	SÍ (90-100%)	SÍ (100%)	SÍ (cognitivo y EEG)	SÍ (50-90%)	SÍ (100%)	NO (0%)

DAM: dieta de Atkins modificada. DCC: dieta cetogénica clásica. EEG: electroencefalograma. FAEs: fármacos antiepilépticos.

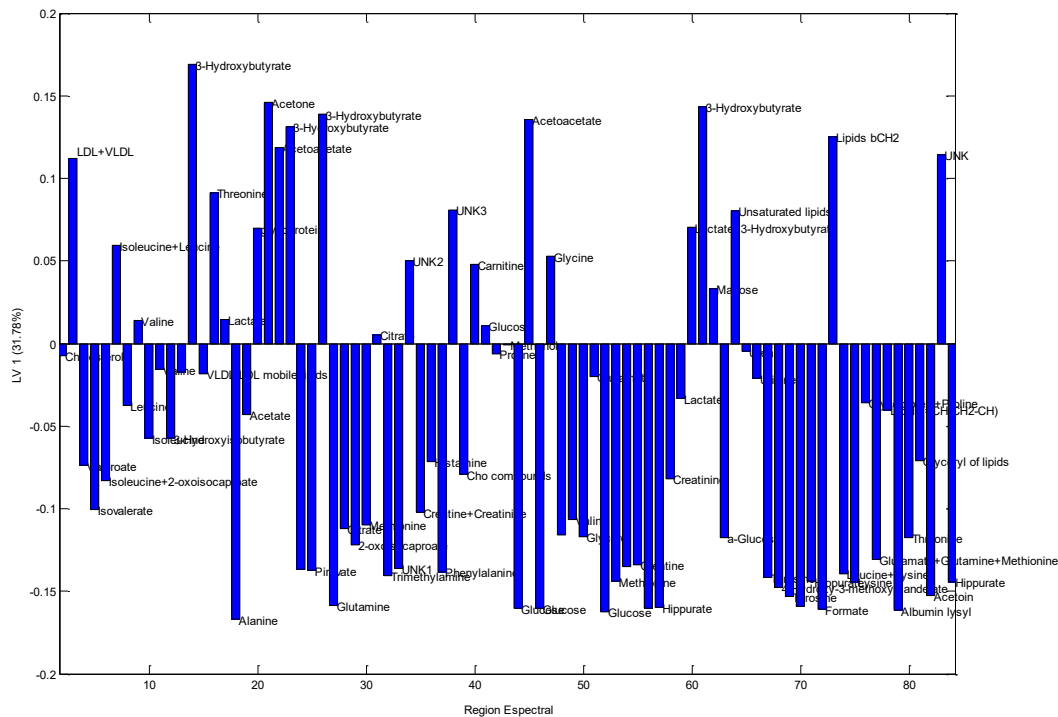


Figura 13. Metabolitos que contribuyeron a la modificación del perfil metabolómico.

Tabla 5. Metabolitos cuya concentración se modificó significativamente tras una intervención de un mínimo de 6 meses con terapias dietéticas cetogénicas en pacientes con epilepsia.

Metabolito	p	Muestra Antes		Muestra Después		Efecto
		Media	±SD	Media	±SD	
3-Hidroxibutirato	0,001	0,369	0,3501	1,89	0,8735	↑
Alanina	0,015	0,839	0,0741	0,721	0,0824	↓
Glutamato+Prolina	0,001	0,473	0,0463	0,384	0,02	↓
Piruvato	0,007	0,248	0,0232	0,194	0,0372	↓
Glutamina	0,003	0,497	0,053	0,388	0,0542	↓
Glucosa	0,004	0,732	0,0835	0,587	0,0711	↓
Acetoacetato	0,002	0,026	0,0109	0,154	0,0855	↑
Lactato+3- hidroxibutirato	0,048	0,131	0,012	0,155	0,0263	↑

SD: desviación estándar. p calculada con el test t-student. Unidades arbitrarias relativas al área de cada pico normalizado frente al área total del espectro.

### 7.6.2 ANÁLISIS DE ESTRÉS OXIDATIVO EN PACIENTES CON EPILEPSIA REFRACTARIA TRATADOS CON TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS

Se analizaron las proteínas oxidadas antes y después de la intervención en los mismos pacientes en los que se hizo el estudio metabolómico (tabla 5). Paradójicamente, se observó un aumento de la concentración de dichas proteínas en las muestras post-dieta (figura 14). Sin embargo, la concentración de MDA no experimentó modificaciones relevantes (figura 15).

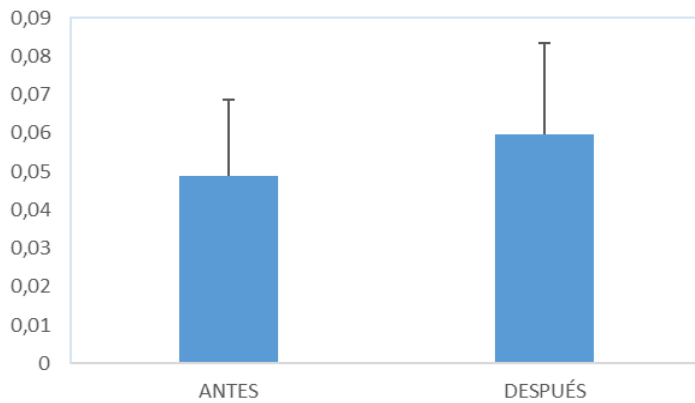


Figura 14. Proteínas oxidadas en plasma de niños con epilepsia refractaria tratados con terapias dietéticas cetogénicas.

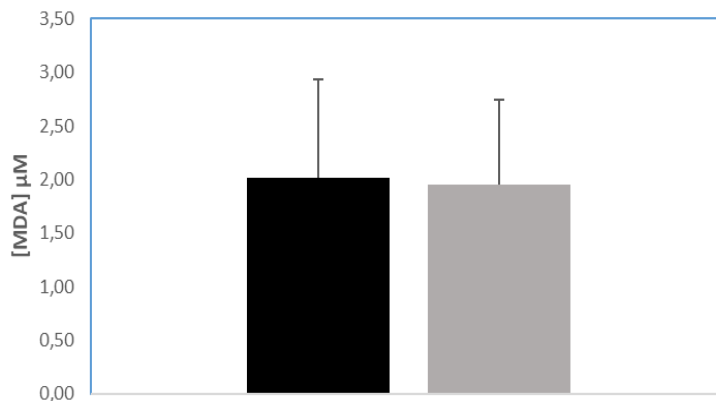


Figura 15. MDA en plasma en niños con epilepsia refractaria tratados con terapias dietéticas cetogénicas. Negro: determinación pre-dieta. Gris: determinación post-dieta.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 EFICACIA DE LAS TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS EN LA EDAD PEDIÁTRICA

#### 8.1.1 EFICACIA DE LAS TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS EN EPILEPSIA REFRACTARIA EN LA INFANCIA

El presente trabajo ha evaluado la serie española más numerosa de pacientes pediátricos tratados con TDC. Considerando una buena respuesta a las TDC como una reducción del número de crisis epilépticas al menos un 50% con respecto al estado basal, el porcentaje de pacientes respondedores fue de 41,9%, 37,5%, 28,7% y 16,2% a los 3, 6, 12 y 24 meses desde el inicio de la dieta, respectivamente. El porcentaje de niños con una respuesta excelente (reducción igual o superior al 90% de las convulsiones respecto al estado basal) fue de 8,7%, 10%, 6,2% y 1,2% en los mismos intervalos de tiempo, y el porcentaje de pacientes que quedaron libres de crisis fue de 13,7%, 12,5%, 14,4% y 10,6%, respectivamente.

Otros trabajos publicados previamente reportan eficacias similares, aunque con frecuencia los estudios son difíciles de comparar debido a la diferente metodología de implantación de la dieta, el protocolo empleado, el perfil de los pacientes incluidos o el tipo de dieta elegida.

Los trabajos más relevantes de finales del siglo pasado evaluaron series de pacientes, generalmente con escaso número de individuos, que seguían las dietas clásicas o con TCM. El estudio de Hopkins and Lynch<sup>172</sup>, y los de Janaki<sup>173</sup>, Kinsman<sup>174</sup>, Vining<sup>56</sup> y Freeman<sup>57</sup> y sus colaboradores, evaluaron la efectividad de las DCC con ratio 3:1 o 4:1. Todos ellos realizaron un análisis retrospectivo de un escaso número de pacientes (entre

12 y 59), excepto Vining<sup>56</sup> y Freeman<sup>57</sup> cuyos trabajos consistieron en realizar un estudio multicéntrico prospectivo, con 51 y 150 niños, respectivamente. El porcentaje de pacientes respondedores en los estudios retrospectivos fue muy variable, desde el 100% en el estudio de 15 pacientes de Janaki<sup>173</sup>, hasta el 38% en el estudio con 58 pacientes de Kinsman<sup>174</sup>, reportando este último además un 29% de pacientes con descenso de crisis superior al 90%. Por otra parte, solo Janaki<sup>173</sup> y Hopkins y Lynch<sup>172</sup> publicaron el porcentaje de sujetos que habían quedado libres de crisis, siendo 20% y 8,8% respectivamente.

Los estudios prospectivos de Vining y Freeman mostraron datos más similares entre sí. Así, el porcentaje de pacientes con una reducción de las crisis superior al 50% a los 3, 6 y 12 meses fue de 54%, 53% y 40% en el estudio de Vining, y de 60%, 51% y 50% en el de Freeman. Sus resultados también fueron superponibles en cuanto al porcentaje de niños con una respuesta superior al 90% (25% vs 33%, 29% vs 32%, 22% vs 27% a los 3, 6 y 12 meses, respectivamente) y el porcentaje de pacientes libres de crisis (12% vs 3%, 12% vs 3%, 10% vs 7%).

En cuanto a la evaluación de la eficacia de las dietas con TCM, los primeros datos publicados fueron los de Huttenlocher<sup>50,59</sup>, Berman<sup>175</sup>, Trauner<sup>176</sup> y Sills<sup>177</sup>. Los pacientes mejoraron desde el 29 al 89% de los casos y quedaron libres de crisis entre el 16 y el 33%.

Otros estudios han publicado los resultados de grupos de pacientes que seguían dietas clásicas o dietas con TCM. Uno de ellos fue el de Schwartz<sup>48</sup>, quien objetivó que el 81% de los pacientes era respondedor y un 41% presentó una respuesta excelente.

Estudios más recientes en la década de los 2000 confirmaron tasas de buena respuesta que oscilan entre un 20 y un 50%<sup>64,178-180</sup>. Una revisión sistemática<sup>66</sup> y un

metaanálisis<sup>67</sup>, que incluyeron respectivamente 972 y 1084 pacientes, mostraron que el 60-30% de los pacientes era respondedor a las TDC, que el 30% lograba una respuesta excelente, y que hasta un 15% quedaba libre de crisis. Sin embargo, no fue hasta el año 2008 cuando se publicaron los resultados del primer estudio randomizado que evaluaba la eficacia de la DC<sup>68</sup>. La misma autora publicó unos meses más tarde un ensayo aleatorizado en el que no se demostraban diferencias de eficacia y tolerancia entre la DC-TCM y la DCC<sup>69</sup>. Revisiones sistemáticas recientes apoyan que no existen evidencias claras de una mayor eficacia de la DCC en comparación con la DC-TCM<sup>181</sup>.

La efectividad de la DAM también ha sido constatada en múltiples estudios. Kang<sup>182</sup> reportó que 5 de los 14 pacientes que comenzaron esta dieta (36%) presentaba buena respuesta a los 6 meses, y 3 (21%) no padecían convulsiones. Kossoff presentó también su experiencia con la DAM, consiguiendo una buena respuesta en al menos la mitad de los pacientes y un 90% de reducción de las crisis en un 35%<sup>51,70</sup>. Resultados similares fueron publicados por Porta<sup>71</sup> y Weber<sup>72</sup>. El primer ensayo clínico con DAM fue llevado a cabo por Sharma, y confirmó que la DAM era claramente eficaz<sup>76</sup>.

Respecto a la eficacia de la DBIG existen menos estudios debido a que se emplea desde hace menos tiempo, pero hay varias cohortes que han informado buenos resultados. Muzkewicz y colaboradores<sup>77</sup> publicaron el efecto de la DBIG en 131 niños. El porcentaje de respondedores a los 3, 6 y 12 meses, fue de 50%, 54% y 66%. Otra serie con 42 pacientes pediátricos reportó datos similares<sup>78</sup>.

Por otro lado, existen estudios que tratan de averiguar si existen diferencias de eficacia entre la DCC, la DAM y la DC-TCM. En nuestra cohorte, la DCC fue el tipo de dieta más empleado (68 niños siguieron una DCC ratio 3:1 y 16 una ratio 4:1), seguido de la DAM (58 pacientes) y las dietas con TCM (clásica en 2 y modificada en 16). A los 3 y

12 meses se observaron diferencias significativas en la eficacia según el tipo de TDC empleado. A los 3 meses se logró una mejoría significativa en 46 de los niños que seguían una DCC, en 17 de los pacientes con DAM y en 4 de los que llevaban una dieta con TCM. A los 12 meses la mejoría fue significativa en 34, 0, y 12 niños, respectivamente. En estos periodos de tiempo, la DCC fue más eficaz de forma estadísticamente significativa en nuestra cohorte.

Aunque no parece que existan claras diferencias de eficacia en función del tipo de TDC, algún estudio ha objetivado mayor eficacia de la DCC a los 3 meses, pero no a los 6 meses<sup>71</sup>. Miranda<sup>73</sup> comparó el efecto de una DAM en 33 niños con epilepsia refractaria reclutados de forma prospectiva con un grupo de 50 pacientes previamente tratados con DCC. El porcentaje de respondedores a la DAM a los de 3 y 6 meses fue de 52% (42% tuvieron una reducción de las convulsiones superior al 90%) y 39%. Aunque observaron cierta tendencia a una mayor incidencia de respondedores en el grupo con DCC, las diferencias no fueron significativas y, además, esta tendencia no fue observada cuando los dos grupos se ajustaron por edad. Más recientemente, Kim<sup>75</sup> comparó también dos grupos de niños con epilepsia refractaria tratados con DCC o DAM. Las conclusiones fueron similares, las DCC presentaron mayores porcentajes de respondedores, pero sin alcanzar diferencias significativas con la DAM, salvo en el grupo de niños menores de 2 años, en los que la DCC parece ser más eficaz. Una revisión y metaanálisis reciente comparó ambas dietas tanto a corto como a largo plazo y no encontró diferencias significativas<sup>183</sup>. Tampoco parecen existir diferencias de eficacia con la DC-TCM y la DBIG. De hecho, el estudio de Wibisono comparó la DCC con la DAM y la DC-TCM y concluyó que la eficacia de las tres era comparable en el control de las crisis epilépticas<sup>153</sup>. En el ensayo clínico controlado y randomizado que comparó la DCC con la DAM y la DBIG, se concluyó que ésta última no era inferior a las otras dos en cuanto a eficacia<sup>80</sup>.



En resumen, de forma genérica podemos afirmar que la probabilidad de responder a la dieta en un paciente con epilepsia refractaria es del 50% de forma global, sin tener en cuenta etiologías específicas que pueden responder en un mayor porcentaje de casos. Para los más excépticos podría parecer que en realidad la dieta es poco efectiva. Sin embargo, conviene comparar esta probabilidad de éxito de la TDC en un niño con epilepsia refractaria con la probabilidad de éxito de probar con un nuevo FAE. En estos casos, la probabilidad de remisión con un tercer FAE ronda también el 50%<sup>11</sup>, y la probabilidad de quedar libre de crisis es inferior al 20%<sup>12</sup>. Por tanto, las TDC deben plantearse de forma precoz ante los pacientes con fracaso de dos FAEs, siendo su probabilidad de éxito similar a la de testar otro FAE.

### **8.1.2 EFICACIA DE LAS TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS EN EL SÍNDROME DE DEFICIENCIA DE GLUT1**

El SD-GLUT1 fue descrito por primera vez por De Vivo en 1991<sup>184</sup>. La falta o disfunción de este transportador conlleva un descenso de los aportes de glucosa cerebral. Dado que la glucosa es la fuente energética principal del cerebro, su deficiente difusión a través de la barrera hematoencefálica desencadena la presencia de sintomatología neurológica. El espectro clínico es cada vez más extenso y debe sospecharse esta patología en situaciones en las que los síntomas tienen lugar en situaciones de ayuno o tras ejercicio<sup>82,86</sup>. La presencia de hipogluorraquia hace que el diagnóstico sea muy probable, aunque éste se confirma al detectar mutaciones en el gen SLC2A1 que codifica este transportador<sup>185</sup>. Sin embargo, se ha descrito que entre un 5 y un 10% de los pacientes con un cuadro clínico y bioquímico compatible no portan la mutación en dicho gen<sup>186</sup>.

Entre nuestra cohorte de pacientes pediátricos que iniciaron una TDC, 18 lo hicieron por sospecha de SD-GLUT1, aunque solo se confirmó la mutación en un tercio. El síntoma más frecuente fue epilepsia, aunque una tercera parte presentaba un trastorno motor. Al igual que en otras series<sup>187,188</sup>, nuestros pacientes presentaban varios tipos de crisis. Cabe destacar que los dos tipos más frecuentes fueron las ausencias y las mioclonías, ya que tanto la presencia de ausencias precoces y la epilepsia mioclónico-atónica deben hacer sospechar esta patología<sup>81</sup>. La edad al inicio de los síntomas fue menor entre los pacientes que padecían epilepsia y en el grupo en el que se confirmó la mutación, por lo que creemos que se debe valorar este síndrome en pacientes de menor edad con epilepsia farmacorresistente de forma que no se demore el diagnóstico ni el inicio del tratamiento. De hecho, el tratamiento con TDC, que proporcionan un sustrato energético alternativo al cerebro, debe comenzarse lo antes posible<sup>81</sup>. En nuestra cohorte, el tiempo medio desde el debut al inicio de la dieta fue superior a 3 años, siendo curiosamente mayor en el grupo de niños con epilepsia refractaria y en el grupo de pacientes con la mutación. En otros trabajos se describen retrasos en el inicio de la terapia desde la presencia de sintomatología de unos cuatro años, llegando en ocasiones a superar los 8 años<sup>87,189,190</sup>. Es importante destacar que, aunque solo se confirmó el diagnóstico genético en un 33%, la mayoría de los niños experimentó mejoría. Así, a los 3 meses, un 66% presentó respuesta, a los 6 meses, un 69% de los pacientes que permanecían con dieta mejoró, y a los 12 y 24 meses todos los niños que continuaron el tratamiento (10 y 8 respectivamente) había mejorado. Entre los pacientes con epilepsia quedaron libres de crisis entre un 31 y un 54% a lo largo del seguimiento, y un 80% de los niños con trastorno del movimiento mejoró. Nuestros datos de eficacia son similares a los reportados en otras series<sup>86,87</sup>.

Entre las diferentes TDC disponibles en la actualidad, el gold estándar de tratamiento es la DCC<sup>81</sup>. Sin embargo, la TDC debe ser mantenida a largo plazo en estos pacientes, incluso de por vida, y las restricciones dietéticas que conlleva pueden acarrear dificultades de adherencia, especialmente en los pacientes de mayor edad, habiéndose documentado una tasa de abandono de hasta casi una quinta parte de los pacientes<sup>81,190</sup>. La DAM se perfila como una buena alternativa en estos casos, aunque en general, en los niños menores de 2 años es preferible la DCC con ratio 3:1<sup>81</sup>. En nuestra serie, la DAM fue el tipo de dieta predominante, siendo empleada en dos tercios de los pacientes. No encontramos diferencias significativas de eficacia entre la DAM y la DCC. Otras publicaciones han documentado casos con buenos resultados con DAM para el tratamiento de este síndrome<sup>89,92</sup>. Destacan el estudio de Amalou<sup>93</sup>, que confirmó la mejoría de la epilepsia y el trastorno del movimiento en 10 pacientes, y el de Fuji<sup>94</sup>, que comparó los resultados de la DAM y la DCC en 39 pacientes con este trastorno dividiéndolos en dos grupos de tratamiento, y demostró que ambos eran equiparables.

Resulta curioso que, en nuestro trabajo, a pesar de ser la DAM una alternativa en los casos con dificultades de cumplimiento, los tres pacientes que abandonaron la terapia por dificultades de adherencia recibieran precisamente una DAM. Una posible razón es la mayor edad de estos niños, lo cual hace más difícil adaptarse a modificaciones dietéticas, y a que dos de ellos no presentaron finalmente la mutación y eso les llevaría a una menor motivación para seguir la dieta.

La DBIG no está aceptada en la actualidad como tratamiento de este síndrome dentro de las guías actuales<sup>81</sup>. No obstante, en uno de nuestros pacientes que seguía una DAM y presentaba dificultades de cumplimiento, se recomendó a los 19 meses de tratamiento sustituir la DAM por una DBIG. Aunque esta variante de TDC no produce

cuerpos cetónicos y, por tanto, no aporta una fuente energética alternativa, podría tener algunos beneficios, ya que contribuye a mantener unos niveles estables de glucosa. Conviene destacar que el paciente en que se empleó la DBIG finalmente no se confirmó la mutación ya que, de haberse confirmado, probablemente habría sido necesario volver a una modalidad más restrictiva de TDC.

### **8.1.3 EFICACIA DE LAS TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS EN LACTANTES**

Clásicamente, el uso de las TDC en lactantes ha sido muy controvertido. Durante el siglo pasado, autores como Livingston o Freeman, defendieron que los lactantes, especialmente los menores de un año de edad, no se beneficiaban de las TDC, presentaban dificultades para mantener la cetosis y tenían mayor tendencia a la hipoglucemia. Además, el hecho de que a esta población se la considerase vulnerable debido a los altos requerimientos nutricionales para asegurar un adecuado crecimiento en los primeros meses de la vida, hizo que no fuera candidata al tratamiento con las TDC. Reflejo de este pensamiento es que solo un lactante recibiera este tratamiento durante los primeros años de la implantación de las TDC en nuestro centro, incrementándose este número en los años siguientes.

A principios de los 2000, Nordli publicó por primera vez la experiencia en lactantes con las TDC<sup>110</sup>, constatando que debían considerarse tratamientos seguros y eficaces en lactantes con epilepsia intratable. Describió el uso de estos tratamientos en 32 lactantes demostrando que hasta un 20% lograba quedar sin crisis, y un 35% adicional presentaba buena respuesta. Nuestra cohorte presenta resultados similares: el porcentaje de pacientes respondedores a los 3, 6, 12 y 24 meses fue de 50%, 45%, 38% y 17%

respectivamente. El porcentaje de pacientes con una respuesta excelente fue de 33-12% a lo largo del seguimiento, quedando libres de crisis un 24-9,5%.

En los últimos años se aboga por un tratamiento temprano con TDC de los lactantes con epilepsia refractaria. En el trabajo publicado en el año 2015 por Dressler y coautores<sup>191</sup> se comparaban los efectos de las TDC en dos grupos de edad (mayores o menores de 18 meses de vida). Observaron que la tasa de respondedores era similar en ambos grupos, pero el porcentaje de niños que quedaban libres de crisis fue superior en el grupo de menor edad, especialmente en los menores de 9 meses. Además, la aceptación de la dieta fue mejor en los lactantes pequeños que son alimentados con fórmulas líquidas de forma exclusiva. Más recientemente, Kim y colaboradores describieron su experiencia en TDC en 109 menores de 3 años durante 10 años. Notificaron un 39% de respondedores a los 3 meses, y un 18% de pacientes libres de crisis<sup>115</sup>. Los pacientes con epilepsias de origen genético tuvieron tendencia a una mejor respuesta.

Por otra parte, uno de los principales tipos de crisis en este periodo de la infancia son los espasmos infantiles. En nuestra serie, un 33% presentaba estas crisis, y una cuarta parte de los lactantes (11/42) padecía un síndrome de West. Más de la mitad de estos niños fueron respondedores. Una revisión sistemática que aglutinó los resultados de 341 lactantes con espasmos infantiles reportó resultados similares, objetivando una tasa de respondedores del 64,7%<sup>192</sup>. El porcentaje global de pacientes libres de crisis a corto plazo ( $\leq 6$  meses) era del 30,68%. Entre los diferentes estudios este porcentaje de pacientes libres de crisis fue muy variable, siendo superior al 50% en el de Kossoff<sup>101</sup> o Pires<sup>112</sup>, del 40% en el de Eun<sup>111</sup>, del 28% en el de Hong<sup>100</sup>, del 20% en el de Kayyali<sup>113</sup>, e inferiores a una quinta parte de los pacientes en los de Hirano<sup>193</sup> o Hussain<sup>194</sup>. La

eficacia de las TDC en los espasmos infantiles es equiparable incluso al tratamiento estándar con ACTH<sup>101</sup>, y se ha mostrado eficaz en casos resistentes a este tratamiento<sup>193</sup>.

Es importante destacar que el debut de una epilepsia en el periodo de lactante se ha relacionado con peor pronóstico, mayor frecuencia de farmacorresistencia, e incluso un mayor riesgo de muerte<sup>114</sup>. En nuestra serie, 3 pacientes fallecieron (7%) y casi una tercera parte eran alimentados por vía enteral. Esto muestra la gravedad de los lactantes en el momento de iniciar la dieta y la necesidad de plantearse un tratamiento más precoz. Aunque la ILAE define la epilepsia refractaria como la falta de respuesta a dos FAEs, hasta un 33% de nuestros lactantes recibió más de cinco antes de probar la dieta, y solo un 38% era menor de 6 meses, etapa en la que, como se ha comentado anteriormente, es más fácil establecer la dieta debido al uso exclusivo de fórmulas líquidas.

Respecto al tipo de TDC más recomendable en esta etapa de la infancia, las guías recomiendan emplear DCC de ratio 3:1, ya que esta variante permite un adecuado aporte de proteínas que asegure el crecimiento<sup>118</sup>. Este tipo de TDC fue el mayoritariamente empleado en nuestra serie. En cuanto a la duración del tratamiento, en general se suelen recomendar tratamientos de unos dos años. Sin embargo, dado que tras tratamientos prolongados en lactantes existe mayor riesgo de alteraciones en el crecimiento, y que no se han encontrado diferencias en cuanto a recaída en aquéllos que quedaron libres de crisis al retirar la dieta a los 8 meses o a los 2 años<sup>195</sup>, parece sensato abogar por tratamientos más cortos que en otras poblaciones.

En conclusión, nuestros resultados y los publicados por otros autores, avalan las recomendaciones de las últimas guías publicadas que demuestran que las TDC son tratamientos eficaces y seguros para los lactantes que padecen epilepsia refractaria, SD-GLUT1 o deficiencia de PDH<sup>196,197</sup>.

#### **8.1.4 EFICACIA A LARGO PLAZO DE LAS TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS EN LA INFANCIA**

En general, siguiendo las últimas guías sobre el tratamiento con TDC en niños basadas en las recomendaciones de expertos en la materia, el tratamiento debe mantenerse dos años en aquellos pacientes que han respondido<sup>95</sup>. Sin embargo, esta recomendación general debe matizarse e individualizarse ya que, en función de las características del paciente y su patología, la duración del tratamiento puede ser menor (como se comentaba en el apartado anterior de los lactantes con espasmos infantiles) o mayor (como ocurre en las enfermedades metabólicas que precisan de por vida un sustrato alternativo a la glucosa). En los pacientes con epilepsia refractaria con respuesta excelente o remisión completa de las crisis también se plantea realizar tratamientos prolongados si no existen efectos secundarios, o estos son leves y asumibles<sup>95</sup>.

No obstante, existe poca información sobre el tratamiento prolongado con estas dietas. En un estudio multicéntrico argentino que evaluó a 216 niños con epilepsia refractaria tratados con TDC, observaron que 70 niños siguieron la dieta durante 2 a 3 años y 55 pacientes la mantuvieron más de 3 años<sup>63</sup>. En nuestra cohorte, recogimos los datos de 26 niños que habían seguido la dieta durante al menos dos años, lo cual suponía un porcentaje de pacientes menor al de la serie argentina (16%). La duración media de la dieta en nuestra serie fue de 3,9 años, y se suspendió en 10 casos, siendo la causa de la retirada en 8 de ellos la duración prolongada de la dieta. Seis niños mantuvieron la dieta más de 6 años, y el paciente que recibió el tratamiento más prolongado tomó una DAM durante más de 9 años. La mitad de estos pacientes consiguió quedar libre de crisis, y un 60-75% logró una respuesta excelente. En otros estudios en los que se contactó con los pacientes que habían empezado la dieta años después, observaron que un 85% de los

niños que mantenía la dieta al menos 3 años seguía manteniendo una reducción de crisis superior al 50%<sup>198</sup>. En otro trabajo informaron de que la DCC siguió siendo eficaz tras más de 6 años de tratamiento en 28 de 600 pacientes originales que comenzaron la dieta<sup>131</sup>.

Los estudios que han evaluado la recaída tras la suspensión de la dieta en niños que habían quedado libres de crisis han documentado que hasta un 80% no presentaba recaída<sup>199</sup>. Otros confirman recaídas en hasta un 25% de niños al suspender la dieta, especialmente si presentaban alteraciones estructurales cerebrales o anomalías en el EEG<sup>63</sup>.

## **8.2 SEGURIDAD DE LAS TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS EN LA EDAD PEDIÁTRICA**

En general, los efectos secundarios suelen ser leves, fáciles de manejar y, muchas veces, transitorios. En nuestra serie no constituyeron una causa frecuente de retirada, pero en el grupo de niños con DCC supusieron el segundo motivo en frecuencia para el abandono de la dieta después de la ineficacia.

### **8.2.1 EFECTOS ADVERSOS A CORTO PLAZO**

Los efectos secundarios durante el primer mes de tratamiento ocurrieron en casi la mitad de nuestros pacientes, y condujeron a la retirada de la dieta de forma precoz en 6 de los 10 pacientes que no la mantuvieron durante un mes. En un estudio retrospectivo llevado a cabo por Lin se describió una incidencia de efectos secundarios durante los primeros días de hasta un 80%<sup>120</sup>. Los tres efectos más prevalentes en nuestra cohorte fueron los síntomas gastrointestinales, la hipoglucemia y la hipercalciuria. Otros trabajos



han reportado como efectos precoces más prevalentes la deshidratación, los problemas gastrointestinales y la hipertrigliceridemia<sup>65</sup>. La deshidratación probablemente esté relacionada con el protocolo de instauración de la dieta que clásicamente incluía un periodo de ayuno y restricción de líquidos, que no fue empleado de forma rutinaria en nuestra cohorte. Aunque la reducción de los niveles de insulina que producen las TDC también condiciona un mayor riesgo de deshidratación, ya que conlleva un aumento de las pérdidas renales de agua y electrolitos, ningún paciente presentó este efecto adverso en nuestra serie. El trabajo de Lin también objetivó una alta prevalencia de hipoglucemia, especialmente en los niños de menor edad<sup>120,124</sup>. Conviene destacar que en nuestro trabajo se ha considerado hipoglucemia unos valores de glucosa en sangre inferiores a 50 mg/dl y que el 90% fueron hipoglucemias asintomáticas. En los últimos años, los criterios para el diagnóstico de hipoglucemia en los niños con TDC se han ido modificando, siendo cada vez más permisivos en los casos de hipoglucemia asintomática, llegando a tolerar en las últimas guías cifras de hasta 30 mg/dl<sup>95</sup>. Siguiendo este nuevo criterio, nuestra incidencia de hipoglucemia sería mucho menor a la que hemos documentado. Aunque se haya relajado la preocupación por este efecto adverso, conviene seguir monitorizando la glucemia de forma estrecha, especialmente al inicio del tratamiento, en las DCC y sobre todo en los niños de corta edad que deben ser estrechamente vigilados y en los que no se recomienda el ayuno previo.

Los efectos adversos precoces se han descrito en todas las modalidades de TDC. Sin embargo, ocurrieron con mayor frecuencia en las DCC, como ha sido documentado en otros estudios, objetivando que a mayor ratio cetogénica más riesgo de efectos secundarios, siendo la DBIG la de menor incidencia de los mismos<sup>80</sup>.

## **8.2.2 EFECTOS ADVERSOS A MEDIO Y LARGO PLAZO**

### **8.2.2.1 Efectos adversos gastrointestinales**

Hasta la mitad de los pacientes que siguen una TDC pueden presentar efectos adversos de origen digestivo<sup>63,65</sup>. En nuestra serie este porcentaje fue bastante inferior, ya que los padecieron un 10-15% de los niños a lo largo del seguimiento. En algunas revisiones el efecto digestivo más frecuente fueron los vómitos<sup>66</sup>, mientras que en otras más recientes, al igual que la nuestra, fue el estreñimiento<sup>200</sup>, que se ha asociado tanto con las DCC como con las DC-TCM<sup>69</sup>.

Las alteraciones hepáticas en forma de elevación de transaminasas se han reportado en hasta un 9%<sup>65</sup> y, en casos más raros, se ha descrito la aparición de litiasis biliar<sup>66</sup>. Se ha sugerido que la disfunción hepática puede estar relacionada con deficiencias en carnitina y alteraciones en la oxidación de los ácidos grasos, y ha sido relacionada con la toma de ácido valproico<sup>201</sup>. En nuestra serie, curiosamente un mayor porcentaje de niños presentó niveles elevados de AST, ALT y, especialmente, de GGT (10%, 2,5 y 35%, respectivamente), a nivel basal, en comparación con los controles analíticos realizados tras instaurar la dieta. De hecho, las cifras de GGT fueron significativamente inferiores a los 3 meses en comparación con los niveles predieta. El descenso de estos valores podría estar relacionado con la reducción en el número de FAEs administrados tras la mejoría con la dieta. Todos los pacientes con disfunción hepática de nuestra serie (excepto cuatro) tomaron más de un FAE y el que tomaron con mayor frecuencia fue ácido valproico, seguido de clobazam, zonisamida, etosuximida y fenobarbital.

En nuestra serie no encontramos ningún caso de pancreatitis, aunque en la literatura se han descrito algunos casos aislados<sup>65,202</sup>, a veces asociados al tratamiento concomitante con ácido valproico<sup>65</sup>.

### **8.2.2.2 Alteración del perfil lipídico y riesgo cardiovascular**

Debido a que las TDC suponen un aumento de la ingesta de grasas, es frecuente que acarreen alteraciones en el perfil lipídico, incluso desde las primeras semanas<sup>135</sup>. Algunas revisiones lo han considerado como el segundo efecto secundario más frecuente tras los problemas digestivos<sup>66,200</sup>. Tienen lugar en hasta una quinta parte de los pacientes<sup>65</sup>. Nuestra cohorte confirmó la frecuencia de estas alteraciones, ya que, aunque un pequeño porcentaje de pacientes presentaba hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia basalmente, las cifras de colesterol y triglicéridos fueron significativamente superiores, en el caso del colesterol durante todo el seguimiento, mientras que en el caso de los triglicéridos solo fueron significativamente superiores durante el primer año, reduciéndose el porcentaje de niños con hipertrigliceridemia a la mitad a los 2 años con respecto al número de pacientes con cifras basales elevadas de triglicéridos. En la serie de niños que han seguido la TDC durante 2 o más años, observamos que a muy largo plazo sigue habiendo casos de hiperlipemia, especialmente de hipercolesterolemia. Sin embargo, los valores más alterados se observaron durante los primeros meses, de modo que el organismo tiende a normalizar progresivamente dichos parámetros sin necesidad en ningún caso de nuestra serie de fármacos hipolipemiantes. Observamos alteraciones del perfil lipídico tanto en niños con DAM como con DCC. Algunos estudios han objetivado incrementos significativos en los niveles de triglicéridos pero no de colesterol en pacientes con DAM<sup>51</sup>, mientras otros no han observado cambios significativos en ambos parámetros<sup>73</sup>.

Lo importante no es tanto las cifras de colesterol y triglicéridos en sí mismas, sino la posible repercusión en el riesgo cardiovascular que éstas puedan tener a largo plazo. Se han publicado estudios que no encontraron diferencias en el espesor de las capas íntima y media de la carótida a los 6 y 12 meses de iniciar la dieta en comparación con las mediciones basales<sup>203,204</sup>. Sin embargo, en otros estudios han correlacionado la rigidez vascular con los niveles de colesterol y triglicéridos<sup>137</sup>. Un estudio más reciente con 10 pacientes con SD-GLUT1 tratados con TDC no demostró aumento del riesgo cardiovascular<sup>136</sup>. Aunque el tamaño muestral era pequeño, es importante destacar que el seguimiento fue de 10 años.

Para controlar la hiperlipemia se pueden realizar modificaciones dietéticas que consisten en reducir las fuentes de grasas saturadas de la dieta, y en algunos casos emplear fármacos como la atorvastatina que bloquean la síntesis de colesterol<sup>205</sup>. Dichos fármacos no fueron necesarios en ninguno de nuestros pacientes.

Otros efectos de las TDC a nivel cardiaco son las alteraciones en el ECG y la función del miocardio. Se han descrito casos de cardiomiopatías<sup>162</sup> y también un alargamiento del intervalo QT en hasta un 15% de los niños con TDC, con correlación significativa con los niveles bajos de selenio y elevados de cuerpos cetónicos<sup>206</sup>. Incluso se han documentado casos de muerte súbita en niños en tratamiento con TDC asociados a deficiencia de selenio<sup>164</sup>. Sin embargo, otros estudios no han encontrado cambios significativos en el intervalo QT tras la TDC<sup>207,208</sup>. Las TDC producen un estado que remeda al ayuno, por lo que el efecto cardiaco podría ser similar al encontrado en casos de anorexia nerviosa o desnutrición. Sin embargo, parece más probable que se deba a las deficiencias nutricionales que produce, tanto en los niveles de selenio como de magnesio,

ya que este último es el tratamiento de la *torsade de pointes*, arritmia que puede presentarse en los pacientes con QT prolongado.

En nuestra serie, solo un paciente presentó niveles bajos de magnesio a los 3 meses (aunque observamos niveles significativamente inferiores al valor inicial a los 12 y 24 meses), y el déficit de selenio fue también excepcional, afectando solo a 2 niños a los 6 meses, a 4 a los 12 meses y a 1 al año y a los 4 años del tratamiento. Curiosamente, el déficit de selenio fue mucho más frecuente antes de empezar la dieta, ya que lo observamos casi en una quinta parte de los niños. Dado que todos recibieron el suplemento pertinente cuando se objetivó el déficit, los niveles de selenio se elevaron significativamente tras comenzar la TDC. No se realizó una valoración cardiológica en todos los pacientes antes de comenzar la TDC, pero en los que se hizo no se encontraron datos de disfunción miocárdica o alteraciones del ritmo cardíaco. A lo largo del seguimiento, ningún paciente mostró sintomatología relacionada con disfunción cardíaca y ninguno falleció por muerte súbita o por causas relacionadas con la dieta. Aunque el cribado rutinario con ECG no está indicado en los niños con TDC<sup>95</sup>, quizás debería realizarse en todos en los que se encuentre un déficit de selenio. Asimismo, es recomendable realizar determinaciones periódicas de este micronutriente con el fin de suplementarlo si fuese necesario. En los casos en los que no puedan realizarse dichos controles, puede ser útil la suplementación empírica con el fin de evitar alteraciones cardíacas que, aunque muy infrecuentes, pueden ser extremadamente graves.

### **8.2.2.3 Afectación de la salud ósea**

Existen múltiples factores asociados a las TDC que se relacionan con un efecto deletéreo sobre la densidad mineral ósea. La acidosis que asocian las modalidades más restrictivas de TDC desencadena la resorción ósea en un intento de tamponar la acidez.

Además, se reduce la reabsorción tubular de calcio a nivel renal y, por tanto, aumentan sus pérdidas en orina. Por otra parte, los niveles bajos de IGF-1 que se observan en estas dietas influyen en la menor formación de hueso. También la deficiencia de vitamina D, muy frecuente en pacientes neurológicos, contribuye en este mismo sentido.

Estos efectos negativos sobre la salud del hueso se han observado principalmente a largo plazo y se manifiestan como osteopenia e incluso osteoporosis con fracturas<sup>65,131,155</sup>. En nuestra serie, la acidosis tuvo lugar entre un 5 y un 9% de los pacientes, niveles bajos de IGF1 se detectaron en torno al 10%, y la hipercalciuria fue muy frecuente, tal y como se explica en el apartado correspondiente. Sin embargo, solo dos pacientes de nuestra serie presentaron una fractura como complicación de la TDC. Uno de ellos la presentó a los 21 meses de su inicio. Se trataba de un caso con hipercalciuria y una ingesta deficiente de agua en la que los padres rechazaron la colocación de una sonda nasogástrica para asegurar un estado de hidratación adecuado. El segundo tuvo lugar en el contexto de la práctica deportiva a los 7 años de la TDC. En este paciente se habían realizado densitometrías previas, presentando un z score de -1,096 en la realizada en el último control previo a la fractura. Nuestra incidencia de fracturas fue mucho menor a la reportada en otros estudios en los que alcanza hasta un 8,8%<sup>209</sup>. Todos nuestros pacientes recibieron suplementación con calcio y vitamina D cuando no se alcanzaron las ingestas mínimas recomendadas, como recomiendan las guías<sup>95</sup>, lo cual podría explicar nuestra menor incidencia.

Aunque Svedlund no encontró alteraciones en la masa ósea en niños con DAM<sup>152</sup>, teniendo en cuenta los resultados obtenidos por Bergqvist y Simm<sup>155,210</sup>, en los que se aprecian claras reducciones en la densidad mineral ósea, las últimas guías recomiendan realizar de forma seriada densitometrías óseas en los niños que siguen cualquier TDC

durante más de 2 años<sup>95</sup>. No obstante, en uno de nuestros pacientes la fractura ocurrió antes de los 2 años de tratamiento. Por ello, es importante tener en cuenta no solo la duración de la dieta, sino también otros factores, como son la acidosis, el déficit de vitamina D o la escasa ingesta de líquidos. La hipercalciuria debe ser un dato a tener muy en cuenta a la hora de evaluar la salud mineral ósea, dado que la pérdida de calcio en orina puede ser reflejo de una pérdida ósea mineral. No se deben suspender por tanto los suplementos de calcio en los casos de hipercalciuria, ya que esto empeoraría aun más la situación. Otro factor a valorar, además de los comentados, es el tratamiento farmacológico antiepiléptico que toma el paciente, ya que algunos medicamentos interfieren directamente en la absorción de calcio, los niveles de vitamina D y la formación de hueso.

#### **8.2.2.4 Hipercalciuria y litiasis renal**

La aparición de cálculos renales se ha descrito en un 3-7% de los pacientes que siguen una TDC<sup>65,127,128</sup>. Sin embargo, nuestra incidencia (0,62%) fue claramente inferior a la reportada, ya que solo un paciente presentó nefrocalcinosis al año de tratamiento en un control ecográfico rutinario realizado por presentar hipercalciuria. Curiosamente, este paciente padecía un síndrome de CLIFAHDD (síndrome de contracturas congénitas faciales y de extremidades con hipotonía y retraso del desarrollo) asociado a alteraciones en los canales de sodio que podrían haber aumentado su susceptibilidad a la litiasis renal. Nuestra baja incidencia puede estar relacionada con la monitorización permanente de los niveles de calcio/creatinina en orina que se realiza basalmente y en cada control. Aunque nuestro único caso tuvo lugar durante el primer año de dieta, parece que las probabilidades de litiasis renal van aumentando a medida que se prolonga la dieta a largo plazo<sup>131</sup>.

Múltiples factores aumentan el riesgo de litiasis renal en niños con TDC<sup>128,130</sup>. La acidosis reduce la tasa de reabsorción tubular de calcio, lo cual aumenta su excreción en orina y puede conllevar hipercalciuria. También produce un aumento de la resorción mineral ósea que aumenta el calcio circulante. Por otra parte, la acidosis favorece la reabsorción urinaria de citrato que se encarga de unirse al calcio para evitar su cristalización. Además, muchos pacientes que siguen una TDC reciben tratamiento concomitante con inhibidores de la anhidrasa carbónica, como son topiramato, acetazolaminada y zonisamida. Aunque su efecto parece controvertido, dado que pueden favorecer la acidosis, la hipercalciuria y la hipocitraturia, pueden ser factores que contribuyan al desarrollo de litiasis renal<sup>127,129</sup>.

La hipercalciuria sí fue un efecto secundario muy frecuente en nuestra serie, llegando a detectarlo en al menos una quinta parte de los pacientes a lo largo del seguimiento (excepto a los 5 años en que ningún paciente la presentó, y a los 6 años en que afectó al 16%), alcanzando la máxima incidencia a los 2 años, cuando casi la mitad de los niños que seguían con la dieta presentaba hipercalciuria. Se pautó citrato potásico en todos los casos en los que se detectó hipercalciuria en nuestra serie. Este compuesto alcaliniza la orina y reduce la cristalización del calcio urinario. Se ha comprobado que reduce hasta 7 veces el riesgo de nefrolitiasis<sup>134</sup>. Algunos autores han planteado el uso profiláctico del citrato potásico en todos los pacientes que comienzan una TDC<sup>153</sup>, esto facilita el seguimiento, ya que no serían necesarias las determinaciones de las relaciones calcio/creatinina en orina. Además, la reducción de la acidosis podría también reducir la pérdida mineral ósea. Sin embargo, nuestro centro opta por administrarlo solo en pacientes que presentan hipercalciuria o que presentan factores de riesgo para la formación de cálculos renales, como son la presencia de antecedentes familiares o



personales de nefrolitiasis, el tratamiento con inhibidores de la anhidrasa carbónica o la aparición de acidosis o hipocitraturia.

#### **8.2.2.5 Repercusión en los niveles de vitaminas, minerales y otros nutrientes**

Dado que las TDC son dietas desbalanceadas, cuanto más restrictivas son, más se asocian a deficiencias nutricionales. Como ya se ha comentado en el apartado de alteraciones cardiológicas, se han descrito déficits de magnesio<sup>160</sup> y selenio<sup>161</sup>.

En cuanto a la repercusión en los niveles de vitaminas liposolubles, generalmente la A y la E no suelen alterarse, incluso pueden aumentar en las DCC y la DC-TCM<sup>160</sup>. En nuestra serie, casi un 2% y un 6% de los niños presentaban niveles bajos de estas vitaminas, respectivamente, en la evaluación predieta. El número de niños con estas deficiencias se redujo a lo largo del seguimiento gracias a la suplementación recibida y a un mayor control en su alimentación, excepto a los 12 meses, en los que en torno a un 6% y un 10% presentó niveles bajos de vitaminas A y E, respectivamente, siendo incluso estadísticamente significativamente más bajos los niveles de vitamina A en este momento con respecto al estado basal. En los niños con tratamientos prolongados, en general, los valores fueron normales.

La vitamina D es la vitamina liposoluble que se afecta con más frecuencia en niños con TDC. Sin embargo, los niveles bajos son habituales en niños con patología neurológica, habiéndose observado una ingesta deficitaria en hasta el 47% de los niños antes de comenzar la TDC, un déficit de 25-OH-vitamina D en un 4%, y niveles insuficientes en hasta un 51%<sup>154</sup>. En nuestra cohorte, un 15% de los pacientes presentaba niveles de esta vitamina inferiores a 20 ng/ml, incluso un paciente presentaba un hiperparatiroidismo secundario con niveles de vitamina D inferiores a 5 ng/ml. Este porcentaje fue mucho menor en el grupo de los lactantes, padeciendo un déficit de

vitamina D solo uno de ellos antes de la DCC (2%). Esto se debe probablemente a que en nuestro país todos los lactantes son suplementados con 400 UI diarias de colecalciferol hasta el año de edad. A lo largo del seguimiento, el porcentaje de niños con esta deficiencia disminuyó, incluso los niveles aumentaron significativamente al año de tratamiento en comparación con el valor inicial. De entre los pacientes que recibieron un tratamiento prolongado, solo uno presentó niveles deficientes a los 4 años del inicio de la TDC. Por tanto, podemos decir que, en general, el tratamiento con TDC (y la suplementación que éste conlleva además de la monitorización nutricional) mejoró el estado de la vitamina D en pacientes neurológicos.

Las vitaminas del grupo B necesitan ser administradas siempre en complementos alimenticios libres de carbohidratos<sup>95</sup>. En nuestro centro se evaluaron periódicamente los niveles de B12 y B9. Éstos fueron bajos basalmente en un 2% y 3%, respectivamente. Sin embargo, ningún paciente presentó niveles deficitarios en los controles sucesivos tras la instauración de la dieta, ni siquiera en los casos en los que se mantuvo de forma prolongada, probablemente gracias a la suplementación recibida.

El déficit de carnitina también se asocia a las TDC, especialmente cuando el paciente es de corta edad, se emplea de forma concomitante ácido valproico o la dieta se mantiene a largo plazo<sup>156.158</sup>. Suele afectar a menos de una quinta parte de los pacientes<sup>65,156</sup>, y se relaciona con una ingesta insuficiente de carnitina o sus aminoácidos precursores (lisina y metionina), asociada a un aumento de sus demandas (ya que la carnitina es necesaria para el transporte de ácidos grasos de cadena larga al interior mitocondrial para ser transformados en energía) y al uso concomitante de algunos fármacos cuyo empleo a largo plazo también consume sus reservas<sup>65</sup>. Entre nuestros pacientes, un 10% presentaba un déficit basal de carnitina, reduciéndose este porcentaje a

lo largo del seguimiento, incluso siendo los niveles a los 2 años de la dieta significativamente superiores a los basales. En el grupo de los menores de 2 años, a pesar de estar descrito un mayor riesgo, ninguno presentó esta deficiencia. Cuando evaluamos el tratamiento prolongado durante más de 2 años, solo dos niños presentaron niveles bajos de carnitina. Ambos eran niños menores de 4 años y ninguno recibía tratamiento con ácido valproico. Probablemente no hemos encontrado asociación entre el déficit de carnitina y el uso concomitante de ácido valproico y TDC porque muchos pacientes que recibían tratamiento con este FAE ya recibían suplementación con carnitina antes de comenzar la TDC.

Los aportes de calcio y fósforo también son insuficientes, especialmente en las dietas clásicas. En nuestra experiencia, los niveles de calcio tienden a ser normales en casi la totalidad de los niños, tanto al inicio de la dieta como posteriormente. Sin embargo, los niveles de fósforo fueron bajos en un 20-39% de los niños durante los dos primeros años de dieta, por lo que quizás sea necesario aumentar los aportes de fósforo, ya sea a través de suplementos o reforzando la ingesta de alimentos que lo contienen.

La suplementación con zinc ha sido recomendada en guías anteriores<sup>211</sup> sin tener demasiadas evidencias sobre su deficiencia. En un estudio de 2012 en pacientes con DCC o DC-TCM no encontraron variaciones significativas en los niveles de zinc al año de iniciar la dieta<sup>160</sup>. En nuestra serie, 7,5% de los pacientes presentaban niveles bajos antes de la dieta, presentando posteriormente niveles subóptimos en casos aislados a lo largo del seguimiento (2 a los 6 meses, 4 a los 12 meses, y 1 a los 4 años). Por tanto, con las dietas prescritas y los suplementos multivitamínicos recomendados de rutina, parece poco probable que las TDC conlleven deficiencias en este micronutriente.

### 8.2.2.6 Repercusión en el crecimiento

Uno de los efectos que más preocupa cuando se inicia una TDC en un paciente pediátrico, tanto al personal sanitario como a los padres y cuidadores, es la repercusión que pueda tener una dieta tan distinta a las dietas recomendadas durante la infancia en el crecimiento y desarrollo del paciente. A pesar de haber cumplido 100 años de experiencia en el empleo de las TDC, aun hoy en día perdura la controversia sobre dicha repercusión. Existen varias condiciones que dificultan llegar a una conclusión definitiva sobre este aspecto. En primer lugar, los niños que comienzan una TDC no son niños sanos, por lo que su potencial de crecimiento puede verse afectado por la propia enfermedad que padecen. De hecho, muchos pacientes presentan un grave compromiso de su neurodesarrollo al inicio de la dieta consecuencia de su patología y de la propia epilepsia que durante meses (y en su mayoría durante años) ha sido incontrolable con múltiples FAEs (que también puede influir en la evolución del peso y talla). Por ello, estos pacientes muchas veces son evaluados con tablas de crecimiento específicas para niños con discapacidad. No obstante, nosotros hemos preferido emplear las tablas de la OMS porque resultan más representativas de la afectación del crecimiento de estos niños, aunque sea complejo discriminar qué parte se debe a la enfermedad y cuál a la dieta. Es ilustrativo de que la propia enfermedad afecta al crecimiento el hecho de que casi un 15% de nuestra muestra presentase un z score de talla inferior a -2. Este mismo porcentaje lo observamos en el grupo de 42 lactantes.

Por otra parte, la mayoría de los estudios que evalúan la repercusión de las TDC sobre el crecimiento cuentan con un tamaño muestral pequeño o el seguimiento es a corto plazo. Además, cuando se intentan realizar revisiones sistemáticas o metaanálisis, los estudios que se agrupan muchas veces son poco comparables ya que los protocolos de

instauración de las dietas han ido variando a lo largo de los años, realizándose inicialmente dietas con importante restricción calórica o proteica que lógicamente afectan al crecimiento. Por último, los tipos de TDC son muy diferentes entre sí y, por tanto, a veces difíciles de comparar.

Aunque parece que a corto plazo se mantiene un adecuado estado nutricional<sup>141</sup>, lo importante es evaluar la repercusión de un tratamiento prolongado. En el estudio retrospectivo de Vining<sup>142</sup> con 237 niños tratados con DCC, se constató una reducción de los z score de peso en los primeros tres meses de tratamiento, manteniéndose esta bajada inicial estable en aquellos pacientes que habían comenzado la dieta con un z score de peso inferior a la media. En cuanto a la talla, objetivaron una reducción leve de la puntuación z a los 6 meses, y esta tendencia fue mayor a medida que pasaba el tiempo, y afectaba más a los pacientes de menor edad. Otras cohortes más pequeñas constataron esta afectación de la talla<sup>143</sup>. Es importante destacar que ambos estudios fueron realizados en niños sometidos a restricción calórica. Otras publicaciones han constatado que la puntuación z de talla para la edad se reduce significativamente, existiendo correlación con niveles de cetosis más elevados<sup>145,146</sup>. Al contrario, un estudio prospectivo de 25 niños encontró un aumento significativo de la talla<sup>144</sup>. Por otra parte, parece que, aunque la talla se afecta sobre todo en niños de menor edad o con epilepsia grave, la repercusión sobre el crecimiento es reversible<sup>147</sup>.

Nuestros resultados se encuentran dentro de los márgenes publicados. El porcentaje de niños con z score de talla inferior a -2 fue de 15-24% a lo largo de los primeros 2 años. Series publicadas anteriormente con un menor número de pacientes en comparación a la nuestra de 160 niños, reportaron una desaceleración del crecimiento entre un 6% y un 20%<sup>148-150</sup>. Nuestro trabajo también ha observado cierta tendencia a una

mayor afectación de la talla en los niños de menor edad, aunque la mayoría de los lactantes consiguió mantener una puntuación z de talla por encima de -2.

En cuanto a qué dieta afecta más al crecimiento, cabría esperar que las más restrictivas conllevaran mayor impacto en la antropometría de los pacientes. Sin embargo, en nuestra serie no observamos diferencias significativas en cuanto a la talla en función del tipo de dieta.

Nuestros pacientes recibieron siempre una ingesta proteica suficiente para asegurar un crecimiento adecuado, independientemente de cuál fuese el tipo de dieta elegido. En general, pocos casos tenían acidosis, y si la padecían era leve, y los niveles medios de cetosis eran de 3-3,5 mmol/L. Por tanto, otros factores podrían estar relacionados con la afectación de la talla en nuestra cohorte. Niveles subóptimos de IGF1 fueron observados en hasta un 12% de nuestros niños a lo largo del seguimiento, y en un 6% basalmente. Otros estudios también han correlacionado el descenso de los niveles de IGF1 con una menor velocidad de crecimiento<sup>139</sup>.

## **8.3 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS**

### **8.3.1 MODIFICACIONES DEL TRANSCRIPTOMA INDUCIDAS POR LAS TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS**

Los mecanismos de acción de las TDC han sido ampliamente investigados. Sin embargo, aunque existen diversas teorías, no se conocen con exactitud. En nuestro estudio hemos realizado un análisis del transcriptoma nunca llevado a cabo en niños con epilepsia refractaria.

Hemos observado que, tras al menos 6 meses de TDC, varias rutas biológicas se ven significativamente afectadas. De ellas, las más relacionadas con la epilepsia son las del transporte transmembrana de potasio, el desarrollo del sistema nervioso y, sobre todo, las vías de transmisión sináptica. Esta ruta biológica de transmisión sináptica experimentó cambios en 19 genes, siendo solo 3 sobreexpresados tras el tratamiento (CACNA1C, FGF12 y DOC2A) y la mayoría de ellos infraexpresados. Estos 19 genes modificados pertenecían fundamentalmente a 3 categorías, ya que codificaban para canales iónicos, para proteínas estructurales de la sinapsis o para receptores de neurotransmisores.

En cuanto a los canales iónicos, observamos modificaciones principalmente en los canales de potasio, que fueron infraexpresados. Este hecho puede parecer contradictorio, ya que la función principal de los canales de potasio a nivel del SNC es la de alcanzar la repolarización tras un potencial de acción. Sin embargo, la infraexpresión de algunos canales de potasio puede tener efectos positivos. El gen KCNJ12, que aparece infraexpresado tras la TDC en nuestro estudio, codifica para Kir 2.2, un canal de potasio rectificador interno. Se ha documentado que esta proteína se encuentra regulada al alza en casos de epilepsia, probablemente como mecanismo de defensa para contrarrestar las hiperexcitabilidad neuronal en esta patología<sup>23</sup>. El hecho de que tras nuestra intervención este canal se vea infraexpresado, probablemente sea un reflejo de la mejoría clínica de los pacientes, ya que, si presentan menos crisis epilépticas, no es necesario expresar en exceso este canal como mecanismo de adaptación. Otro gen que sufre una subexpresión con la TDC es KCNMA1, que codifica para un canal de potasio dependiente de calcio. Este canal se ha relacionado con hiperexcitabilidad porque induce una repolarización rápida y un aumento de los potenciales de acción<sup>20</sup>. Se ha sugerido que el bloqueo de estos canales podría ser un potencial tratamiento antiepiléptico<sup>212</sup>. Por tanto, el hecho de que nuestra intervención reduzca su expresión puede ser uno de los mecanismos por los

que las TDC reduzcan las crisis. El tercer canal de potasio infraexpresado tras el tratamiento fue el codificado por el gen *KCNK6*. Se ha observado que su sobreexpresión en astrocitos perivasculares del hipocampo se asocia a una regulación anormal del flujo sanguíneo que puede contribuir en la aparición de crisis epilépticas<sup>21</sup>. Si las TDC reducen la expresión de este canal, consecuentemente reducirían el riesgo de convulsiones.

El único canal iónico que experimentó un aumento en su expresión con la dieta fue el canal de calcio tipo L dependiente de voltaje Cav 1.2, codificado por *CACNA1C*. Mutaciones en este gen, que se expresa tanto en neuronas como en astrocitos, se han relacionado con casos de epilepsia, con y sin anomalías estructurales asociadas como polimicrogiria<sup>24</sup>.

Respecto al efecto de la dieta sobre los receptores de neurotransmisores, se ha observado modulación de su expresión a la baja en todos los casos. Dos de los receptores de la orexina (HCTR 1 y 2) se encontraron infraexpresados. La orexina (o hipocretina) es un neuropéptido que promueve la vigilia y su disfunción se ha relacionado con trastornos del sueño, que están íntimamente relacionados con la epilepsia. Además, antagonistas de sus receptores pueden reducir las convulsiones en ratones<sup>27</sup>. Nuestros resultados apoyan estos datos, ya que el tratamiento mejoró las crisis y redujo la expresión de los receptores de orexina. El gen *HTR6*, que codifica para un receptor de serotonina, también redujo su expresión. La activación de estos receptores puede prolongar la excitabilidad neuronal. Al reducir su expresión con la dieta, se reduciría esta excitabilidad y, por tanto, la probabilidad de crisis. De hecho, el bloqueo de la vía del receptor 5-HT6/mTor puede ser una diana terapéutica para la epilepsia<sup>213</sup>. Así mismo, el gen que codifica para el receptor de la melatonina MT1 también experimentó una menor expresión. La expresión de los receptores MT1 y 2 se ha visto aumentada en el hipocampo de modelos de ratas con



epilepsia inducida por pilocarpina durante el estado epiléptico<sup>214</sup>, probablemente como mecanismo compensatorio porque se asocian a la inhibición de la LTP (potenciación a largo plazo) y la excitabilidad<sup>28</sup>. En nuestro estudio se observó una mayor expresión de este gen antes de la dieta, probablemente porque la mejoría de las crisis reduciría la expresión de este receptor como mecanismo compensador. El gen GRM3, que codifica para el receptor metabotrópico de glutamato mGlu3, también experimentó una menor expresión con la TDC. El glutamato es uno de los principales neurotransmisores excitatorios. El receptor mGlu3 está acoplado a proteínas de tipo Gi/Go que inhiben a la adenil ciclasa y canales de calcio<sup>215</sup>. Se ha descrito una mayor expresión de este receptor en casos de epilepsia<sup>25</sup>. Además, un antagonista de dicho receptor reduce las descargas. Nuestros resultados son coherentes con estos datos. También hemos observado una reducción de uno de los receptores colinérgicos que han sido descritos en casos de epilepsia<sup>19</sup>.

Respecto a la expresión génica de las proteínas implicadas en la estructura de la sinapsis, solo en dos casos se produjo una mayor expresión tras la dieta. Los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) están involucrados en una gran cantidad de procesos biológicos, que incluyen el desarrollo embrionario, el crecimiento celular, la morfogénesis y la reparación de tejidos. Alteraciones en la función de FGF12 se han relacionado con encefalopatías epilépticas precoces. También se han descrito casos de autismo y epilepsia asociados a alteraciones en el brazo corto del cromosoma 16 donde se encuentra DOC2A<sup>32,216</sup>, que codifica para la proteína alfa que contiene un dominio doble tipo C2 que a nivel cerebral está implicada en la liberación de neurotransmisores dependientes del calcio. Si la disfunción de ambas sustancias se asocia con la aparición de crisis, parece coherente que la sobreexpresión de estas pueda ejercer un mecanismo protector contra la epilepsia.

El resto de las proteínas de la sinapsis fueron infraexpresadas. La MAOA es una enzima que se localiza en la membrana mitocondrial externa y se encarga de la descomposición de las monoaminas (noradrenalina, serotonina y dopamina), su inhibición se ha asociado a efectos anticonvulsivantes<sup>33</sup> y la infraexpresión que hemos observado con la dieta podría tener ese mismo efecto y justificar la mejora de las crisis en los pacientes. Lo mismo ocurre con la PRKC, que está implicada en múltiples procesos biológicos. También ha sido relacionada con la epilepsia<sup>34</sup> y su inhibición parece tener un papel anticonvulsivante<sup>35</sup>. La infraexpresión de esta proteína, por tanto, también refuerza el efecto clínico de la TDC. DLGAP1 codifica para la proteína 1 asociada a discos grandes, también conocida como proteína asociada a guanilato kinasa, que forma parte de la densidad postsináptica. La densidad postsináptica es un complejo multiproteico con múltiples funciones, entre las que figuran el anclaje o la movilización de receptores de neurotransmisores o de sus proteínas reguladoras en la membrana celular, con lo que controla la señalización neuronal. Entre las numerosas proteínas que conforman la densidad postsináptica se encuentra la familia de proteínas asociadas a discos grandes, que funcionan como andamiaje de esta matriz y vinculan los receptores de glutamato en la membrana postsináptica a otros receptores de glutamato, a las proteínas de señalización y a los componentes del citoesqueleto. Una de las proteínas con las que interacciona es con DLG4, que pertenece a la familia de las guanilato ciclasas asociadas a membranas, que también participan en el andamiaje postináptico y en la modulación de canales iónicos, y que se han relacionado con diferentes patologías neurológicas. Concretamente, DGL4 interactúa con la subunidad del canal de calcio dependiente del voltaje. Este canal iónico puede modular los receptores de glutamato AMPA y ralentizar su desactivación tras la unión del neurotransmisor, aumentando así la excitabilidad neuronal<sup>31</sup>. Nuestros resultados muestran que las TDC regulan a la baja esta vía de señalización y, por lo tanto,

disminuyen la excitabilidad neuronal y la probabilidad de crisis. Igual ocurre con el gen GNG10, que codifica para la subunidad gamma 10 de la proteína de unión al nucleótido guanina o proteínas G. Éstas son proteínas triméricas (formadas por subunidades alfa-beta-gamma) que regulan el flujo de información desde la membrana al interior celular empleando GTP (guanosín trifosfato). La subunidad alfa es la que está unida al GTP, y las beta y gamma se encargan de modular la actividad enzimática y de canales iónicos. En nuestra experiencia, estas proteínas fueron infraexpresadas con la TDC. Por último, respecto a los cambios en la expresión génica observados, encontramos una infraexpresión de BSN, que codifica para una proteína de la citomatrix presináptica, otra proteína de andamiaje, en este caso presináptica, relacionada con la regulación de la liberación de neurotransmisores.

Una vez evaluados los cambios que las TDC produjeron sobre la expresión génica, a continuación, se debate sobre los efectos de la dieta en los miARN, que son ARN interferentes encargados de la regulación de la expresión génica. En las muestras postdieta, observamos que la expresión de 230 miARN cambió de forma significativa con respecto al estudio basal. Entre ellos, destaca la menor expresión de miR-185-5p, que se relaciona con el estrés oxidativo. Cuando una célula se expone a niveles altos de glucosa, se ponen en marcha mecanismos antioxidantes como las superóxido dismutasas, las catalasas y la glutatión peroxidasa. Se ha comprobado que, no tanto los niveles elevados, sino las cifras oscilantes de glucosa, alteran la respuesta celular antioxidante, ya que no producen una respuesta compensatoria completa de los mecanismos antioxidantes, y no se elevan los niveles de glutatión peroxidasa. Parece que el mecanismo por el que tiene lugar este efecto es mediante la elevación de la expresión de miR-185-5p, que bloquea la expresión de esta enzima<sup>217</sup>. Precisamente, las TDC del tipo que sean (incluso la DBIG), reducen las variaciones de glucemia, manteniendo niveles estables. Esto explicaría que la

expresión de miR-185-5p haya sido regulada a la baja en nuestro estudio, y refuerza el mecanismo antioxidante de estas dietas. Otros miARN regulan la plasticidad neuronal y el neurodesarrollo. Uno de ellos, miR-330 ha sido relacionado con la estabilidad de las neuronas del hipocampo<sup>218</sup> y con un efecto protector en la enfermedad de Alzheimer, donde reduce la formación de amiloide, el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial<sup>219</sup>. Dietas enriquecidas en PUFAS aumentan este miARN<sup>220</sup>, al igual que nuestra intervención, lo cual refuerza el efecto neuroprotector de las TDC.

Mediante el análisis combinado de la expresión de los ARNm y miARN también se obtuvieron resultados interesantes. Los siete miARN que regularon genes relacionados con el SNC en nuestro estudio fueron: miR-185-5p, miRNA-199b-5p, miRNA-875-5p, miRNA-9-5p, miRNA-93-5p, miRNA-153-3p y miRNA-323a-3p. Estos miARN regulan entre 7 y 31 genes cada uno, pero solo 8 de los genes que regulan están involucrados en el SNC. Algunos ya han sido comentados anteriormente: FGF12 (regulado por miR-93-5p), CACNA1C (regulado por miR-323a-3p y miR-153-3p), BSN (regulado por miR-185-5p y miR-153-3p) y DOC2A (regulado también por miR-153-3p). Además, se modificaron los miARN que modulaban otros cuatro genes: CDH2, NEGR1, NEDD4 y CNTN2. En nuestro trabajo observamos una menor expresión de miR-185-5p y miR-199-5p. Estos miARN regulan la expresión de los genes CNTN2 y CDH2, respectivamente. Estos genes codifican para la cadherina 2 y la contactina 2, respectivamente. Ambas son proteínas de la membrana. La contactina pertenece a la familia de las inmunoglobulinas y tiene un papel importante en la elongación axonal y la migración celular en el periodo fetal, y en la mielinización posteriormente. Ha sido relacionada con enfermedades autoinmunes del SNC. Las cadherinas son las principales moléculas implicadas en las uniones célula-célula. Se han descrito casos de epilepsia en pacientes que presentaban mutaciones de los genes que codifican ambas proteínas<sup>36,39</sup>. Dado que los miARN que regulan estas

proteínas se encontraron infraexpresados, deberíamos haber observado una mayor expresión de ambas proteínas. Sin embargo, esto solo ocurrió en el caso de la cadherina y no en el caso de la contactina. Observamos un resultado similar en los otros dos genes. El miR-875-5 y el miR-9-5p fueron regulados a la baja con nuestra intervención, por lo que lo esperable sería que los genes cuya expresión bloquean (NEGR1 y NEDD4, respectivamente) hubiesen aumentado su expresión. NEGR1 codifica para el regulador del crecimiento neuronal 1 que se relaciona con la regeneración axonal y cuya deficiencia se asocia con crisis epilépticas<sup>37</sup>. NEDD4 codifica para la proteína ubiquitín ligasa E3 que, como su nombre indica, participa en la ubiquitinación de las proteínas. La ubiquitinación es uno de los mecanismos de control de la expresión génica que tiene lugar a nivel postraduccional y consiste en la adición de una o más moléculas de ubiquitina, lo cual puede tener varias consecuencias, siendo lo más habitual la degradación de la proteína marcada. NEDD4 está implicado en gran número de funciones y regula la expresión de múltiples canales y receptores. Su deficiencia también ha sido relacionada con epilepsia<sup>38</sup>. Lo lógico hubiese sido que ambos genes hubiesen visto aumentada su expresión tras la TDC, ya que observamos una mejoría clínica y sus miARN fueron infraexpresados tras la dieta. Sin embargo, no encontramos dicho aumento en su expresión. Esto refuerza la idea de lo extremadamente complejo que es la regulación de la expresión génica y que probablemente muchos otros mecanismos y rutas biológicas intervengan en este proceso.

### 8.3.2 CAMBIOS METABOLÓMICOS INDUCIDOS POR LAS TERAPIAS DIETÉTICAS CETOGÉNICAS

El metaboloma preintervención fue claramente distinto al obtenido tras la TDC. Entre las sustancias que más contribuyeron a la modificación metabólica observada se encontraron, lógicamente, los cuerpos cetónicos acetoacetato y betahidroxibutirato (que se incrementaron) y la glucosa (que se redujo). Sin embargo, también se redujeron algunos aminoácidos glucogénicos.

La glutamina fue otro de los principales metabolitos modificados a la baja. La glutamina es un aminoácido no esencial que, en condiciones normales, constituye el aminoácido más abundante en la sangre<sup>221</sup>. Tiene un papel versátil en el metabolismo celular, ya que participa en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, en la síntesis de otros aminoácidos y nucleótidos, y en la producción de glutatión y glutamato<sup>221</sup>. El hecho de que después de la intervención sus niveles se encuentren disminuídos se puede interpretar como un efecto positivo o negativo de las TDC. Por una parte, se ha descrito que en situaciones de estrés celular, como tras traumatismos, infecciones, cirugías, y también inanición, los niveles se reducen de forma marcada<sup>221</sup>. Las TDC suponen una imitación del ayuno y un reto metabólico al que las células deben adaptarse. Los niveles reducidos de glutamina podrían ser reflejo de este estrés celular. Por otra parte, la glutamina se puede convertir en glutamato mediante la acción de la glutaminasa. Quizás una reducción de la glutamina indique una mayor actividad de la glutaminasa. Esta enzima se ha visto sobreexpresada en la microglía de diferentes patologías neurológicas y ha sido relacionada con neuroinflamación<sup>222</sup>. El glutamato derivado de la glutamina por acción de la glutaminasa puede actuar como neurotransmisor excitatorio, pero también como precursor de GABA. De hecho, en condiciones de cetosis hay más glutamato disponible

para la glutamato decarboxilasa que participa en su conversión en GABA<sup>223</sup>. En nuestro estudio también se observó un descenso de los niveles de glutamato y prolina, que deriva del anterior. Por otra parte, el glutamato participa en la biosíntesis de glutatión, que constituye uno de los principales reguladores del estrés oxidativo. Además, la glutamato deshidrogenasa puede transformarlo en alfa-cetoglutarato que participa en la biosíntesis de ácidos grasos, la producción de NADH y en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos<sup>221</sup>. La propia glutamina también puede generar NADPH<sup>221</sup>. Por tanto, quizás el descenso de los niveles de glutamina se deba a que es utilizada para mejorar el metabolismo energético y mitigar el estrés oxidativo. Además, el hallazgo de unos niveles más bajos de glutamina con las TDC podría constituir uno de los fundamentos para emplearlas en tumores, ya que la excesiva proliferación celular en células cancerosas precisa de una constante fuente energética, por lo que emplean grandes cantidades de glucosa y glutamina, excediendo su capacidad de biosíntesis<sup>221</sup>. De hecho, se ha descrito que la privación en glutamina puede suprimir el crecimiento celular en algunos cánceres. Existen estudios en animales en los que se han tratado glioblastomas con DC y antagonistas de la glutamina y han obtenido buenos resultados en la mejoría de los síntomas y la supervivencia y la reducción del edema y la inflamación<sup>224</sup>.

Los niveles de alanina también experimentaron un descenso tras las TDC. Otros estudios también han descrito una correlación inversa entre las cifras de cuerpos cetónicos y alanina y piruvato, y directa entre las cifras de cuerpos cetónicos y lactato<sup>225</sup>. Dado que la alanina puede ser precursora de la glucosa, quizás este descenso se deba a un mecanismo compensatorio de la cetonemia. Pero también puede ser consecuencia de la reducción en los niveles de piruvato que es el precursor de la alanina. Este descenso de piruvato podría deberse a su transformación en lactato por la lactato deshidrogenasa.

### **8.3.3 REPERCUSIÓN DE LAS TERAPIAS CETOGÉNICAS EN EL ESTRÉS OXIDATIVO**

El efecto de las TDC sobre el estrés oxidativo sigue siendo hoy en día un tema de controversia. Uno de los principales marcadores de estrés oxidativo son las ERO, pero su vida media es corta por lo que su medición es complicada. Por ello se suelen medir las sustancias que sufren los efectos negativos de estas ERO, como son los lípidos peroxidados o las proteínas oxidadas. En nuestro trabajo encontramos que las proteínas oxidadas, en su conjunto, experimentaban un incremento tras el tratamiento con una DCC o una DAM, y la concentración de MDA prácticamente no experimentó ninguna modificación. Esto resulta paradójico, ya que los resultados obtenidos a nivel de transcriptómica orientan hacia un efecto protector de las TDC en cuanto al estrés oxidativo.

No existen estudios comparables al nuestro publicados por el momento. En el año 2015 se publicó una revisión sobre el impacto de la DC en el estrés oxidativo en niños con epilepsia. Los autores concluyeron que la hipercolesterolemia asociada a la DC podría promover alteraciones estructurales en las lipoproteínas de baja densidad que posiblemente podrían favorecer procesos oxidativos<sup>226</sup>. La mayoría de los trabajos que evalúan los efectos de la DC en el estrés oxidativo han sido realizados en modelos animales, principalmente en ratas. Uno de ellos evaluó el efecto de una DC en roedores sometidos a un ejercicio físico extenuante que produce un incremento del estrés oxidativo en los tejidos. Observaron que los animales que seguían una DC se recuperaban mejor, y que los parámetros de lesión tisular inducida por el ejercicio (aumento de lactato en músculo, amonio y nitrógeno ureico, ALT, creatín kinasa y lactato deshidrogenasa) eran inferiores, aunque los marcadores de estrés oxidativo se vieron incrementados a nivel



muscular<sup>227</sup>. Otros trabajos en ratas sometidas a ejercicio han observado un aumento de la glutatión peroxidasa hepática y una reducción del glutatión oxidado<sup>228,229</sup>, aunque a largo plazo la dieta parece alterar la fisiología mitocondrial del músculo esquelético<sup>229</sup>.

Otras publicaciones han medido el estrés oxidativo en células endoteliales. En una de ellas se observó que el acetoacetado (y no el betahidroxibutirato) provocaba un aumento de la peroxidación lípidica<sup>230</sup>. Otro trabajo más reciente midió el daño oxidativo del acetato y del betahidroxibutirato, ambos producían un efecto genotóxico moderado mediado por un aumento significativo del daño oxidativo del ADN. Sin embargo, cuando las mismas células eran pretratadas con cuerpos cetónicos durante 48 horas y posteriormente sufrían una exposición a un insulto oxidativo como es el peróxido de hidrógeno, disminuyó el daño oxidativo en comparación con las células no tratadas sometidas a la misma oxidación. Además, encontraron un aumento de factor nuclear eritroide 2 (Nrf2). Estos datos sugieren que los cuerpos cetónicos pueden inducir un estrés oxidativo moderado que activaría el factor de transcripción de Nrf2 que induciría la expresión de genes diana implicados en el sistema antioxidante<sup>231</sup>.

Otros estudios en el campo de la oncología han objetivado que la DC produce mayor estrés oxidativo intratumoral en modelos animales de cáncer de colon, lo cual tiene un efecto beneficioso, ya que favorece la apoptosis de las células malignas<sup>232</sup>. También se ha observado un menor crecimiento tumoral en ratas con cáncer de pulmón que recibieron DC y radioterapia y en las que se observó un aumento del estrés oxidativo<sup>233</sup>.

En cuanto a los efectos antioxidantes de las TDC en el SNC, existen múltiples estudios en modelos animales, especialmente en patologías de tipo traumático e isquémico. En ratas sometidas a una lesión medular y tratadas con DC se ha observado una mejor recuperación funcional y un menor estrés oxidativo medido mediante pruebas

de actividad superóxido dismutasa, mieloperoxidasa, catalasa, histonas deacetilasas o MDA<sup>234-237</sup>.

Aunque nuestros resultados pueden parecer contradictorios, quizás no lo sean tanto. Dado que un aumento leve o moderado del estrés oxidativo producido por una DC puede inducir la expresión de mecanismos antioxidantes a través de la activación de Nrf2, quizás el balance a largo plazo sea positivo<sup>238,239</sup>. En nuestro análisis del transcriptoma no vimos un aumento en la expresión de Nrf2, pero sí un aumento de ciertos miARN que estaban implicados en procesos antioxidantes, que quizás se incrementaron gracias a la elevación de las proteínas oxidadas como mecanismo compensatorio y, a largo plazo, protector frente a otras noxas que inducen estrés oxidativo como puede ser la propia epilepsia.

## 9. CONCLUSIONES

1. Las TDC son tratamientos eficaces contra la epilepsia refractaria infantil, tanto a corto como a largo plazo. Todos los tipos de TDC han confirmado su eficacia, aunque existe cierta tendencia a una mayor efectividad de las DCC.
2. Las TDC son más eficaces en los casos en los que la enfermedad subyacente que desencadena la epilepsia es una enfermedad metabólica o un trastorno genético.
3. Los lactantes responden bien a las TDC, especialmente aquellos con síndrome de West, por lo que en esta patología las TDC deberían plantearse de forma precoz, sin esperar a un deterioro cognitivo. La DCC 3:1 es de elección en los niños menores de 2 años, pudiéndose optar por la DAM en los lactantes más mayores para favorecer el cumplimiento.
4. Las TDC son el *gold estándar* de tratamiento en el SD-GLUT1, pero no es necesario esperar a la confirmación diagnóstica del mismo mediante el análisis de la mutación del gen SLC2A1. Los pacientes con síntomas sugestivos en los que no se confirma la mutación también se benefician del tratamiento. La DCC y la DAM no son distintas en cuestiones de eficacia, por lo que ambas constituyen una opción terapéutica válida para este síndrome.
5. Los efectos secundarios de las TDC son muy frecuentes, fáciles de controlar con modificaciones dietéticas o tratamientos farmacológicos y no suelen ser causa de retirada de la dieta. Los efectos adversos precoces más habituales son los problemas digestivos y la hipoglucemia asintomática. Los efectos secundarios a largo plazo que aparecen con mayor frecuencia son la dislipemia (que tiende a la normalización de forma espontánea con el paso del tiempo, especialmente

respecto a los niveles de colesterol) y la hipercalciuria (que puede aparecer desde las primeras semanas). El uso prolongado de la dieta no produce efectos adversos graves. Las fracturas óseas ocurren de forma excepcional, y aunque suelen ser tardías, en niños con factores de riesgo, tales como acidosis, deshidratación o hipercalciuria, pueden aparecer antes de los dos años de tratamiento.

6. Las TDC alteran algunos valores analíticos relacionados con el estado nutricional. Sin embargo, una evaluación predieta adecuada permite detectar deficiencias en vitaminas y micronutrientes que mejoran a lo largo del tratamiento con la suplementación pertinente. Esto ocurre, especialmente, con los niveles de selenio y vitamina D.
7. Las TDC afectan al crecimiento, especialmente en los niños de menor edad al inicio del tratamiento.
8. Las TDC producen cambios a nivel del transcriptoma, modificando la expresión génica de diferentes proteínas implicadas en la transmisión sináptica. La mayoría de los cambios observados tienden a producir una infraexpresión génica y afectan fundamentalmente a canales iónicos, receptores de neurotransmisores y proteínas estructurales de las sinapsis. Los resultados analíticos obtenidos son coherentes con el efecto clínico anticonvulsivo y neuroprotector de las TDC.
9. Las TDC producen cambios en el perfil metabolómico. Los metabolitos que más contribuyen a la presencia de un metaboloma claramente diferente tras las TDC son los cuerpos cetónicos (que se elevan) y la glucosa, algunos aminoácidos glucogénicos y el piruvato (que disminuyen).
10. Las TDC aumentan las proteínas oxidadas y no producen cambios significativos en los niveles de MDA.

## 10. ANEXOS

### 10.1 PRESENTACIÓN DE PÓSTERES EN REUNIONES CIENTÍFICAS

Se enviaron cuatro pósteres al *52nd Annual Meeting of the European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition* (5-8 de junio de 2019, Glasgow):

1. ***Ketogenic diet in patients with deficit of brain glucose transporter type 1: experience in 5 years.*** Elvira Cañedo Villarroya, Jana Ruiz Herrero, Paloma Ferrero Ortega, Irene Bacelo Ruano, María Ángeles Martínez Ibeas, Silvia Rodríguez Manchón, Marta Velasco Rodríguez-Belvis, Gloria Ortega Domínguez, Javier Viada Bris, Rosana Muñoz Codoceo, Natalia Sastre Sauce, Laura Palomino Pérez, Álvaro Martín Rivada, Lourdes Travieso Suárez, Ana Martínez Zazo, Alejandro Martínez Gálvez, Jose Luis Almodóvar Martínez, Consuelo Pedrón Giner.
2. ***Effectiveness and safety of the ketogenic diet as a treatment for refractory epilepsy and cerebral glucose transporter deficit.*** Elvira Cañedo Villarroya, Jana Ruiz Herrero, Paloma Ferrero Ortega, Irene Bacelo Ruano, María Ángeles Martínez Ibeas, Silvia Rodríguez Manchón, Marta Velasco Rodríguez-Belvis, Gloria Ortega Domínguez, Javier Viada Bris, Rosana Muñoz Codoceo, Natalia Sastre Sauce, Laura Palomino Pérez, Álvaro Martín Rivada, Lourdes Travieso Suárez, Ana Martínez Zazo, Alejandro Martínez Gálvez, Jose Luis Almodóvar Martínez, Consuelo Pedrón Giner.
3. ***Treatment with ketogenic diet in patients with mitochondrial disease and refractory epilepsy.*** Elvira Cañedo Villarroya, Jana Ruiz Herrero, Paloma Ferrero Ortega, Marta Velasco Rodríguez-Belvis, María Ángeles Martínez Ibeas, Irene

Bacelo Ruano, Silvia Rodríguez Manchón, Laura Palomino Pérez, Álvaro Martín Rivada, Gloria Ortega Domínguez, Javier Viada Bris, Rosana Muñoz Codoceo, Lourdes Travieso Suárez, Ana Martínez Zazo, Natalia Sastre Sauce, Jose Luis Almodóvar Martínez, Alejandro Martínez Gálvez, Consuelo Pedrón Giner.

4. ***Ketogenic diet during the first year of life. Experience in a tertiary reference hospital.*** Jana Ruiz Herrero, Elvira Cañedo Villarroya, Marta Velasco Rodríguez-Belvis, María Ángeles Martínez Ibeas, Silvia Rodríguez Manchón, Irene Bacelo Ruano, Paloma Ferrero Ortega, Natalia Sastre Sauce, Gloria Ortega Domínguez, Javier Viada Bris, Lourdes Travieso Suárez, Laura Palomino Pérez, Ana Martínez Zazo, Álvaro Martín Rivada, Rosana Muñoz Codoceo, Jose Luis Almodóvar Martínez, Alejandro Martínez Gálvez, Consuelo Pedrón Giner.

## 10.2 REDACCIÓN DE MATERIAL CIENTÍFICO

1. Participación en la redacción de un capítulo de libro sobre el tema: Pedrón Giner C, Ruiz Herrero J, Cañedo Villarroya E. **Dieta cetogénica.** En: Couce Pico ML, Aldámiz-Echevarría L, García Jiménez MC, González-Lamuño D, editores. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. 5ª ed. Madrid: Ergon;2022. p. 273-80. ISBN: 978-84-18576-47-8.
2. Participación en la redacción y revisión de un manual sobre el tema: Pedrón Giner C. **Manual para la práctica de la dieta cetogénica.** Segunda edición. Madrid. Nutricia; 2021. ISBN versión impresa: 978-84-09-36261-5. ISBN versión digital: 978-84-09-36505-0.

### **10.3 PARTICIPACIÓN EN CURSOS**

1. Participación como asistente en el **Segundo Curso de Dieta Cetogénica en Epilepsia Refractaria** celebrado el 26 de abril de 2019 en el Hospital Infantil Universitario Niño Jesús de Madrid. Número de expediente 07-AFOC-01056.7/2019. Acreditado con 0,9 créditos de formación continuada.
2. Participación como ponente en el mismo curso con la ponencia **De la teoría a la práctica. Experiencia del Hospital Niño Jesús en dieta cetogénica.**

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel J, Forsgren L, French JA, Glynn M, Hesdorffer DC, Lee BI, Mathern GW, Mosh SL, Perucca E, Scheffer IE, Tomson T, Watanabe M, Wieb S. A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. 2014;55(4):475-82.
2. Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, Brodie MJ, Hauser WA, Mathern G, Moshé SL, Perucca E, Wiebe S, French J. Definition of drug resistant epilepsy. Consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia* 2010; 51(6):1069-77.
3. Cancho Candela R, Andrés de Álvaro M. Síndromes epilépticos según la edad. *Pediatr Integral*. 2020; 24(7):375-82.
4. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, Hirsch E, Jain S, Mathern GW, Moshe SL, Nordli DR, Perucca E, Tomson T, Wiebe S, Zhang YH, Zuberi SM. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017; 58(4):512-21.
5. Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S, Patten SB, Kwon CS, Dykeman J, Pringsheim T, Lorenzetti DL, Jetté N. Prevalence and incidence of epilepsy: A systematic review and meta-analysis of international studies. *Neurology*. 2017;88(3):296-303.
6. Beghi E. The Epidemiology of Epilepsy. *Neuroepidemiology*. 2020;54:185-91.
7. García-Ramos R, García Pastor A, Masjuan J, Sánchez C, Gil A. FEEN: Informe sociosanitario FEEN sobre la epilepsia en España. *Neurología*. 2011;26(9):548-55.
8. Durá Travé T, Yoldi Petri ME, Gallinas Victoriano F. Incidencia de la epilepsia infantil. *An Pediatr (Barc)*. 2007;67(1):37-43.
9. Xue-Ping W, Hai-Jiao W, Li-Na Z, Xu D, Ling L. Risk factors for drug-resistant epilepsy: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(30):e16402.
10. López-González FJ, Villanueva V, Falip M, Toledo M, Campos D, Serralosa J. Manual de práctica clínica en epilepsia. Recomendaciones diagnóstico-terapéuticas de las SEN2019. Sociedad Española de Neurología 2019. Disponible en [epilepsiasen.net](http://epilepsiasen.net).
11. Berg AT, Levy SR, Testa FM, D'Souza R. Remission of epilepsy after two drug failures in children: a prospective study. *Ann Neurol*. 2009;65(5):510-9.
12. Schiller Y, Najjar Y. Quantifying the response to antiepileptic drugs: effect of past treatment history. *Neurology*. 2008;70(1):54-65.
13. Giménez C, Zafra F, Aragón C. Fisiopatología de los transportadores de glutamato y de glicina: nuevas dianas terapéuticas. *Rev Neurol* 2018; 67 (12): 491-504.
14. Andrade-Talavera Y, Duque-Feria P, Paulsen P, Rodríguez-Moreno A. Presynaptic Spike Timing-Dependent Long-Term Depression in the Mouse Hippocampus. *Cereb Cortex*. 2016; 26(8): 3637-54.
15. Bai X, Kirchoff F, Scheller A. Oligodendroglial GABAergic Signaling: More Than Inhibition! *Neurosci Bull* 2021; 37(7):1039-50.
16. García-Cazorla A, Cortés-Saladelafont E, Duarte S. Comunicación neuronal y metabolismo sináptico en epilepsia infantil. *Rev Neurol*. 2015;60:219-28.
17. Armijo JA, Valdizán EM, de las Cuevas I, Cuadrado A. Avances en la fisiopatología de la epileptogénesis: aspectos moleculares. *Rev Neurol*. 2002;34(5):409-29.
18. García-Peñas JJ, Jiménez-Legido M. Encefalopatías epilépticas del lactante: lo prioritario es el estudio genético. *Rev Neurol*. 2017;64(s03):S65-9.
19. Wang J, Lin ZJ, Liu L, Xu HQ, Shi YW, Yi YH, He N, Liao WP. Epilepsy-associated genes. *Seizure*. 2017;44:11-20.
20. Du W, Bautista JF, Yang H, Diez-Sampedro A, You SA, Wang L, Kotagal P, Lüders HO, Shi J, Cui J, Richerson GB, Wang QK. Calcium-sensitive potassium channelopathy in human epilepsy and paroxysmal movement disorder. *Nat Genet*. 2005;37:733-8.
21. Kim JE, Kak SE, Kang TC. Upregulated TWIK-related acid-sensitive K<sup>+</sup> channel-2 in neurons and perivascular astrocytes in the hippocampus of experimental temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 2009;50:654-63.
22. Neusch C, Weishaupt JH, Bähr M. Kir channels in the CNS: emerging new roles and implications for neurological diseases. *Cell Tissue Res*. 2003;311:131-8.
23. Young CC, Stegen M, Bernard R, Müller M, Bischofberger J, Veh RW, Haas CA, Wolfart J. Upregulation of inward rectifier K<sup>+</sup> (Kir2) channels in dentate gyrus granule cells in temporal lobe epilepsy: Kir2 upregulation in the epileptic hippocampus. *J Physiol*. 2009;587:4213-33.



24. Bozarth X, Dines JN, Cong Q, Mirzaa GM, Foss K, Lawrence Merritt J, Thies J, Mefford HC, Novotny E. Expanding clinical phenotype in CACNA1C related disorders: From neonatal onset severe epileptic encephalopathy to late-onset epilepsy. *Am J Med Genet.* 2018;176:2733-9.
25. Tang FR, Chia SC, Chen PM, Gao H, Lee WL, Yeo TS, Burgunder JM, Probst A, Sim MK, Ling EA. Metabotropic glutamate receptor 2/3 in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy, and of rats and mice after pilocarpine-induced status epilepticus. *Epilepsy Res.* 2004;59:167-80.
26. Benetó Pascual A, Santa Cruz A, Soler Algarra S, Cambra M, Salas Redondo A, Gómez Ciurana E, Rubio Sánchez P. La relación sueño-epilepsia. *Vigilia-Sueño* 2007;19(1):15-24.
27. Roundtree HM, Simeone TA, Johnson C, Matthews SA, Samson KK, Simeone KA. Orexin Receptor Antagonism Improves Sleep and Reduces Seizures in *Kcna1* -null Mice. *Sleep.* 2016;39:357-68.
28. Wang LM, Suthana NA, Chaudhury D, Weaver DR, Colwell CS. Melatonin inhibits hippocampal long-term potentiation. *Eur J Neurosci.* 2005;22:2231-7.
29. Rocha AKA, de Lima E, Amaral F, Peres R, Cipolla-Neto J, Amado D. Altered MT1 and MT2 melatonin receptors expression in the hippocampus of pilocarpine-induced epileptic rats. *Epilepsy Behav.* 2017;71:23-34.
30. Goldberg-Stern H, Oren H, Peled N, Garty BZ. Effect of melatonin on seizure frequency in intractable epilepsy: a pilot study. *J Child Neurol.* 2012;27(12):1524-8.
31. Rasmussen AH, Rasmussen HB, Silahatoglu A. The DLGAP family: neuronal expression, function, and role in brain disorders. *Mol Brain.* 2017;10(1):43.
32. McCammon JM, Blaker-Lee A, Chen X, Sive H. The 16p11.2 homologs *fam57ba* and *doc2a* generate certain brain and body phenotypes. *Hum Mol Genet.* 2017;26(19):3699-712.
33. Löscher W, Lehmann H, Teschendorf HJ, Traut M, Gross G. Inhibition of monoamine oxidase type A, but not type B, is an effective means of inducing anticonvulsant activity in the kindling model of epilepsy. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;288(3):984-92.
34. Liu J, Schenker M, Ghiasvand S, Berdichevsky Y. Kinase Inhibitors with Antiepileptic Properties Identified with a Novel in Vitro Screening Platform. *Int J Mol Sci.* 2019;20(10):2502.
35. Gajda Z, Török R, Horváth Z, Szántai-Kis C, Orfi L, Kéri G, Sente M. Protein kinase inhibitor as a potential candidate for epilepsy treatment. *Epilepsia.* 2011;52(3):579-88.
36. Verhoeven WM, Egger JI, Knegt AC, Zuydam J, Kleefstra T. Absence epilepsy and the CHD2 gene: an adolescent male with moderate intellectual disability, short-lasting psychoses, and an interstitial deletion in 15q26.1-q26.2. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2016;12:1135-9.
37. Singh K, Loreth D, Pöttker B, Hefti K, Innos J, Schwald K, Hengstler H, Menzel L, Sommer CJ, Radyushkin K, Kretz O, Philips MA, Haas CA, Frauenknecht K, Lilleväli K, Heimrich B, Vasar E, Schäfer MKE. Neuronal Growth and Behavioral Alterations in Mice Deficient for the Psychiatric Disease-Associated *Negr1* Gene. *Front Mol Neurosci.* 2018;11:30.
38. Zhu J, Lee KY, Jewett KA, Man HY, Chung HJ, Tsai NP. Epilepsy-associated gene *Nedd4-2* mediates neuronal activity and seizure susceptibility through AMPA receptors. *PLoS Genet.* 2017;13(2):e1006634.
39. Stogmann E, Reinthaler E, Eltawil S, El Etribi MA, Hemeda M, El Nahhas N, Gaber AM, Fouad A, Edris S, Benet-Pages A, Eck SH, Patariaia E, Mei D, Brice A, Lesage S, Guerrini R, Zimprich F, Strom TM, Zimprich A. Autosomal recessive cortical myoclonic tremor and epilepsy: association with a mutation in the potassium channel associated gene *CNTN2*. *Brain.* 2013;136(Pt 4):1155-60.
40. Lorigados L, Morales LM, Orozco-Suárez S, Gallardo JM, Díaz-Hung M, González ME, Estupiñán B, Pavón N, Rocha L. Oxidative stress in pharmacoresistant epilepsy. *Biotechnol. Appl.* 2016;33:2101-7.
41. Wheless JW. History of the ketogenic diet. *Epilepsia.* 2008;49(8):3-5.
42. Guelpa G, Marie A. La lutte contre l'épilepsie par la désintoxication et par la rééducation alimentaire. *Rev Ther Medico-Chirurgicales.* 1911; 78:8-13.
43. Geyelin HR. Fasting as a method for treating epilepsy. *Med Rec.* 1921;99:1037-9.
44. Woodyatt RT. Objects and method of diet adjustment in diabetics. *Arch Intern Med.* 1921;28:125-41.
45. Wilder RM. The effect on ketonemia on the course of epilepsy. *Mayo Clin Bull.* 1921;2:307-8.
46. Peterman MG. The ketogenic diet in epilepsy. *JAMA.* 1925;84(26):1979-83.
47. Huttenlocher PR, Wilbourn AJ, Signore JM. Medium-chain triglycerides as a therapy for intractable childhood epilepsy. *Neurology.* 1971;21:1097-103.
48. Schwartz RH, Eaton J, Bower BD, Aynsley-Green A. Ketogenic diets in the treatment of epilepsy: short term clinical effects. *Dev Med Child Neurol.* 1989;31:145-51.
49. Kossoff EH. International consensus statement on clinical implementation of the ketogenic diet: agreement, flexibility, and controversy. *Epilepsia.* 2008;49(8):1-3.

50. Huttenlocher PR, Wilbourn AJ, Signore JM. Medium-chain triglycerides as a therapy for intractable childhood epilepsy. *Neurology*. 1971;21:1097-103.
51. Kossoff EH, McGrogan JR, Bluml RM, Pillas DJ, Rubenstein JE, Vining EP. A modified Atkins diet is effective for the treatment of intractable pediatric epilepsy. *Epilepsia*. 2006;47:421-4.
52. Pfeifer HH, Thiele EA. Low-glycemic index treatment: A liberalized ketogenic diet for treatment of intractable epilepsy. *Neurology*. 2005;65:1810-2.
53. Pedrón Giner C, Arhip L, Cañedo Villarroya E, Cuerda Compés MC, Egea Castillo N, García Alcolea B, García Peñas JJ, González-Lamuño Leguina D, Gutiérrez Sánchez A, Martínez Costa C, Meneses D, Puerta Mcfarland LA, Ruiz Herrero J, Valverde Fernández J. Manual para la práctica de la dieta cetogénica. Segunda edición. Madrid. Nutricia; 2021. ISBN versión impresa: 978-84-09-36261-5. ISBN versión digital: 978-84-09-36505-0.
54. Masino A, Rho JM. Mechanisms of ketogenic diet action. Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, editores. *Jasper's basic mechanisms of the epilepsies*. Cuarta edición. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012. pp. 1483-516.
55. Azevedo de Lima P, de Brito Sampaio L, Teixeira Damasceno NR. Neurobiochemical mechanisms of a ketogenic diet in refractory epilepsy. *Clinics (Sao Paulo)*. 2014;69(10):699-705.
56. Vining EP, Freeman JM, Ballaban-Gil K, Camfield CS, Camfield PR, Holmes GL, Shinnar S, Shuman R, Trevathan E, Wheless JW. A multicenter study of the efficacy of the ketogenic diet. *Arch Neurol*. 1998;55:1433-7.
57. Freeman JM, Vining EP, Pillas DJ, Pyzik PL, Casey JC, Kelly LM. The efficacy of the ketogenic diet-1998: a prospective evaluation of intervention in 150 children. *Pediatrics*. 1998;102:1358-63.
58. Bough KJ, Rho JM. Anticonvulsant mechanisms of the ketogenic diet. *Epilepsia*. 2007;48(1):43-58.
59. Huttenlocher PR. Ketonemia and seizures: metabolic and anticonvulsant effects of two ketogenic diets in childhood epilepsy. *Pediatr Res*. 1976;10(5):536-40.
60. DeVivo DC, Leckie MP, Ferrendelli JS, McDougal DB Jr. Chronic ketosis and cerebral metabolism. *Ann Neurol*. 1978;3:331-7.
61. Bough KJ, Wetherington J, Hassel B, Pare JF, Gawryluk JW, Greene JG, Shaw R, Smith Y, Geiger JD, Dingledine RJ. Mitochondrial biogenesis in the anticonvulsant mechanism of the ketogenic diet. *Ann Neurol*. 2006;60(2):223-35.
62. Lefevre F, Aronson N. Ketogenic diet for the treatment of refractory epilepsy in children: A systematic review of efficacy. *Pediatrics*. 2000;105(4):E46.
63. Caraballo R, Vaccarezza M, Cersósimo R, Rios V, Soraru A, Arroyo H, Agosta G, Escobal N, Demartini M, Maxit C, Cresta A, Marchione D, Carniello M, Panico L. Long-term follow-up of the ketogenic diet for refractory epilepsy: multicenter Argentinean experience in 216 pediatric patients. *Seizure*. 2011;20(8):640-5.
64. Coppola G, Veggiotti P, Cusmai R, Bertoli S, Cardinali S, Dionisi-Vici C, Elia M, Lispi ML, Sarnelli C, Tagliabue A, Toraldo C, Pascotto A. The ketogenic diet in children, adolescents and young adults with refractory epilepsy: an Italian multicentric experience. *Epilepsy Res*. 2002;48(3):221-7.
65. Kang HC, Chung DE, Kim DW, Kim HD. Early and late-onset complications of the ketogenic diet for intractable epilepsy. *Epilepsia*. 2004;45(9):1116-23.
66. Keene DL. A systematic review of the use of the ketogenic diet in childhood epilepsy. *Pediatr Neurol*. 2006;35(1):1-5.
67. Henderson CB, Filloux FM, Alder SC, Lyon JL, Caplin DA. Efficacy of the ketogenic diet as a treatment option for epilepsy: meta-analysis. *J Child Neurol*. 2006;21(3):193-8.
68. Neal EG, Chaffe H, Schwartz RH, Lawson MS, Edwards N, Fitzsimmons G, Whitney A, Cross JH. The ketogenic diet for the treatment of childhood epilepsy: a randomised controlled trial. *Lancet Neurol*. 2008;7(6):500-6.
69. Neal EG, Chaffe H, Schwartz RH, Lawson MS, Edwards N, Fitzsimmons G, Whitney A, Cross JH. A randomized trial of classical and medium-chain triglyceride ketogenic diets in the treatment of childhood epilepsy. *Epilepsia*. 2009;50(5):1109-17.
70. Kossoff EH, Krauss GL, McGrogan JR, Freeman JM. Efficacy of the Atkins diet as therapy for intractable epilepsy. *Neurology*. 2003;61:1789-91.
71. Porta N, Vallée L, Boutry E, Fontaine M, Dessein AF, Joriot S, Cuisset JM, Cuvellier JC, Auvin S. Comparison of seizure reduction and serum fatty acid levels after receiving the ketogenic and modified Atkins diet. *Seizure*. 2009;18(5):359-64.
72. Weber S, Mølgaard C, Karentaudorf, Uldall P. Modified Atkins diet to children and adolescents with medical intractable epilepsy. *Seizure*. 2009;18(4):237-40.

73. Miranda MJ, Mortensen M, Povlsen JH, Nielsen H, Beniczky S. Danish study of a modified Atkins diet for medically intractable epilepsy in children: can we achieve the same results as with the classical ketogenic diet? *Seizure*. 2011;20(2):151-5.
74. Vacarezza MM, Toma MV, Ramos Guevara JD, Díez CG, Agosta GE. Treatment of refractory epilepsy with the modified Atkins diet. *Arch Argent Pediatr*. 2014;112(4):348-52.
75. Kim JA, Yoon JR, Lee EJ, Lee JS, Kim JT, Kim HD, Kang HC. Efficacy of the classic ketogenic and the modified Atkins diets in refractory childhood epilepsy. *Epilepsia*. 2016;57(1):51-8.
76. Sharma S, Sankhyan N, Gulati S, Agarwala A. Use of the modified Atkins diet for treatment of refractory childhood epilepsy: a randomized controlled trial. *Epilepsia*. 2013;54(3):481-6.
77. Muzykewicz DA, Lyczkowski DA, Memon N, Conant KD, Pfeifer HH, Thiele EA. Efficacy, safety, and tolerability of the low glycemic index treatment in pediatric epilepsy. *Epilepsia*. 2009;50(5):1118-26.
78. Karimzadeh P, Sedighi M, Beheshti M, Azargashb E, Ghofrani M, Abdollahe-Gorgi F. Low Glycemic Index Treatment in pediatric refractory epilepsy: the first Middle East report. *Seizure*. 2014;23(7):570-2.
79. Kim SH, Kang HC, Lee EJ, Lee JS, Kim HD. Low glycemic index treatment in patients with drug-resistant epilepsy. *Brain Dev*. 2017;39(8):687-92.
80. Sondhi V, Agarwala A, Pandey RM, Chakrabarty B, Jauhari P, Lodha R, Toteja GS, Sharma S, Paul VK, Kossoff E, Gulati S. Efficacy of Ketogenic Diet, Modified Atkins Diet, and Low Glycemic Index Therapy Diet Among Children With Drug-Resistant Epilepsy: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Pediatr*. 2020;174(10):944-51.
81. Klepper J, Akman C, Armeno M, Auvin S, Cervenka M, Cross HJ, De Giorgis V, Della Marina A, Engelstad K, Heussinger N, Kossoff EH, Leen WG, Leiendecker B, Monani UR, Oguni H, Neal E, Pascual JM, Pearson TS, Pons R, Scheffer IE, Veggiotti P, Willemsen M, Zuberi SM, de Vivo DC. Glut1 Deficiency Syndrome (Glut1DS): State of the art in 2020 and recommendations of the international Glut1DS study group. *Epilepsia Open*. 2020;5:354-65.
82. De Giorgis V, Veggiotti P. GLUT1 deficiency syndrome 2013: Current state of the art. *Seizure*. 2013;22:803-11.
83. Klepper KJ. GLUT1 deficiency syndrome in clinical practice. *Epilepsy Res*. 2012;100:272-7.
84. Schwantje M, Verhagen LM, van Hasselt PM, Fuchs SA. Glucose transporter type 1 deficiency syndrome and the ketogenic diet. *J Inher Metab Dis*. 2020;43:216-22.
85. Tang M, Park SH, De Vivo DC, Monani UR. Therapeutic strategies for glucose transporter 1 deficiency syndrome. *Ann Clin Transl Neurol*. 2019;6:1923-32.
86. Leen WG, Klepper J, Verbeek MM, Lefterink M, Hofste T, Van Engelen BG, Wevers RA, Arthur T, Bahi-Buisson N, Ballhausen D, Bekhof J, van Bogaert P, Carrilho I, Chabrol B, Champion MP, Coldwell J, Clayton P, Donner E, Evangelidou A, Ebinger F, Farrell K, Forsyth RJ, de Goede C, Gross S, Grunewald S, Holthausen H, Sandeep Jayawant, Katherine Lachlan, Vincent Laugel, Kathy Leppig, Ming J. Lim, Grazia Mancini, Della Marina A, Martorell L, McMenamin J, Meuwissen MEC, Mundy H, Nilsson NO, Panzer A, Poll-The BT, Rauscher C, Rouselle CMR, Sandvig I, Scheffner T, Sheridan E, Simpson N, Sykora P, Tomlinson R, Trounce J, Webb D, Weschke B, Scheffer H, Willemsen MA. Glucose transporter-1 deficiency syndrome: The expanding clinical and genetic spectrum of a treatable disorder. *Brain*. 2010;133:655-70.
87. Pong AW, Geary BR, Engelstad KM, Natarajan A, Yang H, De Vivo DC. Glucose transporter type I deficiency syndrome: Epilepsy phenotypes and outcomes. *Epilepsia*. 2012;53:1503-10.
88. Kass HR, Winesett SP, Bessone SK, Turner Z, Kossoff EH. Use of dietary therapies amongst patients with GLUT1 deficiency syndrome. *Seizure*. 2016;35:83-7.
89. Leen WG, Mewasingh L, Verbeek MM, Kamsteeg EJ, van de Warrenburg BP, Willemsen MA. Movement disorders in GLUT1 deficiency syndrome respond to the modified Atkins diet. *Mov Disord*. 2013;28:1439-42.
90. Ohshiro-Sasaki A, Shimbo H, Takan K, Wada T, Osaka H. A three-year-old boy with glucose transporter type 1 deficiency syndrome presenting with episodic ataxia. *Pediatric Neurol*. 2014;50:99-100.
91. Haberlandt E, Karall D, Jud V, Baumgartner SS, Zotter S, Rostasy K, Bauman M, Scholl-Buergi S. Glucose transporter type 1 deficiency syndrome effectively treated with modified Atkins diet. *Neuropediatrics*. 2014;45:117-9.
92. Ito S, Oguni H, Ito Y, Ishigaki K, Ohinata J, Osawa M. Modified Atkins diet therapy for a case with glucose transporter type 1 deficiency syndrome. *Brain Dev*. 2008;30:226-8.

93. Amalou S, Gras D, Ilea A, Greneche MO, Francois L, Bellavoine V, Delanoe C, Auvin S. Use of modified Atkins diet in glucose transporter type 1 deficiency syndrome. *Dev Med Child Neurol.* 2016;58:1193-9.
94. Fujii T, Ito Y, Takahashi S, Shimono K, Natsume J, Yanagihara K, Oguni H. Outcome of ketogenic diets in GLUT1 deficiency syndrome in Japan: A nationwide survey. *Brain Dev.* 2016;38:628-37.
95. Kossoff EH, Zupec-Kania BA, Auvin S, Ballaban-Gil KR, Bergqvist AC, Blackford R, Buchhalter JR, Caraballo RH, Cross JH, Dahlin MG, Donner EJ, Guzel O, Jehle RS, Klepper J, Kang HC, Lambrechts DA, Liu YMC, Nathan JK, Nordli DR Jr, Pfeifer HH, Rho JM, Scheffer IE, Sharma S, Stafstrom CE, Thiele EA, Turner Z, Vaccarezza MM, van der Louw EJTM, Veggiotti P, Wheless JW, Wirrell EC; Charlie Foundation; Matthew's Friends; Practice Committee of the Child Neurology Society. Optimal clinical management of children receiving dietary therapies for epilepsy: Updated recommendations of the International Ketogenic Diet Study Group. *Epilepsia Open.* 2018;3:175-92.
96. Sofou K, Dahlin M, Hallböök T, Lindfeldt M, Viggedal G, Darin N. Ketogenic diet in pyruvate dehydrogenase complex deficiency: short- and long-term outcomes. *J Inher Metab Dis.* 2017;40(2):237-45.
97. Boronat S, Sábado C, Vendrell T. Complejo esclerosis tuberosa CET. Grupo de trabajo sobre cáncer en síndromes genéticos polimalformativos (GT-CSGP). 2015. Disponible en <https://www.ciberer.es/media/445781/gt-csgp-cet.pdf>.
98. Kossoff EH, Thiele EA, Pfeifer HH, McGrogan JR, Freeman JM. Tuberous sclerosis complex and the ketogenic diet. *Epilepsia.* 2005;46:1684-6.
99. Coppola G, Klepper J, Ammendola E, Fiorillo M, della Corte R, Capano G, Pascotto A. The effects of the ketogenic diet in refractory partial seizures with reference to tuberous sclerosis. *Eur J Paediatr Neurol.* 2006;10:148-51.
100. Hong AM, Turner Z, Hamdy RF, Kossoff EH. Infantile spasms treated with the ketogenic diet: prospective single-center experience in 104 consecutive infants. *Epilepsia.* 2010;51(8):1403-7.
101. Kossoff EH, Hedderick EF, Turner Z, Freeman JM. A case-control evaluation of the ketogenic diet versus ACTH for new-onset infantile spasms. *Epilepsia.* 2008;49(9):1504-9.
102. Grocott OR, Herrington KS, Pfeifer HH, Thiele EA, Thibert RL. Low glycemic index treatment for seizure control in Angelman syndrome: A case series from the Center for Dietary Therapy of Epilepsy at the Massachusetts General Hospital. *Epilepsy Behav.* 2017;68:45-50.
103. Evangelidou A, Doulioglou V, Haidopoulou K, Aptouramani M, Spilioti M, Varlamis G. Ketogenic diet in a patient with Angelman syndrome. *Pediatr Int.* 2010;52:831-4.
104. Dressler A, Trimmel-Schwahofer P, Reithofer E, Mühlebner A, Gröppel G, Reiter-Fink E, Benninger F, Grassl R, Feucht M. Efficacy and tolerability of the ketogenic diet in Dravet syndrome-Comparison with various standard antiepileptic drug regimen. *Epilepsy Res.* 2015;109:81-9.
105. Caraballo RH, Cersosimo RO, Sakr D, Sakr D, Cresta A, Escobal N, Fejerman N. Ketogenic diet in patients with Dravet syndrome. *Epilepsia.* 2005;46:1539-44.
106. Kilaru S, Bergqvist AG. Current treatment of myoclonic astatic epilepsy: clinical experience at the children's hospital of Philadelphia. *Epilepsia.* 2007;48:1703-7.
107. Simard-Tremblay E, Berry P, Owens A, Cook WB, Sittner HR, Mazzanti M, Huber J, Warner M, Shurtleff H, Saneto RP. High-fat diets and seizure control in myoclonic-astatic epilepsy: a single center's experience. *Seizure.* 2015;25:184-6.
108. Nabbout R, Mazzuca M, Hubert P, Peudennier S, Allaire C, Flurin V, Aberastury M, Silva W, Dulac O. Efficacy of ketogenic diet in severe refractory status epilepticus initiating fever induced refractory epileptic encephalopathy in school age children (FIRES). *Epilepsia.* 2010;51:2033-7.
109. Kang HC, Lee YM, Kim HD, Lee JS, Slama A. Safe and effective use of the ketogenic diet in children with epilepsy and mitochondrial respiratory chain complex defects. *Epilepsia.* 2007;48(1):82-8.
110. Nordli DR, Kuroda MM, Carroll J, Koenigsberger DY, Hirsch LJ, Bruner HJ, Seidel WT, De Vivo DC. Experience with the ketogenic diet in infants. *Pediatrics.* 2001;108(1):129-33.
111. Eun SH, Kang HC, Kim DW, Kim HD. Ketogenic diet for treatment of infantile spasms. *Brain Dev.* 2006;28(9):566-71. *Brain Dev.* 2006;28(9):566-71.
112. Pires ME, Ilea A, Bourel E, Bellavoine V, Merdarius D, Berquin P, Auvin S. Ketogenic diet for infantile spasms refractory to first-line treatments: an open prospective study. *Epilepsy Res.* 2013;105(1-2):189-94.
113. Kayyali HR, Gustafson M, Myers T, Thompson L, Williams M, Abdelmoity A. Ketogenic diet efficacy in the treatment of intractable epileptic spasms. *Pediatr Neurol.* 2014;50(3):224-7.
114. Wirrell E, Wong-Kisiel L, Mandrekar J, Nickels KC. Predictors and course of medically intractable epilepsy in young children presenting before 36 months of age: a retrospective, population-based study. *Epilepsia.* 2012;53(9):1563-9.

115. Kim SH, Shaw A, Blackford R, Lowman W, Laux LC, Millichap JJ, Nordli DR Jr. The ketogenic diet in children 3 years of age or younger: a 10-year single-center experience. *Sci Rep.* 2019;9(1):8736.
116. Hosain SA, La Vega-Talbott M, Solomon GE. Ketogenic diet in pediatric epilepsy patients with gastrostomy feeding. *Pediatr Neurol.* 2005;32(2):81-3.
117. Kossoff EH, McGrogan JR, Freeman JM. Benefits of an all-liquid ketogenic diet. *Epilepsia.* 2004;45(9):1163.
118. Van der Louw E, van den Hurk D, Neal E, Leiendecker B, Fitzsimmon G, Dority L, Thompson L, Marchió M, Dudzińska M, Dressler A, Klepper J, Auvin S, Cross JH. Ketogenic diet guidelines for infants with refractory epilepsy. *Eur J Paediatr Neurol.* 2016;20(6):798-809.
119. Ballaban-Gil K, Callahan C, O'Dell C, Pappo M, Moshé S, Shinnar S. Complications of the ketogenic diet. *Epilepsia.* 1998;39(7):744-8.
120. Lin A, Turner Z, Doerr SC, Stanfield A, Kossoff EH. Complications during ketogenic diet initiation: prevalence, treatment, and influence on seizure outcomes. *Pediatr Neurol.* 2017;68:35-9.
121. Wang J, Jiang L, Cheng M. A girl with protein-losing enteropathy during a ketogenic diet: a case report. *BMC Pediatr.* 2020;20(1):102.
122. Ahn WK, Park S, Kim HD. Protein-Losing Enteropathy as a Complication of the Ketogenic Diet. *Yonsei Med J.* 2017;58(4):891-3.
123. Armeno M, Araujo C, Sotomontesano B, Caraballo RH. Actualización sobre los efectos adversos durante la terapia con dieta cetogénica en la epilepsia refractaria pediátrica. *Rev Neurol.* 2018;66(6):193-200.
124. Bergqvist AG, Schall JI, Gallagher PR, Cnaan A, Stallings VA. Fasting versus gradual initiation of the ketogenic diet: a prospective, randomized clinical trial of efficacy. *Epilepsia.* 2005;46(11):1810-9.
125. Takeoka M, Riviello JJ Jr, Pfeifer H, Thiele EA. Concomitant treatment with topiramate and ketogenic diet in pediatric epilepsy. *Epilepsia.* 2002;43(9):1072-5.
126. Bjurulf B, Magnus P, Hallböök T, Strømme P. Potassium citrate and metabolic acidosis in children with epilepsy on the ketogenic diet: a prospective controlled study. *Dev Med Child Neurol.* 2020;62(1):57-61.
127. Kossoff EH, Pyzik PL, Furth SL, Hladky HD, Freeman JM, Vining EP. Kidney stones, carbonic anhydrase inhibitors, and the ketogenic diet. *Epilepsia.* 2002;43:1168-71.
128. Sampath A, Kossoff EH, Furth SL, Pyzik PL, Vining EP. Kidney stones and the ketogenic diet: risk factors and prevention. *J Child Neurol.* 2007;22:375-8.
129. Paul E, Conant KD, Dunne IE, Pfeifer HH, Lyczkowski DA, Linshaw MA, Thiele EA. Urolithiasis on the ketogenic diet with concurrent topiramate or zonisamide therapy. *Epilepsy Res.* 2010;90(1-2):151-6.
130. Furth SL, Casey JC, Pyzik PL, Neu AM, Docimo SG, Vining EP, Freeman JM, Fivush BA. Risk factors for urolithiasis in children on the ketogenic diet. *Pediatr Nephrol.* 2000;15(1-2):125-8.
131. Groesbeck DK, Bluml RM, Kossoff EH. Long-term use of the ketogenic diet in the treatment of epilepsy. *Dev Med Child Neurol.* 2006;48(12):978-81.
132. Holliday MA, Segar WE. Maintenance need for water in parenteral fluid therapy. *Pediatrics.* 1957;19(5):823-32.
133. Institute of Medicine 2006. Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements. Washington, DC: The National Academies Press. Disponible en [https://www.nal.usda.gov/sites/default/files/fnic\\_uploads/DRIEssentialGuideNutReq.pdf](https://www.nal.usda.gov/sites/default/files/fnic_uploads/DRIEssentialGuideNutReq.pdf).
134. McNally MA, Pyzik PL, Rubenstein JE, Hamdy RF, Kossoff EH. Empiric use of oral potassium citrate reduces symptomatic kidney stone incidence with the ketogenic diet. *Pediatrics.* 2009;124:e300-4.
135. Kwiterovich PO, Vining EP, Pyzik P, Skolasky R, Freeman JM. Effect of a high-fat ketogenic diet on plasma levels of lipids, lipoproteins, and apolipoproteins in children. *JAMA.* 2003;290:912-20.
136. Heussinger N, Della Marina A, Beyerlein A, Leiendecker B, Hermann-Alves S, Dalla Pozza R, Klepper J. 10 patients, 10 years - Long term follow-up of cardiovascular risk factors in Glut1 deficiency treated with ketogenic diet therapies: A prospective, multicenter case series. *Clin Nutr.* 2018;37(6 Pt A):2246-51.
137. Coppola G, Natale F, Torino A, Capasso R, D'Aniello A, Pironti E, Santoro E, Calabrò R, Verrotti A. The impact of the ketogenic diet on arterial morphology and endothelial function in children and young adults with epilepsy: a case-control study. *Seizure.* 2014;23(4):260-5.
138. Dahlin M, Hjelte L, Nilsson S, Amark P. Plasma phospholipid fatty acids are influenced by a ketogenic diet enriched with n-3 fatty acids in children with epilepsy. *Epilepsy Res.* 2007;73(2):199-207.
139. Spulber G, Spulber S, Hagenäs L, Amark P, Dahlin M. Growth dependence on insulin-like growth factor-1 during the ketogenic diet. *Epilepsia.* 2009;50(2):297-303.

140. Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation on Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition (2002: Geneva, Switzerland). Protein and Amino acid Requirements in Human Nutrition: Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. WHO technical report series; no.935; WHO Press: Geneva, The Switzerland, 2007. Disponible en: [https://www.who.int/nutrition/publications/nutrientrequirements/WHO\\_TRS\\_935/en/](https://www.who.int/nutrition/publications/nutrientrequirements/WHO_TRS_935/en/)
141. Couch SC, Schwarzman F, Carroll J, Koenigsberger D, Nordli DR, Deckelbaum RJ, DeFelice AR. Growth and nutritional outcomes of children treated with the ketogenic diet. *J Am Diet Assoc.* 1999;99(12):1573-5.
142. Vining EP, Pyzik P, McGrogan J, Hladky H, Anand A, Krieglner S, Freeman JM. Growth of children on the ketogenic diet. *Dev Med Child Neurol.* 2002;44(12):796-802.
143. Williams S, Basualdo-Hammond C, Curtis R, Schuller R. Growth retardation in children with epilepsy on the ketogenic diet: a retrospective chart review. *J Am Diet Assoc.* 2002;102(3):405-7.
144. Liu YM, 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(6):707-12.
145. Peterson SJ, Tangney CC, Pimentel-Zablah EM, Hjelmgren B, Booth G, Berry-Kravis E. Changes in growth and seizure reduction in children on the ketogenic diet as a treatment for intractable epilepsy. *J Am Diet Assoc.* 2005;105(5):718-25.
146. Groleau V, Schall JI, Stallings VA, Bergqvist CA. Long-term impact of the ketogenic diet on growth and resting energy expenditure in children with intractable epilepsy. *Dev Med Child Neurol.* 2014;56:898-904.
147. Kim JT, Kang HC, Song JE, Lee MJ, Lee YJ, Lee EJ, Kim HD. Catch-up growth after long-term implementation and weaning from ketogenic diet in pediatric epileptic patients. *Clin Nutr.* 2013;32:98-103.
148. Ferraris C, Guglielmetti M, Pasca L, De Giorgis V, Ferraro OE, Brambilla I, Leone A, De Amicis R, Bertoli S, Veggiotti P, Tagliabue A. Impact of the Ketogenic Diet on Linear Growth in Children: A Single-Center retrospective Analysis of 34 Cases. *Nutrients.* 2019;11(7):1442.
149. Armeno M, Verini A, Del Pino M, Araujo MB, Mestre G, Reyes G, Caraballo RH. A Prospective Study on Changes in Nutritional Status and Growth Following Two Years of Ketogenic Diet (KD) Therapy in Children with Refractory Epilepsy. *Nutrients.* 2019;11(7):1596.
150. Dressler A, Stöcklin B, Reithofer E, Benninger F, Freilinger M, Hauser E, Reiter-Fink E, Seidl R, Trimmel-Schwahofer P, Feucht M. Long-term outcome and tolerability of the ketogenic diet in drug-resistant childhood epilepsy--the Austrian experience. *Seizure.* 2010;19(7):404-8.
151. Lambrechts DA, de Kinderen RJ, Vles HS, de Louw AJ, Aldenkamp AP, Majoie MJ. The MCT-ketogenic diet as a treatment option in refractory childhood epilepsy: A prospective study with 2-year follow-up. *Epilepsy Behav.* 2015;51:261-6.
152. Svedlund A, Hallböök T, Magnusson P, Dahlgren J, Swolin-Eide D. Prospective study of growth and bone mass in Swedish children treated with the modified Atkins diet. *Eur J Paediatr Neurol.* 2019;23(4):629-38.
153. Wibisono C, Rowe N, Beavis E, Kepreotes H, Mackie FE, Lawson JA, Cardamone M.J. Ten-year single-center experience of the ketogenic diet: factors influencing efficacy, tolerability, and compliance. *J Pediatr.* 2015;166(4):1030-6.
154. Bergqvist AG, Schall JI, Stallings VA. Vitamin D status in children with intractable epilepsy, and impact of the ketogenic diet. *Epilepsia.* 2007;48(1):66-71.
155. Bergqvist AG, Schall JI, Stallings VA, Zemel BS. Progressive bone mineral content loss in children with intractable epilepsy treated with the ketogenic diet. *Am J Clin Nutr.* 2008;88(6):1678-84.
156. Berry-Kravis E, Booth G, Sanchez AC, Woodbury-Kolb J. Carnitine levels and the ketogenic diet. *Epilepsia.* 2001;42:1445-51.
157. Coppola G, Epifanio G, Auricchio G, Romualdo Federico R, Resicato G, Pascotto A. Plasma free carnitine in epilepsy children, adolescents and young adults treated with old and new antiepileptic drugs with or without ketogenic diet. *Brain Dev.* 2006;28:358-65.
158. Fukuda M, Kawabe M, Takehara M, Iwano S, Kuwabara K, Kikuchi C, Wakamoto H, Morimoto T, Suzuki Y, Ishii E. Carnitine deficiency: Risk factors and incidence in children with epilepsy. *Brain Dev.* 2015;37:790-6.
159. Neal EG, Zupc-Kania B, Pfeifer HH. Carnitine, nutritional supplementation and discontinuation of ketogenic diet therapies. *Epilepsy Research.* 2012;100:267-71.
160. Christodoulides SS, Neal EG, Fitzsimmons G, Chaffé HM, Jeanes YM, Aitkenhead H, Cross JH. The effect of the classical and medium chain triglyceride ketogenic diet on vitamin and mineral levels. *J Hum Nutr Diet.* 2012;25:16-26.

161. Arslan N, Kose E, Guzel O. The Effect of Ketogenic Diet on Serum Selenium Levels in Patients with Intractable Epilepsy. *Biol Trace Elem Res.* 2017;178:1-6.
162. Bergqvist AG, Chee CM, Lutchka L, Rychik J, Stallings VA. Selenium deficiency with cardiomyopathy: a complication of the ketogenic diet. *Epilepsia.* 2003;44:618-20.
163. Sirikonda NS, Patten WD, Phillips JR, Mullett CJ. Ketogenic diet: rapid onset of selenium deficiency-induced cardiac decompensation. *Pediatr Cardiol.* 2012;33:834-8.
164. Bank IM, Shemie SD, Rosenblatt B, Bernard C, Mackie AS. Sudden cardiac death in association with the ketogenic diet. *Pediatr Neurol.* 2008;39:429-31.
165. Zupac-Kania B, Zupanc ML. Long-term management of the ketogenic diet: Seizure monitoring, nutrition, and supplementation. *Epilepsia.* 2008;49(Suppl. 8):23-6.
166. Lowe R, Shirley N, Bleackley M, Dolan S, Shafee T. Transcriptomics technologies. *PLoS Comput Biol.* 13(5): e1005457.
167. Gironella Cos M. Nuevos métodos de diagnóstico molecular. *Transcriptómica (mARN y miR).* GH continuada 2010;9(4):160-4.
168. Nicholson JK, Lindon JC. Systems biology: Metabonomics. *Nature.* 2008;455(7216):1054-6.
169. Ala-Korpela M. Potential role of body fluid 1H NMR metabonomics as a prognostic and diagnostic tool. *Expert Rev Mol Diagn.* 2007;7(6):761-73.
170. Guideline: assessing and managing children at primary health-care facilities to prevent overweight and obesity in the context of the double burden of malnutrition. Updates for the Integrated Management of Childhood Illness (IMCI). Geneva: World Health Organization; 2017.
171. Jones RE, Jewell J, Saksena R, Ramos Salas X, Breda J. Overweight and Obesity in Children under 5 Years: Surveillance Opportunities and Challenges for the WHO European Region. *Front Public Health.* 2017;5:58.
172. Hopkins IJ, Lynch BC. Use of ketogenic diet in epilepsy in childhood. *Aust Paediatr J.* 1970;6:25-9.
173. Janaki S, Rashid MK, Gulati MS, Jayaram SR, Baruah JK, Saxena VK. A clinical, electroencephalographic correlation of seizures on a ketogenic diet. *Indian J Med Res.* 1976;64:1057-63.
174. Kinsman SL, Vining IPG, Quaskey SA, Mellits D, Freeman JM. Efficacy of the ketogenic diet for intractable seizure disorders: review of 58 cases. *Epilepsia.* 1992;33:1132-6.
175. Berman W. Medium chain triglyceride diet in the treatment of intractable childhood epilepsy. *Dev Med Child Neurol.* 1978;20:249-52.
176. Trauner DA. Medium chain triglyceride (MCT) diet in intractable seizure disorders. *Neurology.* 1985;35:237-8.
177. Sills MA, Forsythe WI, Haidukewych D, MacDonald A, Robinson M. The medium chain triglyceride diet and intractable epilepsy. *Arch Dis Child.* 1986;61:1168-72.
178. DiMario FJ, Holland J. The Ketogenic diet: A review of the experience at the Connecticut Children's Medical Center. *Pediatr Neurol.* 2002;26:288-92.
179. Maydell BV, Wyllie E, Akhtar N, Kotagal P, Powaski K, Cook K, Weinstock A, Rothner AD. Efficacy of the ketogenic diet in focal versus generalized seizures. *Pediatr Neurol.* 2001;25:208-12.
180. Kang H, Kim Y, Kim D, Kim H. Efficacy and safety of the ketogenic diet for intractable childhood epilepsy: Korean Multicentric Experience. *Epilepsia.* 2005;46:272-9.
181. Araya-Quintanilla F, Celis-Rosati A, Rodríguez-Leiva C, Silva-Navarro C, Silva-Pinto Y, Toro-Jeria B. Efectividad de la dieta cetogénica en niños con epilepsia refractaria: revisión sistemática. *Rev Neurol.* 2016;62:439-48.
182. Kang H, Lee H, You SJ, Kang DC, Ko T, KIM HD. Use of a Modified Atkins Diet in Intractable Childhood Epilepsy. *Epilepsia.* 2007;48(1):182-6.
183. Rezaei S, Abdurahman AA, Saghadzadeh A, Badv RS, Mahmoudi M. Short-term and long-term efficacy of classical ketogenic diet and modified Atkins diet in children and adolescents with epilepsy: A systematic review and meta-analysis. *Nutr Neurosci.* 2019;22:317-34.
184. De Vivo DC, Trifiletti RR, Jacobson RI, Ronen GM, Behmand RA, Harik SI. Defective glucose transport across the blood-brain barrier as a cause of persistent hypoglycorrhachia, seizures, and developmental delay. *N Engl J Med.* 1991;325:703-9.
185. Seidner G, Alvarez MG, Yeh JI, O'Driscoll KR, Klepper J, Stump TS, Wang D, Spinner NB, Birnbaum MJ, De Vivo DC. GLUT-1 deficiency syndrome caused by haploinsufficiency of the blood-brain barrier hexose carrier. *Nat Genet.* 1998;18:188-91.
186. Klepper, J. Absence of SLC2A1 mutations does not exclude glut1 deficiency syndrome. *Neuropediatrics.* 2013;44:235-6.
187. Leary LD, Wang D, Nordli DR, Engelstad K, De Vivo DC. Seizure characterization and electroencephalographic features in Glut-1 deficiency syndrome. *Epilepsia.* 2003;44:701-7.

188. Wang D, Pascual JM, Yang H, Engelstad K, Jhung S, Sun RP, De Vivo DC. Glut-1 deficiency syndrome: Clinical, genetic, and therapeutic aspects. *Ann Neurol.* 2004;57:111-8.
189. Ramm-Petersen A, O'Nakken K, Skogseid IM, Randby H, Skei EB, Bindoff AL, Selmer KK. Good outcome in patients with early dietary treatment of GLUT-1 deficiency syndrome: Results from a retrospective Norwegian study. *Dev Med Child Neurol.* 2013;55:440-7.
190. Schwantje M, Verhagen LM, van Hasselt PM, Fuchs SA. Glucose transporter type 1 deficiency syndrome and the ketogenic diet. *J Inher Metab Dis.* 2020;43:216-22.
191. Dressler A, Trimmel-Schwahofer P, Reithofer E, Gröppel G, Mühlebner A, Samueli S, Grabner V, Abraham K, Benninger F, Feucht M. The ketogenic diet in infants - Advantages of early use. *Epilepsy Res.* 2015;116:53-8.
192. Prezioso G, Carlone G, Zaccara G, Verrotti A. Efficacy of ketogenic diet for infantile spasms: A systematic review. *Acta Neurol Scand.* 2018;137:4-11.
193. Hirano Y, Oguni H, Shiota M, Nishikawa A, Osawa M. Ketogenic diet therapy can improve ACTH-resistant West syndrome in Japan. *Brain Dev.* 2015;35:18-22.
194. Hussain SA, Shin JH, Shih EJ, Murata KK, Sewak S, Kezele ME, Sankar R, Matsumoto JH. Limited efficacy of the ketogenic diet in the treatment of highly refractory epileptic spasms. *Seizure.* 2016;35:59-64.
195. Kang HC, Lee YJ, Lee JS, Lee EJ, Eom S, You SJ, Kim HD. Comparison of short- versus long-term ketogenic diet for intractable infantile spasms. *Epilepsia.* 2011;52(4):781-7.
196. Falsaperla R, D'Angelo G, Praticò AD, Mauceri L, Barbagallo M, Pavone P, Catanzaro S, Gitto E, Corsello G, Ruggieri M. Ketogenic diet for infants with epilepsy: A literature review. *Epilepsy Behav.* 2020;112:107361.
197. Lyons L, Schoeler NE, Langan D, Cross JH. Use of ketogenic diet therapy in infants with epilepsy: A systematic review and meta-analysis. *Epilepsia.* 2020;61:1261-81.
198. Hemingway C, Freeman JM, Pillas DJ, Pyzik PL. The ketogenic diet: A 3- to 6-year follow-up of 150 children enrolled prospectively. *Pediatrics.* 2001;108:898-905.
199. Martinez CC, Pyzik PL, Kossoff EH. Discontinuing the ketogenic diet in seizure-free children: recurrence and risk factors. *Epilepsia.* 2007;48:187-90.
200. Cai QY, Zhou ZJ, Luo R, Gan J, Li SP, Mu DZ, Wan CM. Safety and tolerability of the ketogenic diet used for the treatment of refractory childhood epilepsy: A systematic review of published prospective studies. *World J. Pediatrics.* 2017;13:528-36.
201. Stevens CE, Turner Z, Kossoff EH. Hepatic dysfunction as a complication of combined ketogenic diet and valproic acid. *Pediatr Neurol.* 2016;54:82-4.
202. Stewart WA, Gordon K, Camfield P. Acute pancreatitis causing death in a child on the ketogenic diet. *J Child Neurol.* 2001;16:682.
203. Doksöz O, Güzel O, Yılmaz Ü, İşgüder R, Çeleğen K, Meşe T, Uysal U. The short-term effect of ketogenic diet on carotid intima-media thickness and elastic properties of the carotid artery and the aorta in epileptic children. *J Child Neurol.* 2015;30:1646-50.
204. Özdemir R, Güzel O, Küçük M, Karadeniz C, Katipoğlu N, Yılmaz Ü, Yılmaz MM, Meşe T. The effect of the ketogenic diet on the vascular structure and functions in children with intractable epilepsy. *Pediatr Neurol.* 2016;56:30-4.
205. Güzel O, Uysal U, Arslan N. Efficacy and tolerability of olive oil-based ketogenic diet in children with drug-resistant epilepsy: A single center experience from Turkey. *Eur J Paediatr Neurol.* 2018;23:143-51.
206. Best TH, Franz DN, Gilbert DL, Nelson DP, Epstein MR. Cardiac complications in pediatric patients on the ketogenic diet. *Neurology.* 2000;54:2328-30.
207. Sharma S, Gulati S. The ketogenic diet and the QT interval. *J Clin Neurosci.* 2012;19:181-2.
208. Ozdemir R, Güzel O, Kucuk M, Karandeniz C, Yilmaz U, Calik T, Mese T. The impact of 3:1 ketogenic diet on cardiac repolarization changes in children with refractory seizures: A prospective follow-up study. *Neuropediatrics.* 2016;47:157-61.
209. Draaisma JMT, Hampsink BM, Janssen M, van Houdt NBM, Linders ETAM, Willemsen MA. The ketogenic diet and its effect on bone mineral density: a retrospective observational cohort study. *Neuropediatrics.* 2019;50(6):353-8.
210. Simm PJ, Bicknell-Royle J, Lawrie J, Nation J, Draffin K, Stewart KG, Cameron FJ, Scheffer IE, Mackay MT. The effect of the ketogenic diet on the developing skeleton. *Epilepsy Res.* 2017;136:62-6.
211. Kossoff EH, Zupec-Kania BA, Amark PE, Ballaban-Gil KR, Christina Bergqvist AG, Blackford R, Buchhalter JR, Caraballo RH, Helen Cross J, Dahlin MG, Donner EJ, Klepper J, Jehle RS, Kim HD, Christiana Liu YM, Nation J, Nordli DR Jr, Pfeifer HH, Rho JM, Stafstrom CE, Thiele EA, Turner Z,



- Wirrell EC, Wheless JW, Veggiotti P, Vining EP; Charlie Foundation, Practice Committee of the Child Neurology Society; Practice Committee of the Child Neurology Society; International Ketogenic Diet Study Group. Optimal clinical management of children receiving the ketogenic diet: Recommendations of the International Ketogenic Diet Study Group. *Epilepsia*. 2009;50(2):304-17.
- 212.N’Gouemo P. Targeting BK (big potassium) Channels in Epilepsy. *Expert Opin Ther Targets*. 2011;15:1283-95.
- 213.Wang L, Lv Y, Deng W, Peng X, Xiao Z, Xi Z, Chen G, Wang X. 5-HT6 Receptor Recruitment of mTOR Modulates Seizure Activity in Epilepsy. *Mol Neurobiol*. 2015;51:1292-9.
- 214.Alves Alencar Rocha AK, de Lima E, Amaral F, Pres R, Cipolla-Neto J, Amado D. Altered MT1 and MT2 melatonin receptors expression in the hippocampus of pilocarpine-induced epileptic rats. *Epilepsy Behav*. 2017;71:23-34.
- 215.Conn PJ, Pin JP. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1997;37:205-37.
- 216.Walsh KM, Bracken MB. Copy number variation in the dosage-sensitive 16p11.2 interval accounts for only a small proportion of autism incidence: a systematic review and meta-analysis. *Genet Med*. 2011;13:377-84.
- 217.La Sala L, Cattaneo M, De Nigris V, Pujadas G, Testa R, Bonfigli AR, Genovese S, Ceriello A. Oscillating glucose induces microRNA-185 and impairs an efficient antioxidant response in human endothelial cells. *Cardiovasc Diabetol*. 2016;15:71.
- 218.Cohen JE, Lee PR, Fields RD. Systematic identification of 3'-UTR regulatory elements in activity-dependent mRNA stability in hippocampal neurons. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2014;369:20130509.
- 219.Zhou Y, Wang ZF, Li W, Hong H, Chen J, Tian Y, Liu ZY. Protective effects of microRNA-330 on amyloid  $\beta$ -protein production, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease by targeting VAV1 via the MAPK signaling pathway. *J Cell Biochem*. 2018;119:5437-48.
- 220.Ortega FJ, Cardona-Alvarado MI, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Moreno M, Sabater M, Fuentes-Batllevell N, Ramírez-Chávez E, Ricart W, Molina-Torres J, Pérez-Luque EL, Fernández-Real JM. Circulating profiling reveals the effect of a polyunsaturated fatty acid-enriched diet on common microRNAs. *J Nutr Biochem*. 2015;26:1095-101.
- 221.Yoo HC, Yu YC, Sung Y, Han JM. Glutamine reliance in cell metabolism. *Exp Mol Med*. 2020;52(9):1496-516.
- 222.Ding L, Xu X, Li C, Wang Y, Xia X, Zheng JC. Glutaminase in microglia: A novel regulator of neuroinflammation. *Brain Behav Immun*. 2021;92:139-56.
- 223.Yudkoff M, Daikhin Y, Horyn O, Nissim I, Nissim I. Ketosis and brain handling of glutamate, glutamine, and GABA. *Epilepsia*. 2008;49(Suppl 8):73-5.
- 224.Mukherjee P, Augur ZM, Li M, Hill C, Greenwood B, Domin MA, Kondakci G, Narain NR, Kiebish MA, Bronson RT, Arismendi-Morillo G, Chinopoulos C, Seyfried TN. Therapeutic benefit of combining calorie-restricted ketogenic diet and glutamine targeting in late-stage experimental glioblastoma. *Commun Biol*. 2019;2:200.
- 225.Nosadini R, McCulloch A, Del Prato S, Avogaro A, Alberti KG. The relationship between alanine and ketone body in vivo. *Metabolism*. 1982;31(11):1175-8.
- 226.Lima PA, de Brito Sampaio LP, Damasceno NR. Ketogenic diet in epileptic children: impact on lipoproteins and oxidative stress. *Nutr Neurosci*. 2015;18(8):337-44.
- 227.Huang Q, Ma S, Tominaga T, Suzuki K, Liu C. An 8-Week, Low Carbohydrate, High Fat, Ketogenic Diet Enhanced Exhaustive Exercise Capacity in Mice Part 2: Effect on Fatigue Recovery, Post-Exercise Biomarkers and Anti-Oxidation Capacity. *Nutrients*. 2018;10(10):1339.
- 228.Moore MP, Cunningham RP, Kelty TJ, Boccardi LR, Nguyen NY, Booth FW, Rector RS. Ketogenic diet in combination with voluntary exercise impacts markers of hepatic metabolism and oxidative stress in male and female Wistar rats. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2020;45(1):35-44.
- 229.Kephart WC, Mumford PW, Mao X, Romero MA, Hyatt HW, Zhang Y, Mobley CB, Quindry JC, Young KC, Beck DT, Martin JS, McCullough DJ, D'Agostino DP, Lowery RP, Wilson JM, Kavazian AN, Roberts MD. The 1-Week and 8-Month Effects of a Ketogenic Diet or Ketone Salt Supplementation on Multi-Organ Markers of Oxidative Stress and Mitochondrial Function in Rats. *Nutrients*. 2017;9(9):1019.
- 230.Jain SK, Kannan K, Lim G. Ketosis (acetoacetate) can generate oxygen radicals and cause increased lipid peroxidation and growth inhibition in human endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 1998;25(9):1083-8.
- 231.Meroni E, Papini N, Criscuoli F, Casiraghi MC, Massaccesi L, Basilico N, Erba D. Metabolic Responses in Endothelial Cells Following Exposure to Ketone Bodies. *Nutrients*. 2018;10(2):250.

232. Zhang N, Liu C, Jin L, Zhang R, Wang T, Wang Q, Chen J, Yang F, Siebert HC, Zheng X. Ketogenic Diet Elicits Antitumor Properties through Inducing Oxidative Stress, Inhibiting MMP-9 Expression, and Rebalancing M1/M2 Tumor-Associated Macrophage Phenotype in a Mouse Model of Colon Cancer. *J Agric Food Chem.* 2020;68(40):11182-96.
233. Allen BG, Bhatia SK, Buatti JM, Brandt KE, Lindholm KE, Button AM, Szweda LI, Smith BJ, Spitz DR, Fath MA. Ketogenic diets enhance oxidative stress and radio-chemo-therapy responses in lung cancer xenografts. *Clin Cancer Res.* 2013;19(14):3905-13.
234. Lu Y, Yang YY, Zhou MW, Liu N, Xing HY, Liu XX, Li F. Ketogenic diet attenuates oxidative stress and inflammation after spinal cord injury by activating Nrf2 and suppressing the NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Neurosci Lett.* 2018;683:13-8.
235. Wang X, Wu X, Liu Q, Kong G, Zhou J, Jiang J, Wu X, Huang Z, Su W, Zhu Q. Ketogenic Metabolism Inhibits Histone Deacetylase (HDAC) and Reduces Oxidative Stress After Spinal Cord Injury in Rats. *Neuroscience.* 2017;366:36-43.
236. Kong G, Huang Z, Ji W, Wang X, Liu J, Wu X, Huang Z, Li R, Zhu Q. The Ketone Metabolite  $\beta$ -Hydroxybutyrate Attenuates Oxidative Stress in Spinal Cord Injury by Suppression of Class I Histone Deacetylases. *J Neurotrauma.* 2017;34(18):2645-55.
237. Greco T, Glenn TC, Hovda DA, Prins ML. Ketogenic diet decreases oxidative stress and improves mitochondrial respiratory complex activity. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016;36(9):1603-13.
238. Milder JB, Liang LP, Patel M. Acute oxidative stress and systemic Nrf2 activation by the ketogenic diet. *Neurobiol Dis.* 2010;40(1):238-44.
239. Milder J, Patel M. Modulation of oxidative stress and mitochondrial function by the ketogenic diet. *Epilepsy Res.* 2012;100(3):295-303.