

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
MESTRADO EM NUTRIÇÃO

**INFLUÊNCIA DA DIETA CETOGÊNICA RICA EM
TRIACILGLICERÓIS DE CADEIA MÉDIA E LONGA SOBRE
A PROPAGAÇÃO DA DEPRESSÃO ALASTRANTE
CORTICAL EM RATOS**

Marcela de Almeida Rabello Oliveira

MACEIÓ

2007

MARCELA DE ALMEIDA RABELLO OLIVEIRA

**INFLUÊNCIA DA DIETA CETOGÊNICA RICA EM
TRIACILGLICERÓIS DE CADEIA MÉDIA E LONGA SOBRE
A PROPAGAÇÃO DA DEPRESSÃO ALASTRANTE
CORTICAL EM RATOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Ximenes da Silva

Co-Orientadora: Profa. Dra. Terezinha da Rocha Ataíde

MACEIÓ

2007



MESTRADO EM NUTRIÇÃO
Faculdade de Nutrição
Universidade Federal de Alagoas



Campus A. C. Simões
BR 104 Km 14 Tabuleiro dos Martins
Maceió-AL 57072-970
Fone/ fax: 81 3214-1160

PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE
DISSERTAÇÃO

**"Influencia da dieta cetogênica rica em trienantina sobre a
propagação da Depressão Alastrante Cortical em ratos"**

por

Marcela de Almeida Rabello Oliveira

A Banca Examinadora, reunida aos 15 dias do mês de agosto do ano
de 2007, considera a candidata **APROVADA**.

Adriana Ximenes

Profa. Dra. Adriana Ximenes da Silva
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde/Setor de Fisiologia e
Farmacologia/ UFAL

Ana Rosa Almeida Alves

Profa. Dra. Ana Rosa de Almeida Alves
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde/Setor de Fisiologia e
Farmacologia/ UFAL

Rubem Carlos Araújo Guedes

Prof. Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes
Departamento de Nutrição/ Universidade Federal de Pernambuco

Este trabalho foi realizado nos laboratórios de Eletrofisiologia e Metabolismo Cerebral e de Nutrição Experimental da UFAL, na vigência de auxílio financeiro concedido pela CAPES e FAPEAL

Dedicado especialmente à minha mãe, Marilourdes, se não fosse a estrutura oferecida por ela não chegaria até aqui; ao meu marido, Krerley, companheiro e amigo especial, e ao meu filhinho Arthur, cujo sorriso me encanta todos os dias.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra Adriana Ximenes da Silva, que me orientou com eficiência e despertou em mim a “curiosidade” científica.

À Profa. Dra Terezinha da Rocha Ataíde pela prontidão e paciência no esclarecimento das minhas dúvidas e pela participação na elaboração e acompanhamento do projeto.

À Profa. Dra Suzana Lima de Oliveira, pela atenção, participação na elaboração e acompanhamento do projeto.

À Profa. Dra Ana Rosa Almeida Alves por ter assistido e colaborado com a primeira exposição do projeto.

Ao Prof. Dr Rubem Carlos Araújo Guedes pelos comentários e discussões.

Ao Prof. Dr Walter Matias pelo apoio e compreensão na fase mais difícil da minha vida.

Ao Prof. Dr. Petrúcio Publio de Pereira Barbosa, pelo suporte técnico e apoio.

Ao meu marido Krerley e minha sogra Elisete, que me apoiaram durante todo o curso de mestrado.

À amiga Ana Luíza de Melo Lucena pela dedicação ao projeto e apoio nos momentos mais marcantes da minha vida, a perda da minha mãe e o nascimento do meu filho.

Aos Estagiários do Laboratório de Nutrição Básica e Aplicada, em especial: Carla Emmanuela Pereira Rodrigues de Lira, Clara Rodrigues de Mendonça e Carindja Mayara Fernandes Lima, pela coleta de dados e manutenção dos animais.

A Todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A dieta cetogênica é caracterizada por altos níveis de lipídios e baixos níveis de proteínas e de carboidratos. Devido à sua grande interferência no metabolismo corporal, em especial na excitabilidade cerebral, este tipo de dieta tem sido utilizado para o tratamento de diversas doenças, em destaque a epilepsia. Este trabalho é composto por dois artigos. O primeiro artigo é uma revisão dos mecanismos moleculares e celulares pelos quais a dieta cetogênica poderia interferir no metabolismo cerebral causando uma redução da atividade elétrica cerebral, e assim, uma melhora das crises convulsivas. O segundo artigo trata da análise da influência de dois tipos de dietas cetogênicas na excitabilidade cerebral em ratos. Uma das dietas utilizadas foi a dieta cetogênica clássica, composta por triacilgliceróis com ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, o óleo de soja, mais utilizada para tratamento clínico da epilepsia; o segundo tipo de dieta utilizado é constituído por triacilgliceróis derivados do ácido graxo enântico, a trienantina, mais rapidamente metabolizada pelo organismo e bem tolerada pelo mesmo, clinicamente utilizada para tratamento de deficiência da enzima piruvato carboxilase e deficiência na oxidação de ácidos graxos de cadeia longa. Para análise da atividade elétrica cerebral utilizou-se o modelo da Depressão Alastrante. A Depressão Alastrante é um fenômeno que ocorre no tecido nervoso e quando deflagrada no córtex cerebral, causa uma redução da atividade elétrica cortical que se propaga lentamente, com velocidade de 2-5 mm/min, por todas as regiões do córtex cerebral, e em cuja fase inicial encontra-se um surto de atividade elétrica neuronal semelhante às ondas cerebrais características da epilepsia. Devido às suas características esse fenômeno tem sido amplamente utilizado para estudo da funcionalidade cerebral.

Palavras chave: dieta cetogênica, excitabilidade cerebral, trienantina, depressão alastrante.

ABSTRACT

The ketogenic diet is high fat, low carbohydrate and protein. This kind of diet is used to treatment of a lot of disease, especially epilepsy, because their ability to interfere on body metabolism and cerebral excitability. This work contains two articles. The first one is a review of the molecular and cellular mechanisms of action of the ketogenic diet on the reduction of cerebral electrical activity to improve the seizures. The second one is an experimental study which aims to analyze the interference of two kinds of ketogenic diet on the cerebral excitability. One of diets used was the classical ketogenic diet, composed by long chain triglycerides with polyunsaturated fatty acids, soy oil, widely used to treatment of epilepsy; the other one was composed by triglycerides of the enantic acid, seven molecules of carbon, the triheptanoin, which is metabolized faster and well accepted by the organism, used to clinical treatment of disorders of pyruvate carboxilase enzyme and long chain fatty acid oxidation. In order to analyze the cerebral electric activity we used the Spreading Depression feature. The Spreading Depression is a phenomenon that occurs in the nervous system and when triggered at cerebral cortex leads to a reduction of neuronal activity which spreads slowly, with velocity of 2-5 mm/min, to all regions of the cerebral cortex. A burst of neuronal electrical activity similar to that found in epileptic EEG occurs during the initial phase of spreading depression. Because theirs characteristics this phenomenon had been widely used to study brain functionality.

Key words: Cerebral excitability, spreading depression, ketogenic diet, triheptanoin.

LISTA DE FIGURAS

Página

Artigo 1 - Figura 1

Mecanismos de redução da excitabilidade cerebral 25

Artigo 2 – Figura 1

Velocidades médias de propagação da Depressão Alastrante

Cortical (mm/min.) 41

LISTA DE TABELAS

	Página
Artigo 2 - Tabela 1	
Composição das dietas controle e cetogênicas	38
 Artigo 2 - Tabela 2	
Análise dos níveis de glicose, colesterol e eletrólitos sanguíneo	41

LISTA DE ABREVIATURAS

BHB - β -hydroxybutyrate

CAT - Ciclo dos ácidos tricarboxílicos

CSD - Cortical Spreading Depression

GABA - Gama-aminobutiric acid

GLUT - Glucose transporter

KD - Ketogenic diet

LCT - Long-chain triglyceride

MCT - Medium-chain triglyceride

MCT1 - Transportadores de monocarboxilato tipo 1

OAA - Oxaloacetato

TCL - Triacilglicerol de cadeia longa

TCM - Triacilglicerol de cadeia média

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 1° ARTIGO (Dieta cetogênica e mecanismos de ação no controle da excitabilidade cerebral)	15
1.2 2° ARTIGO (Effects of short-term and long-term treatment with medium- and long-chain triglycerides ketogenic diet on cortical spreading depression in young rats).....	32
2 CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
3 REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

A dieta cetogênica clássica tem sido utilizada de forma crescente como procedimento alternativo utilizado no tratamento da epilepsia, principalmente em crianças não responsivas às drogas anticonvulsivantes mais comuns (STAFSTROM, 2004). Apesar de seus mecanismos de ação ainda permanecerem desconhecidos, sua interferência na diminuição da excitabilidade cerebral merece destaque.

O primeiro artigo deste trabalho discute duas vias pelas quais a dieta cetogênica poderia levar à diminuição da excitabilidade cerebral e, desta forma, melhorar as crises convulsivas características da epilepsia. Em uma delas, acredita-se que o aumento das concentrações de corpos cetônicos, consequência das alterações metabólicas geradas pelo alto teor de lipídios da dieta e da sua restrita concentração de carboidratos, induziria uma modificação no pool de aminoácidos neurotransmissores aumentando a concentração do ácido gama-aminobutírico (GABA), principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central e possível agente responsável pela diminuição das crises epiléticas (YUDKOFF et al. 2005). Uma outra via discutida neste trabalho, que também poderia levar a uma diminuição das crises epiléticas, prescinde do aumento das concentrações sanguíneas de corpos cetônicos. Por este caminho, a diminuição da glicemia provocada pela dieta cetogênica ou por um outro tipo de dieta com restrição calórica, teria como consequência o aumento da eficiência da via responsável pela remoção do glutamato do espaço sináptico (YUDKOFF et al. 2006). O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central e provável mediador das crises convulsivas; sua remoção teria como consequência a diminuição da excitabilidade cerebral.

Visto que a dieta cetogênica apresenta efeitos satisfatórios no controle da excitabilidade cerebral, sua forma mais aplicada para tratamento clínico da epilepsia, a dieta cetogênica clássica, é composta por triacilgliceróis com ácidos graxos de cadeia longa. Um outro tipo de composição de dieta cetogênica, menos utilizado, utiliza triacilgliceróis com ácidos graxos de cadeia média. Sabendo-se que este tipo de triacilglicerol é mais rapidamente metabolizado pelo organismo, a proposta do segundo artigo é a de analisar a influência destes dois tipos de dieta sobre a funcionalidade do sistema nervoso central. Para isso, utilizamos a dieta

cetogênica clássica, formada por óleo de soja, e a dieta cetogênica rica em trienantina. A trienantina (triheptanoína) é um triacilglicerol do ácido graxo enântico (heptanóico, C7:0), bem tolerado pelo organismo e tem sido recentemente utilizada no tratamento de distúrbios mitocondriais da oxidação de ácidos graxos de cadeia longa e da deficiência da enzima piruvato carboxilase (ROE et al; 2002; MOCHEL et al; 2005).

A análise da atividade elétrica cerebral foi desenvolvida utilizando-se o modelo da Depressão Alastrante Cortical, que consiste em uma diminuição da atividade elétrica cortical que se propaga lentamente, com velocidade variando de 2-5 mm/min, por todas as direções do córtex cerebral. Um surto de atividade elétrica neuronal semelhante às ondas cerebrais características da epilepsia é encontrado durante a fase inicial da Depressão Alastrante Cortical (LEÃO, 1944). Este modelo tem sido amplamente utilizado devido às suas características eletrofisiológicas serem facilmente reproduzíveis e por apresentar mecanismos de ação semelhantes a fenômenos ligados à excitabilidade cerebral, como a enxaqueca e a epilepsia.

1º artigo:

Oliveira, M.A.R, Ataíde, T.R., Ximenes-da-Silva, A. Dieta cetogênica e mecanismos de ação no controle da excitabilidade cerebral

Título: Dieta cetogênica e mecanismos de ação no controle da excitabilidade cerebral

Title: Ketogenic diet and mechanisms of action in cerebral excitability control

Marcela de Almeida Rabello Oliveira¹, Terezinha da Rocha Ataíde² & Adriana Ximenes-da-Silva¹

¹Laboratório de Eletrofisiologia e Metabolismo Cerebral. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. ² Laboratório de Bioquímica e Fisiologia. Faculdade de Nutrição. Universidade Federal de Alagoas, Maceió – Brasil.

Financiamento: Fapeal n° 20040930206-2

Marcela de Almeida Rabello Oliveira - bolsista da capes do curso de Mestrado em Nutrição/UFAL

Terezinha da Rocha Ataíde - colaboradora; co-orientadora

Adriana Ximenes-da-Silva - autora responsável; orientadora

Endereço para correspondência:

Setor de Fisiologia e Farmacologia

Praça Afrânio Jorge, s/n Prado - Maceió - AL

CEP - 57.010-020

Fone: (82) 3223-5613

Fax: (82) 3221-2501

e-mail: aximenes@ccbi.ufal.br

Short-title: cetogênese e excitabilidade cerebral; ketogenesis and brain excitability

Submetido à Revista Brasileira de Nutrição (protocolo n°1421)

Resumo

A dieta cetogênica, composta por alto teor de lipídios e baixos níveis de proteínas e de carboidratos, tem sido amplamente utilizada no tratamento de diversas patologias, tais como deficiência na enzima piruvato carboxilase, tumores dependentes do metabolismo glicolítico e, principalmente, na epilepsia. Seus mecanismos de ação ainda permanecem desconhecidos, porém sua eficácia na redução das crises epiléticas merece destaque. Neste sentido, alguns estudos atribuem à alteração no “pool” de aminoácidos neurotransmissores a responsabilidade pelo seu principal efeito. Acredita-se que o aumento do acetil CoA fornecido pelos corpos cetônicos ative a reação da citrato sintase, processo que consome oxaloacetato diminuindo a sua disponibilidade para a reação de transaminação do glutamato a aspartato, da qual é reagente. Desta forma, mais glutamato se torna disponível para a reação da glutamato descarboxilase, favorecendo o aumento da concentração cerebral do ácido gama-aminobutírico (GABA), neurotransmissor inibitório. Outros estudos, entretanto, atribuem à baixa ingestão dietética de carboidratos a diminuição das crises epiléticas. Períodos de intensa atividade neuronal provocam um aumento da síntese de alanina a partir do glutamato e do piruvato, e sua exportação do cérebro para a corrente sanguínea, levando a um possível processo de remoção de parte do glutamato cerebral, aminoácido excitatório e provável agente da convulsão. Neste contexto, o objetivo desta revisão é descrever os principais mecanismos de ação da dieta cetogênica no controle da excitabilidade cerebral, facilitando a compreensão de seus possíveis efeitos na redução das crises convulsivas.

Abstract

The ketogenic diet is a high fat, low protein and low carbohydrate diet, used for treatment of several pathologic conditions as pyruvate carboxylase deficiency, tumors dependent on glucose metabolism and particularly in epilepsy treatment. Its mechanism of action still remains unknown but its efficiency in reducing seizures frequency is remarkable. Accordingly, some studies have mentioned amino acid neurotransmitters pool changes as the main cause of ketogenic diet effects. It's believed that the increase of acetyl CoA from ketone bodies activates citrate synthetase reaction, consuming oxaloacetate and thereby reducing it for glutamate-aspartate transamination reaction. Thus, more glutamate is available to glutamate decarboxylase reaction, leading to an increase of brain gamma-aminobutyric acid (GABA) concentration, an inhibitory neurotransmitter. Other studies have however attributed to low-carbohydrate diet consumption the reduction in seizure frequency. Periods of high neuronal activity lead to an increase of alanine synthesis from glutamate and pyruvate, with an efflux of this former from brain to blood, which would carry to a reduction of brain glutamate levels, excitatory amino acid involved in epilepsy mechanism. In this way, this review aims to give a picture of the main ketogenic diet mechanism of action controlling brain excitability, in an attempt to understand its anticonvulsive effects.

Key words: ketogenic diet, epilepsy, seizure, brain, excitability, glutamate

INTRODUÇÃO

A dieta cetogênica clássica, composta por alto teor de lipídios e baixos níveis de proteínas e de carboidratos, é utilizada como tratamento para diversas doenças incluindo deficiência na enzima piruvato carboxilase⁽¹⁾, alguns tipos de tumores dependentes do metabolismo de glicose⁽²⁾, espasmos infantis⁽³⁾ e, principalmente, para o tratamento da epilepsia. Em cerca de 400 a.C a epilepsia era conhecida como uma doença espiritual e de origem sobrenatural atribuída a possessões demoníacas. Hipócrates foi um dos primeiros a atacar essa concepção atribuindo seu desenvolvimento à anóxia cerebral e não mais a uma causa espiritual; o único caso por ele identificado foi tratado com jejum completo. Galeno, cerca de 500 anos após Hipócrates, sugeria que as convulsões teriam origem no cérebro e seriam provocadas por substâncias irritantes, trazidas de outras partes do corpo. Os tratamentos para a epilepsia, até então, eram empíricos, e variavam desde a ingestão de urina, crânio humano triturado e sangue, à ausência de certos alimentos, como alho e alguns vegetais. Orações e o jejum também faziam parte das recomendações terapêuticas⁽⁴⁾. Por volta de 1920, após a descoberta de drogas anti-epiléticas, como o brometo e o fenobarbital⁽⁵⁾, que se mostraram bastante eficazes na redução ou mesmo no desaparecimento dos sintomas da epilepsia, Hugh Conklin iniciou um tratamento denominado de “dieta da água”, o qual consistia em períodos de três a quatro semanas sem alimentação. Em 1921, H. Rawle Geyelin, endocrinologista da American Medical Association, Boston, relatou o caso de 26 pacientes epiléticos tratados com jejum. Destes, dois deixaram de apresentar os sintomas da epilepsia e 18 apresentaram melhora⁽⁶⁾. Como os benefícios clínicos do jejum prolongado não compensavam suas desvantagens, no mesmo ano, também nos Estados Unidos, Dr. Wilder, na Maio

Clinic, sugeriu a dieta cetogênica como uma forma de reproduzir os efeitos do jejum, com a vantagem de poder ser mantida por períodos mais longos ⁽⁶⁾.

A dieta cetogênica foi amplamente utilizada até a década de 1930 quando as drogas anticonvulsivantes se tornaram disponíveis, diminuindo a sua utilização como um tratamento de escolha. Na década de 1990 o interesse pela dieta cetogênica ressurgiu e a mesma se tornou um procedimento alternativo utilizado no tratamento da epilepsia, principalmente em crianças não responsivas às drogas anticonvulsivantes mais comuns⁽⁷⁾. Em um estudo realizado com 150 crianças no John Hopkins Medical Institution, em Baltimore, metade das crianças tratadas com a dieta cetogênica durante um ano alcançaram mais de 50% de melhora no controle das convulsões, enquanto 27% das mesmas tiveram uma diminuição igual ou maior que 90% na frequência das crises convulsivas ⁽⁸⁾. Em um outro estudo com 23 crianças portadoras de espasmos, a dieta também foi considerada uma alternativa viável de terapia, principalmente para crianças resistentes às drogas anticonvulsivantes. Todas as crianças que permaneceram na dieta por 12 meses tiveram redução na frequência das convulsões; 57% tiveram seus medicamentos reduzidos ou descontinuados em um ano, ou seja, a dieta também foi bem tolerada e eficaz no tratamento de espasmos infantis ⁽³⁾. Outros estudos confirmam a eficiência da dieta no controle de crises convulsivas em crianças ^{(9), (10), (11)}.

CARACTERÍSTICAS DA DIETA CETOGÊNICA

A dieta cetogênica clássica mais utilizada é constituída por triacilgliceróis com ácidos graxos de cadeia longa (TCL) na proporção 4:1 (lipídio: carboidrato + proteína)^(9, 12, 13). Geralmente, as proteínas são de alto valor biológico, como a proteína animal, cujas fontes são ricas em gordura ⁽⁵⁾. Um segundo tipo de dieta cetogênica, menos utilizado, é constituído por triacilgliceróis com ácidos graxos saturados de cadeia média (TCM), com 6 a 10 átomos de carbono, que promove efeito cetogênico numa menor relação de lipídio para proteína + carboidrato, 1,2:1 ^{(2), (14)}. Os TCM são menos disponíveis na natureza; suas principais fontes são os óleos de coco e de palma. Estes triacilgliceróis são mais rapidamente metabolizados visto que são mais facilmente hidrolizados no intestino, sendo transportados diretamente para o fígado via sistema porta e, além disso, não necessitam da enzima carnitina palmitoil transferase para o transporte intramitocondrial⁽¹⁵⁾.

Os mecanismos de ação da dieta cetogênica com relação ao seu efeito sobre a redução das crises epiléticas ainda não foram completamente esclarecidos. Neste sentido, verificou-se que ratos com epilepsia induzida por ácido caínico tratados com dieta cetogênica apresentaram menor incidência de crises epiléticas, o que sugere que a dieta confere uma proteção contra mudanças bruscas na atividade eletrofisiológica do cérebro⁽¹⁶⁾. Verificou-se também uma elevação do limiar para convulsão induzido por choque eletroconvulsivo, pentilenotetrazol ⁽¹⁷⁾, bicuculina, picrotoxina e cainato⁽¹⁸⁾ após o uso da dieta cetogênica. Em ratos, o aumento da produção de corpos cetônicos é necessário para que os efeitos anticonvulsivos da dieta ocorram, pois, com o

bloqueio da oxidação de ácidos graxos, o limiar para a deflagração de convulsão induzida é diminuído ^(18,19).

Em humanos, uma forma não invasiva de constatar a presença de corpos cetônicos é a análise da acetona respiratória. Verificou-se que, mediante a utilização de dieta cetogênica, crianças mais jovens tiveram maior aumento pós-prandial de acetona respiratória; crianças com maior peso corporal foram mais resistentes ao desenvolvimento de cetose, e crianças com epilepsia tiveram maior concentração de acetona respiratória do que crianças saudáveis que não consumiram dieta cetogênica ⁽²⁰⁾. Em animais, a administração de acetona impede ou previne as convulsões; a administração crônica de acetona, seguida de sua injeção aguda, suprimiu a convulsão em 47% dos ratos submetidos a tratamento convulsivante com pentilenotetrazol, um efeito semelhante ao da dieta cetogênica ⁽²¹⁾.

MECANISMOS DE AÇÃO DA DIETA CETOGÊNICA

A glicose é o principal substrato energético utilizado pelo metabolismo cerebral; entretanto, em determinadas circunstâncias, como em lactentes ⁽²²⁾, jejum ⁽²³⁾ e uso de dietas cetogênicas o cérebro também pode utilizar monocarboxilatos, como o lactato, o β -hidroxibutirato e o acetoacetato, como combustíveis principais.

A utilização de dietas cetogênicas leva, inicialmente, a uma diminuição dos níveis de glicose, com um aumento conseqüente dos níveis de β -hidroxibutirato, que se mantêm elevados até o final do período de duração da dieta ⁽²⁴⁾. Nessas circunstâncias, o cérebro deverá assegurar o aporte de substratos energéticos

para a manutenção de seu alto metabolismo oxidativo, que corresponde a cerca de 25% da taxa metabólica corporal total.

Assim como a glicose, os monocarboxilatos também atravessam a barreira hematoencefálica, através de proteínas transportadoras, os transportadores de monocarboxilato (MCT1), para que sirvam de substratos energéticos para o cérebro. Em situações normais estes transportadores encontram-se em quantidades reduzidas, já que a glicose funciona como fonte energética primária para o cérebro. A expressão endotelial dos transportadores MCT1 no endotélio dos capilares cerebrais de ratos adultos pode ser induzida pelo uso de dieta cetogênica, favorecendo o transporte de corpos cetônicos do sangue para o cérebro, onde serão utilizados como substratos energéticos. Nas células endoteliais da barreira hemato-encefálica, a expressão do transportador de glicose GLUT 1 também é aumentada, sugerindo que o aporte de combustíveis energéticos para o cérebro pode sofrer regulação pela influência da manipulação dietética ⁽²⁴⁾.

Em humanos, durante o jejum, verificou-se um aumento significativo na produção de piruvato e lactato, bem como um aumento na captação cerebral de β -hidroxibutirato e acetoacetato, os quais substituem a glicose como fonte de energia, gerando uma diminuição do metabolismo da glicose e da gliconeogênese, à medida que o organismo se adapta à utilização dos cetoácidos ⁽²³⁾.

Em condições normais, a glicose é convertida a piruvato, via glicólise, o qual pode ser convertido em lactato, via lactato desidrogenase, ou em acetil CoA, via piruvato desidrogenase, no interior da mitocôndria. O acetil CoA entra no Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (CAT), via catabólica comum na degradação de

carboidratos, proteínas e lipídios, condensando-se com o oxaloacetato (OAA), via citrato sintase, formando o citrato. Uma diminuição da glicemia, situação observada na dieta cetogênica devido a pouca quantidade de carboidrato e elevada quantidade de gordura, faz com que o metabolismo hepático seja alterado, aumentando o consumo de malato e oxaloacetato, que saem do CAT para produzir glicose, via gliconeogênese, de modo que o acetil CoA, que antes se condensaria com o OAA para a formação de citrato, se acumule, estimulando a produção de corpos cetônicos (acetoacetato, β -hidroxibutirato e acetona volátil).

No cérebro, para que os corpos cetônicos sirvam como substratos energéticos devem ser reativados à sua forma CoA, via succinil-CoA transferase. Assim sendo, o acetoacetato é convertido a acetil CoA, o qual entra no CAT para produção de energia e intermediários metabólicos.

Os mecanismos pelos quais a dieta cetogênica atua no controle da epilepsia ainda permanecem desconhecidos. Contudo, alguns estudos vêm tentando desvendar os possíveis caminhos que levam a uma redução das crises convulsivas, ou até mesmo ao seu desaparecimento, em pacientes epiléticos não responsivos a medicamentos. Dentre tais caminhos, a alteração no pool de aminoácidos neurotransmissores tem sido considerada como principal responsável pelos efeitos observados. Acredita-se que o consumo do succinil CoA (inibidor da reação de síntese do citrato) pela reação de formação de acetil CoA a partir do acetoacetato, via succinil CoA transferase, aumente a produção de citrato consumindo, assim, o OAA e alterando o equilíbrio da reação de transaminação do glutamato a aspartato (glutamato + oxaloacetato \leftrightarrow aspartato + 2 oxo-glutarato). Desta forma, o possível acúmulo de glutamato levaria a uma

maior disponibilidade do mesmo para a síntese de GABA, o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso⁽²⁵⁾ (fig.1).

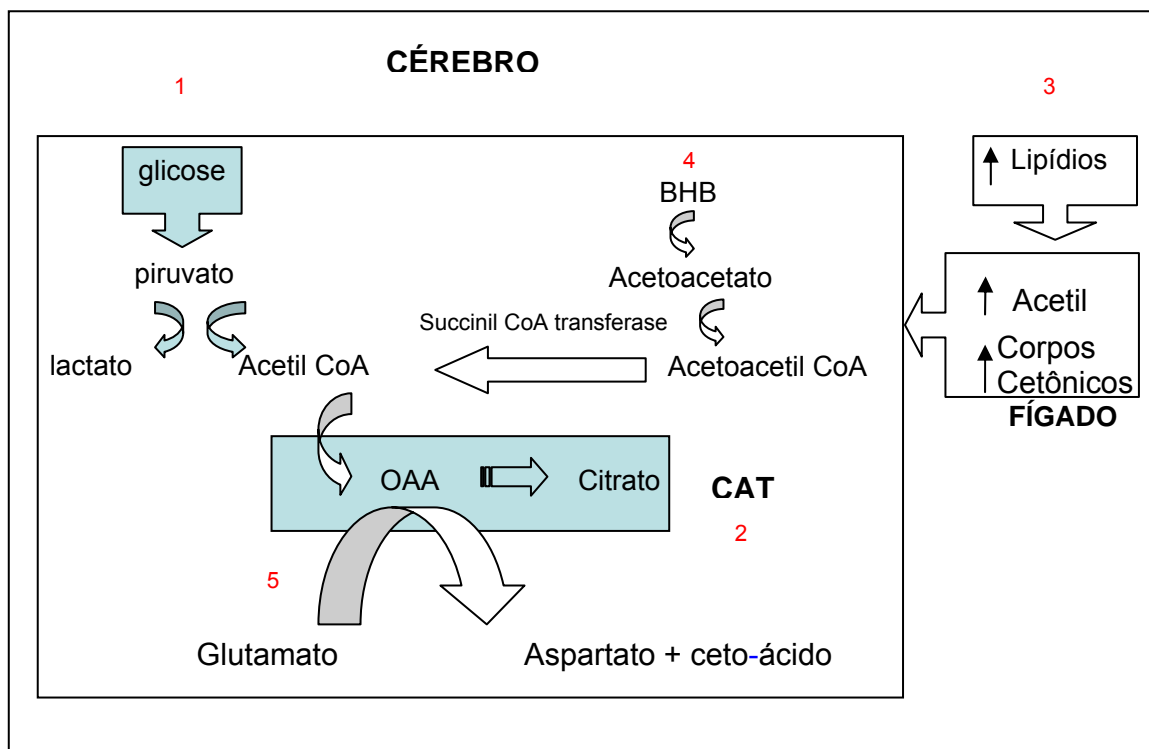


Figura 1- A glicose é convertida em piruvato e o mesmo pode se converter em lactato ou em acetil CoA na mitocôndria; 2) no CAT o acetil CoA se condensa com o OAA formando o citrato, via citrato sintase; 3) a dieta cetogênica eleva os níveis de lipídios e a produção de corpos cetônicos no fígado, pelo aumento da síntese de acetil CoA; 4) no cérebro os corpos cetônicos são reativados a sua forma acetil CoA, via succinil CoA transferase, e 5) a enzima succinil CoA transferase leva à diminuição do succinil CoA e ao aumento da síntese de citrato, a partir do OAA, o que levará a uma menor disponibilidade do OAA para a reação de transaminação com o glutamato, aumentando, assim, a disponibilidade deste para síntese de neurotransmissores inibitórios. CAT – Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos; OAA – oxaloacetato.

Em um estudo com humanos submetidos à dieta cetogênica, os níveis de GABA mantiveram-se elevados e diretamente relacionados à diminuição das convulsões; houve uma diminuição nos níveis de glutamato e alanina⁽²⁶⁾. Em

experimento realizado em cultura de astrócitos, na presença dos corpos cetônicos acetoacetato e β -hidroxibutirato, a transaminação do glutamato a aspartato foi fortemente reduzida, diminuindo a concentração intracelular de aspartato⁽²⁷⁾. Em experimentos com animais sujeitos à dieta cetogênica, verificou-se uma diminuição do conteúdo de glutamato no cérebro, enquanto que os níveis de GABA se mantiveram inalterados, propondo-se um possível consumo do glutamato para a síntese do GABA. Ocorreu uma diminuição da glicólise e de produtos do piruvato, como a alanina, à medida que houve um aumento do metabolismo do acetato pelos astrócitos⁽²⁸⁾.

Por outro lado, outros estudos com animais questionam a necessidade do aumento da cetonemia como fator protetor da dieta, sugerindo que a diminuição do aporte de glicose, em virtude da reduzida quantidade de carboidrato da dieta, seja um fator importante para a neuroproteção.

A restrição calórica também se mostrou eficiente na promoção do aumento do limiar para a convulsão^{(29),(30),(31)}. Num estudo com ratos submetidos a três tipos de dietas, duas ricas em carboidratos e restritas a 65% e 50% das necessidades energéticas dos animais, e uma cetogênica restrita a 90% das necessidades energéticas, observou-se que houve um aumento da cetonemia em todos os grupos, sendo que nos animais submetido à dieta cetogênica este aumento foi muito mais expressivo, e, mesmo nessas condições, não houve diferença significativa no limiar para convulsão induzida por pentilenotetrazol entre os três tipos de dieta⁽³¹⁾.

Um mecanismo proposto para o efeito da dieta com restrição calórica sobre o controle das crises convulsivas estaria na relação entre dieta hipocalórica e alteração no metabolismo de aminoácidos. Yudkoff et al⁽³²⁾ propuseram que,

durante um período de reduzida ingestão de glicose e de baixa ingestão calórica, a intensa atividade neuronal levaria a um aumento da captação do glutamato pelos astrócitos e a um aumento da glicólise, até a etapa do piruvato. A disponibilidade do glutamato e do piruvato facilitaria a síntese de alanina no cérebro, via alanina aminotransferase. Visto que a alanina sanguínea é diminuída em situações de cetose e de ingestão dietética hipocalórica ou de baixa proporção de carboidratos^{(27), (28)}, ocorreria um aumento do fluxo de alanina do cérebro para o sangue, favorecendo, assim, a remoção do glutamato, um dos principais neurotransmissores excitatórios do sistema nervoso e possível agente da patogênese da convulsão⁽³²⁾.

CONCLUSÕES

Desta forma, concluímos que, através da manipulação dietética, é possível se alterar o metabolismo cerebral. As vias envolvidas na diminuição da excitabilidade cerebral poderiam estar relacionadas à modificação no pool de aminoácidos neurotransmissores provocada pela dieta cetogênica, o qual provocaria um aumento da síntese do GABA e, assim, uma diminuição das crises convulsivas provocadas pela epilepsia. Verifica-se ainda que a restrição calórica também pode ser um possível caminho que induza uma diminuição da excitabilidade cerebral, através da viabilização da remoção do glutamato cerebral mais rapidamente via exportação da alanina cerebral.

REFERÊNCIAS

1. Mochel, F., DeLonay, P., Touati, G., Brunengraber, H., Kinman, R.P., Rabier, D., Roe, C.R., Saudubray, J. Pyruvate carboxilase deficiency: clinical and biochemical response to anaplerotic diet therapy. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2005; 84: 305-312.
2. Nebeling L.C., Lerner E. Implementing a ketogenic diet based on medium-chain triglyceride oil in pediatrics patients with cancer. *Journal of the American Dietetic Association*. 1995; 95(6): 693-697.
3. Kossof E. H., Pyzik P. L., McGrogan J. R., Vinning E.P.G. Freeman J.M. Efficacy of the ketogenic diet for infantile spasms. *Pediatrics*. 2002; 109: 780-783.
4. Lennox, W.G. *Epilepsy and related disorders*. Little & Brown. J&A Churchill LTD. London. 1961; Vol.1 p. 13-14.
5. 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.
6. Lennox, W.G. *Epilepsy and related disorders*. Little & Brown. J&A Churchill LTD. London. 1961; Vol.2; 736, 826-829.
7. Stafstrom C.E. Dietary approaches to epilepsy treatment: old and new options on the menu. *Epilepsy Currents*. 2004; 4 (6): 215-222.
8. Freeman, J.M., Vining, E.P.G., Pillas, D.J., Pyzik, P.L., Casey, J.C., Kelly, M.T. The efficacy of the ketogenic diet - 1998: a prospective evaluation of intervention in 150 children. *Pediatrics*. 1998a; 102, 1358–1363.

9. Hassan A. M., Keene D.L., Whiting S.E., Jacob P.J., Champagne J.R., Humphreys P. Ketogenic diet in the treatment of refractory epilepsy in childhood. *Pediatr Neurol.* 1999; 21:548-552.
10. Coppola G., Veggiotti P., Cusmai R., Bertoli S., Cardinali S., Dionisi-Vici C., Elia M., Lispi M.L., Sarnelli C., Tagliabue A., Toraldo C., Pascotto A. The ketogenic diet in children, adolescents and young adult with refractory epilepsy: an Italian multicentric experience. *Epilepsy Research.* 2002; (48):221–227.
11. Vining E.P.G. Clinical efficacy of the ketogenic diet. *Epilepsy Research.* 1999; (37): 181–190.
12. Carrol J, Koenigsberger D. The ketogenic diet: a practical guide for caregivers. *Journal of the American Dietetic Association.* 1998; 98(3): 316-321.
13. Magrath G., Macdonald A., Whitehouse W. Dietary practices and use of the ketogenic diet in the UK. *Seizure.* 2000; 9: 128–130.
14. Thavendiranathan P., Mendonca A., Dell C., Likhodii S.S., Musa K., Iracleous C., Cunnane S.C., Burnham W. M. The MCT ketogenic diet: effects on animal seizure models. *Experimental Neurology.* 2000; 161: 696-703.
15. Marten B., Pfeuffer M., Schrezenmeir J. Medium-chain triglycerides. *International Dairy Journal.* 2006; 16: 1374-1382.
16. Su S.W., M. Cílio M.R., Sogawa Y., Silveira D., Holmes G.L., Stafstrom C.E. Timing of ketogenic diet initiation in an experimental epilepsy model. *Developmental Brain Research.* 2000; 125:131–138.

17. Thavendiranathan P., Chow C., Cunnane S., Burnhama W.M. The effect of the 'classic' ketogenic diet on animal seizure models. *Brain Research* 2003; 959: 206–213.
18. Bough K. J., Gudi K., Han F.T., Alyssa H. Rathod A.H., Eagles D.A. An anticonvulsant profile of the ketogenic diet in the rat. *Epilepsy Research* 2002;(50)313-325.
19. Harney J.P., Madara J., Madara J., l'Anson H. Effects of acute inhibition of fatty acid oxidation on latency to seizure and concentrations of hydroxybutyrate in plasma of rats maintained on calorie restriction and/or the ketogenic diet. *Epilepsy Research*. 2002; (49) 239–246.
20. Musa-Veloso K., Rarama E., Comeau F., Curtis R., Cunnane S. Epilepsy and the ketogenic diet: assessment of ketosis in children using breath acetone. *Pediatric Research*. 2002; 52(3): 443-448.
21. Likhodii S.S., Burnham. Ketogenic diet: does acetone stop the seizures? *Med. Sci. Monit*. 2002; 8 (8): HY19-24.
22. Nehlig A. Age-dependent pathways of brain energy metabolism: the suckling rat, a natural model of the ketogenic diet. *Epilepsy Research*. 1999; 37; 211-221.
23. Owen O.E., Morgan A. P., Kemp H. G., Sullivan J.M., Herrera M. G., Cahill G.F. Jr. Brain Metabolism during Fasting. *The Journal of Clinical Investigation*. 1967; 46(10): 1589-1595.
24. Leino R.L., Gerhart D.Z., Duelli R., Enerson B.E., Drewes L.R. Diet-induced ketosis increases monocarboxylate transporter (MCT1) levels in rat brain. *Neurochemistry International* 2001; 38: 519-527.

25. Yudkoff M., Daikhin Y., Nissim I., Horyn O., Lazarow A., Luhovyy B., Wehrli S., Nissim I. Response of brain amino acid metabolism to ketosis. *Neurochemistry International* 2005;(47): 119–128.
26. Dahlin M., Elfving A., Ungerstedt U., Amark P. The ketogenic diet influences the levels of excitatory and inhibitory amino acids in the CSF in children with refractory epilepsy. *Epilepsy Research*. 2005; 64: 115-125.
27. Yudkoff M., Daikhin Y., Nissim I., Grunstein R., Nissim I. Effects of ketone bodies on astrocyte amino acid metabolism. *J. Neurochem*. 1997; 69: 682-692.
28. Melø T.M., Nehlig A., Sonnewald U. Neuronal-glia interactions in rats fed a ketogenic diet. *Neurochemistry International*. 2006; (48): 498–507.
29. Bough K. J., Valiyil R., Han F. T., Eagles D.A. Seizure resistance is dependent upon age and calorie restriction in rats fed a ketogenic diet. *Epilepsy Research*. 1999; (35): 21–28.
30. Greene A.E., Todorova M. T., McGowan R., Seyfried T.N. Caloric restriction inhibits seizure susceptibility in epileptic El Mice by reducing blood glucose. *Epilepsia*. 2001; 42(11): 1371-1378.
31. Eagles D.A., Boyd S. J., Kotak A., Allan F. Calorie restriction of a high-carbohydrate diet elevates the threshold of PTZ-induced seizures to values equal to those seen with a ketogenic diet. *Epilepsy Research*. 2003; (54): 41–52.
32. Yudkoff M., Daikhin Y., Nissim I., Horyn O., Luhovyy B., Lazarow A., Nissim I. Short-term fasting, seizure control and brain amino acid metabolism. *Neurochemistry International*. 2006; 48: 650-656.

2º artigo:

Oliveira, M.A.R, Ataíde, T.R., Oliveira, S.L., Lucena, A.L.M., Lira, C.E.P.R., Ximenes-da Silva, A. Effects of short-term and long-term treatment with medium- and long-chain triglycerides ketogenic diet on cortical spreading depression in young rats.

Effects of short-term and long-term treatment with medium- and long-chain triglycerides ketogenic diet on cortical spreading depression in young rats

Marcela de Almeida Rabello Oliveira¹, Terezinha da Rocha Ataíde², Suzana Lima de Oliveira², Ana Luíza de Melo Lucena², Carla Emmanuela Pereira Rodrigues de Lira¹ and Adriana Ximenes-da-Silva¹

¹Laboratório de Eletrofisiologia e Metabolismo Cerebral. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. ² Laboratório de Nutrição Experimental. Faculdade de Nutrição. Universidade Federal de Alagoas, 57.010-020, Maceió, AL, Brazil.

This article will be submitted to Neuroscience Letters Journal

For whom correspondence must be addressed:

Adriana XIMENES-DA-SILVA

Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Setor de Fisiologia e Farmacologia
Praça Afrânio Jorge, s/n Prado
Maceió - AL - Brazil
CEP - 57.010-020
Phone: + 55 82 3223 - 5613 Fax: + 55 82 3221-2501
E-mail: aximenes@ccbi.ufal.br

ABSTRACT

The ketogenic diet (KD) is a high fat and low carbohydrate and protein diet. It is used in the clinical treatment of epilepsy, in order to decrease cerebral excitability. KD is usually composed by long-chain triglycerides (LCT) while medium-chain triglycerides (MCT) diet begins to be used in some clinical treatment of disorders of pyruvate carboxylase enzyme and long-chain fatty acid oxidation. Our study aimed to analyze the effects of medium- and long-chain KD on cerebral electrical activity analyzing the propagation of the phenomenon of cortical spreading depression (CSD). Three groups of weaned rats (21days old) received, for 7 weeks, either a control (AIN-93G diet), or a MCT-KD (rich in triheptanoin oil), or a LCT-KD (rich in soybean oil). They were compared to another 3 groups (21days old) receiving the same diets for just 10 days. CSD propagation was evaluated just after ending the dietary treatments. Results showed that short-term KD treatment resulted in a significant reduction of the CSD velocity of propagation (control group: 4.02 ± 1.04 mm/min; MCT-KD: 1.62 ± 1.92 mm/min and LCT KD: 2.26 ± 0.41 mm/min) compared to control group. However, long-term treatment with both KD had no effect on the CSD velocity (control group: 3.10 ± 0.41 mm/min, MCT-KD: 2.91 ± 1.62 mm/min, LCT-KD: 3.02 ± 2.26 mm/min) suggesting that both short-term KD have a positive effect in decreasing brain cerebral excitability in young animals. These data show for the first time that triheptanoin has an effect on central nervous system.

Key words: ketogenic diet, triheptanoin, cerebral metabolism, spreading depression.

INTRODUCTION

The classical ketogenic diet (KD) is characterized by a high fat, low protein and low carbohydrate diet. It was introduced in 1921 by Dr Wilder to mimics fasting effects ^[1], which is known since 400 b.C. for its efficacy in epilepsy treatment ^[2]. This diet can be used for longer periods compared to the usual fasting periods and has been used as a treatment for children with antiepileptic drug resistance ^[1,2,3,4,5,6].

KD is usually composed by long-chain triglycerides (LCT) in a proportion of 3:1 to 4:1 (lipid: carbohydrate + protein) ^[2, 7, 8]. Another kind of KD composed by medium-chain triglycerides (MCT) of 6 to 12 carbons begins to be used in treatment of some pathological conditions such as long-chain fatty acid oxidation disorders and pyruvate carboxylase deficiency ^[9,10]. This diet has been used with a smaller proportion of lipid: protein + carbohydrate (1,2:1, 2,3:1 or 3:1) and allows a faster fatty acid oxidation compared to long-chain fatty acid diets ^[11,12,13].

The MCT more frequently used for treatment of metabolic disorders are composed by carbon-chains with an even-number of carbons. Recently triheptanoin, a medium odd-chain triglyceride of enantiomeric fatty acid (heptanoate, C7:0) has been used in the treatment of mitochondrial disorders of long-chain fatty acids and pyruvate carboxylase deficiency as an additional fuel for metabolic reactions ^[9,10]. Triheptanoin effects on central nervous system however, have not been evaluated yet. KD effects on frequency of seizures are well documented ^[3, 6, 8, 14, 15]. In epileptic rats KD has a major effect reducing frequency of seizures which signalize a positive effect in reducing neuronal activity. However, it has not been studied if KD composed by triheptanoin could play a role on other conditions

that interfere with cerebral electrical activity as cortical spreading depression (CSD).

CSD is characterized by a reduction of spontaneous electrical brain activity evoked by mechanical, electrical or chemical cortical stimulation. A burst of neuronal electrical activity similar to that found in epileptic EEG occurs during the initial phase of CSD. Following this, spontaneous brain electrical activity is depressed and this EEG depression spreads slowly all over the brain cortical surface at a rate of 2 - 5 mm/min ^[16]. A slow potential change can be recorded during CSD propagation as well as a higher glucose consumption ^[17] and ion translocation ^[18]. Mechanisms that underlie CSD propagation are until now unknown but it has been well documented increases of glutamate and K⁺ in extra cellular space during its propagation ^[19, 18] Furthermore, it has been demonstrated that changes of brain excitability similar to that found in epilepsy can change CSD characteristics. In fact, altered neuronal excitability in the pilocarpine model of epilepsy has been associated with reduced CSD velocity and frequency ^[20] and one can suppose that KD, which interferes with brain excitability, could also play a role in CSD propagation.

The effects of triheptanoin, an odd-medium-chain triglyceride of promising use in the treatment of rare metabolic disorders, have been the object of interest of our research group. Consequently, it was hypothesized that a KD rich in triheptanoin could represent an optional source of metabolic fuel to the brain that would be metabolized faster than long-chain triglycerides providing significant changes of amino acid pool neurotransmitters and consequently brain electrical activity. On the other hand, brain mechanisms underlying long-term KD effects are not well-known. The aim of this study is to evaluate in young rats the effects of

short-term and long-term KD composed by medium- or long- chain fatty acids on CSD propagation.

METHODS

Animals and diets

The use of rats in these experiments was approved by the local University Animal Care and Use Committee (no.010077/2005-51) and was in accordance to the European Communities Council Directives (86/609/EEC) regarding care and use of animals for experimental procedures. Animals were housed in a temperature-controlled room maintained at $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ with a 12:12-h light-dark cycle (lights on at 6h a.m.).

On postnatal day 21, littermates were weaned, housed individually in metabolic cages and divided into six experimental groups. Three of them were submitted to the dietary treatment for only 10 days (short-term treatment; $n=5$ for control and KD groups) and the other 3 groups were treated for 7 weeks (long-term treatment; $n=10$ for control and KD groups).

The 3 experimental diets used were: (i) control diet (C), consisting of AIN-93 growth diet (lipid:protein+carbohydrate 1:11,8) ^[21]; (ii) MCT KD rich in triheptanoin oil (lipid:protein+carbohydrate 3,5:1) or (iii) LCT KD rich in soybean oil (lipid:protein+carbohydrate 3,5:1). Water and food were provided for all animals *ad libitum* and their body weights were recorded on the day of the CSD electrophysiological recording. Except for carbohydrate and lipid proportion all other nutrients were similar to the control diet as shown in table 1.

Table 1- Constituents of the control and ketogenic diets

Constituent (g/Kg)	Control	Ketogenic diets	
		MCT	LCT
Corn starch	495,9	0	0
Dextrinized corn starch	132	0	0
Casein	200	200	200
Cellulose	50	50	50
Mineral mixture AIN-93 G	35	35	35
Vitamina mixture AIN-93	10	10	10
<i>L</i> -Cysteine	3	3	3
<i>L</i> -Methionine	1,6	1,6	1,6
Choline bitartrate	2,5	2,5	2,5
<i>t</i> -Butylhydroquinone	0,014	0,14	0,14
Soybean oil	70	40	297,9
Triheptanoïn	0	257,9	0
Margarine	0	400	400

All diet constituents, except for corn starch, soybean oil and margarine, were purchased from Rhoster (São Paulo, Brazil) and triheptanoïn was purchased from stéarinerie Dubois (Le Blanc, France).

CSD recording

Electrophysiological recordings were performed on the day after the end of the dietary treatment, i.e., at 33 and 71 days of life in the short-term and long-term treatment groups, respectively. On the recording day, after 12 h fasting animals were weighed and intraperitoneally anesthetized with a mixture of urethane+chloralose (1,000 mg/kg+40 mg/kg) and three holes (2mm diameter) were drilled on the right side of the skull (two at the parietal and one at the frontal bone). Plastic tubes (tips with 0.5mm of internal diameter) containing Ag-AgCl, agar-ringer electrodes were placed on the parietal cortical surface to record the slow potential change occurring during CSD, against a reference electrode placed on the frontal bones. CSD was elicited each 20 min by applying a cotton pledget soaked with 2% KCl for 1 min, and its propagation was recorded on a chart paper apparatus (Ugo Basile, Italy) for 3h. The velocity of CSD propagation was calculated based on the distance between the recording points and the time spent for a CSD “front wave” to cross this distance. We used the initial ascendant point of it wave to calculate CSD velocities. All the electrophysiological studies were realized between 8:00 and 12:00h to avoid possible changes on CSD velocity due to circadian rhythms.

Blood analysis of glucose, cholesterol and electrolytes

In the long-term treatment groups, at the end of the CSD recording session, with the animal still deeply anesthetized, samples of total blood were collected from the retro-orbital plexus and centrifuged at 3,500 x g, for 20 min. Blood

glucose and cholesterol (total, VLDL, LDL and HDL fractions) were measured using specific spectrophotometric methods (Dimension AR spectrophotometer, Dade Behring Inc. Newark, USA). Blood concentration of Na⁺ and K⁺ were performed by photometric method as well (Flame photometer FC-180 - cia. equipadora de laboratórios modernos - CELM - Barueri - São Paulo, Brazil, SP). All the analysis was performed at Unidade Laboratorial de Alagoas- UNILAB.

Statistical analysis

CSD velocities, body weight, blood glucose, cholesterol, and electrolytes were averaged from each group and were analyzed by one- or two-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test.

RESULTS

Long-term MCT KD resulted in a significant reduction of body weight compared to control group as follows: control (n=8), 173.7 ± 29.1g; MCT KD (n=9) 123.3 ± 30.86g and LCT KD (n=10) 166.30 ± 54.16g.

Animals feed for 7 weeks (long-term treatment) with both KDs showed no significant differences in the blood levels of Na⁺, K⁺, glucose, triglyceride and VLDL among the three experimental groups (Table 2). However, MCT group showed increased levels of cholesterol when compared with the LCT group (P<0.05), but both ketogenic diets didn't differ significantly from control group. MCT group revealed higher levels of LDL when compared with control and LCT group (P<0.05) and the last didn't differ significantly from control group.

Table 2 - Blood analysis of glucose, cholesterol and electrolytes

	Control (n=8)	Ketogenic diets	
		MCT (n=9)	LCT (n=10)
Glucose (mg/dl)	136 ± 11.86	167.43 ± 56.54	152.25 ± 22.91
Triglycerides (mg/dl)	77.5 ± 28.5	105.17 ± 42.22	108.12 ± 30.04
Cholesterol (mg/dl)	74.67 ± 15.13 ^{a,b}	97.5 ± 47.82 ^a	62.12 ± 2.76 ^b
HDL (mg/dl)	34.5 ± 11.8	35.4 ± 8.26	30.12 ± 12.4
VLD (mg/dl)	15.5 ± 5.7	20.15 ± 8.55	21.62 ± 7.61
LDL (mg/dl)	31.4 ± 9.89 ^a	87.4 ± 59.26 ^b	17.63 ± 11.77 ^a
Na⁺ (mEq/dl)	138.33 ± 2.16	135.17 ± 3.87	138 ± 3.35
K⁺ (mEq/dl)	5.68 ± 0.54	6.1 ± 0.36	5.98 ± 0.86

[†] Values are the mean ± SD

Different letters on the same line: values differ significantly by ANOVA one way plus Tukey HSD test (P<0,05).

The topical application of 2% KCl for 1 min at one point of the frontal cortex elicited a single CSD wave that propagated to the two recording points without interruption. ANOVA showed a significant main effect of dietary treatment (P=0.0015) and interaction treatment x duration (P=0.0051). Furthermore, *post-hoc* comparisons showed that rats that received a short-term KD presented a significant reduction on cortical spreading depression velocity when compared to control group (MCT, P = 0.0013 and LCT, P = 0.0288). In addition, only short-term MCT group mean CSD velocity was significantly lower than long-term control (P=0.00534) and LCT (P=0.0459) groups as shown at figure 1. However, long-term KD didn't change velocity of propagation of CSD when compared to control group. Considering each dietary treatment separately the effect of exposure time was not detected.

The CSD propagation velocities for the long-term control group were equal to 3.10 ± 0.41 mm/min, MCT group 2.91 ± 1.62 mm/min and LCT group 3.02 ± 2.26 mm/min. Regarding the short-term animals the CSD means were: control group

equal to 4.02 ± 1.04 mm/min, MCT group 1.62 ± 1.92 mm/min and LCT group 2.26 ± 0.41 mm/min.

In the MCT KD young group KCl stimulation failed to elicit CSD in 50% of rats, while in the LCT KD animals no KCl failure in eliciting CSD was observed.

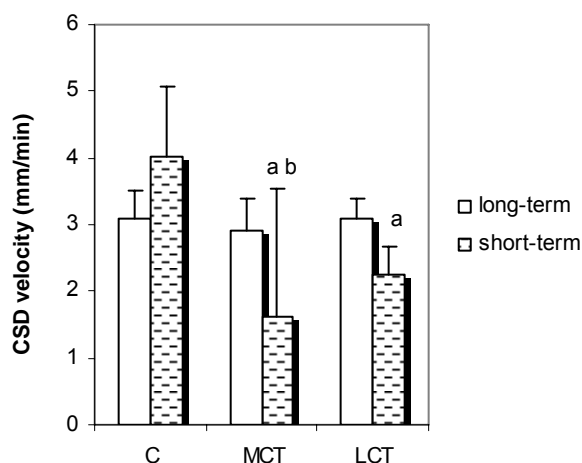


Figure 1 - Cortical SD velocities of propagation (mm/min) in the six experimental groups: short-term (n=5) and long-term (n=8) control groups (C); short-term (n=4) and long-term (n=9) medium-chain triglyceride groups (MCT); and short-term (n=4) and long-term (n=10) long-chain triglyceride groups (LCT). The velocity of propagation was significantly reduced in both short-term KDs groups; MCT short-term had lower velocities compared to long-term control and LCT animals. Bars represent the mean value \pm standard deviation of each group. ^a significantly different from the short-term control group; ^b different from the control and LCT KD long-term groups ($P < 0.05$; ANOVA followed by Tukey HSD test).

Discussion

Glucose is the main energetic fuel used by the brain. Moreover, in some conditions brain can use monocarboxylates as lactate, betahydroxybutyrate (BHB) and acetoacetate as metabolic substrates. According to Leino et al. endothelial expression of monocarboxylate transporter 1 at blood-brain barrier of adult rats can be induced by KD, suggesting that delivery of energetic fuels to the brain can be regulated by nutritional conditions ^[22].

Blood glucose levels of animals feed with KD show controversial results. Yudkoff et al. ^[23] and Cheng et al. ^[24] demonstrated that blood glucose levels were diminished after KD use for 5 and 7 days, respectively. Melø et al. ^[25] found higher blood glucose levels in rats after 21 days of KD treatment whereas Leino et al. ^[22] showed a biphasic change of glycemia, which was low at the beginning of KD use and highest after 21 days. Our results showed that after 7 wks of KD use rats did not exhibited significant changes of blood glucose levels. This could be explained by a possible mechanism of adaptation to the low carbohydrate content of diet which could induce an increase of ketone bodies utilization for metabolic reactions. In fact, Yudkoff et al. ^[23] demonstrated that brain of ketotic rats metabolize preferentially acetate to glucose. Similarly, during fasting it was observed in humans an important uptake of BHB and acetoacetate by the brain. These ketone bodies could replace glucose as energetic fuel leading to a reduction of glycolysis and neoglycogenesis during ketosis adaptation ^[24].

KD is used for the treatment of epilepsy especially in children with no response to antiepileptic drugs. Clinical studies didn't reveal a correlation between age of KD treatment onset and its efficacy ^[6,8,27,28]. Meydell et al. ^[28], Freeman et al. ^[6] and Copolla et al. ^[8] demonstrated that 8-12 years children that used KD

showed a tendency to reduce seizures frequency. Moreover, beyond this age it is more difficult to control diet consumption in teenagers and KD use for epilepsy treatment is not well accepted ^[11].

In rats, contrast to humans, age of KD onset is relevant. Bough et al. ^[29] verified an inverse rapport between age of KD onset and BHB blood levels as well as seizure resistance. Su et al ^[30] used KD during 6 weeks beginning 2 or 14 days after inducing an epilepticus status with kainic acid in rats, verifying that animals whose initiated diet after 14 days did not present protection against recurrent seizures when compared to those that initiated the diet 2 days after epilepticus status. Regarding CSD velocity, the age of the animals is remarkable, since it was observed that younger rats have higher CSD velocities which range from 3-4 mm/min ^[31] compared to adults.

In pups rat brain glucose utilization is lower compared to BHB at postnatal age of 21. After weaning brain glucose metabolism increases about 97% in all brain regions^[32]. In our long-term KD study rats started to receive KD after weaning until adult age when they were submitted to CSD stimulation. In these animals both KD had no effects on CSD velocity, possibly because after 7 weeks of KD use brain of adult rats (which usually relays to a glycolitic metabolism at postnatal age 21) exhibit a lower ability to metabolize ketone bodies compared to younger animals. In fact, when we submitted younger animals to KD during 10 days we could observe a significant reduction of CSD velocity compared to control group. This change in the propagation velocity of CSD can be attributed to an effect of diet, independent of the type of lipid source used, MCT or LCT. Different from the expected, no significant differences were observed between the short- and long-term groups that received the same type of diet. However, in the

comparison of the two groups studied (short- and long- term KDs) it was verified that the CSD velocity of the MCT short-term group was significantly lower than control and LCT long-term groups. We suggest that the ketogenic diets can interfere at the velocity of spreading depression, namely at the short-term group. Interactions between the variables dietary treatment and duration of treatment must have contributed to the results observed.

Therefore, reduction of CSD velocities found at our no caloric restricted short-term KD can be attributed to an effect of high long or medium-chain triglycerides diet on cortical spreading depression propagation. Bough et al ^[33] demonstrated that rats submitted to a normal calorie-restricted or a ketogenic calorie restricted diet for 4 weeks had never exhibited spreading depression after cortical electrical stimulation, showing a possible inhibitory effect of calorie restriction on CSD propagation. In our younger ketogenic animals a significant reduction of CSD velocity was observed after 10 days of KD treatment demonstrating a particular effect of long- and medium-chain triglycerides on brain excitability. In this manner, a time that both the KD were equally efficient in reducing the propagation velocity of CSD, our results demonstrated that triheptanoin can constitute an alternative in ketogenic therapy

The role that high levels of blood ketone bodies plays as a major element in decreasing or suppressing of seizures still remain uncertain. Bough et al ^[29] and Eagles et al ^[34] verified that a low caloric diet can improve resistance against seizures, with low blood ketone bodies levels. Yudkoff et al ^[35] demonstrated that low dietary calories and low dietary glucose decreased seizures severity, induced by pentylenetetrazole in rats. Bough et al ^[36] did not found relation between BHB levels and seizures threshold. Thus, we may conjecture that an increase of blood

ketone bodies levels can not be a restrictive factor in order to obtain positive results of ketogenic diet in controlling seizures crisis.

We verify in our results that there were an increased in the levels of LDL in MCT group when compared whit control and LCT group, but we can not affirm that higher LDL blood levels could play a role on the velocity of CSD since the relation between LDL blood levels and velocity of CSD was not significant ($r = -0,138$; n.s)

In the context of a classic ketogenic diet, we had similar results as obtained by Bough et al ^[29] and Su et al ^[30] concerning to decreasing of cerebral excitability, with no use of any proconvulsant test. Moreover, we conclude that the effect of this diet is remarkable, since using lower magnitude stimulation (2% KCl) than those used in proconvulsive tests we are able to show a KD effect on brain excitability. Furthermore, we were able to demonstrate for the first time that triheptanoin has a positive effect in decreasing brain cerebral excitability in young animals submitted to a short-term KD dietary treatment.

Acknowledgments

This work was supported by the governmental research foundation of Alagoas state (FAPEAL no. 20040930206-2). Marcela Oliveira was a Master's fellowship recipient from the Brazilian agency CAPES. We are grateful to Dr Publio Barbosa for his technical assistance to biochemical essays, to Dr Rubem Guedes for helpful comments and discussions and to Dr Cyro Rego Cabral Júnior for his contribution on statistical analysis.

References

- [1] W.G Lennox, *Epilepsy and related disorders*, Little e Brown & Co, Vol. 1. J& A Churchil LTD. London, 1961 pp 13-14.
- [2] W.G Lennox, *Epilepsy and related disorders*, Little e Brown & Co, Vol. J& A Churchil LTD. London, 1961 pp 736, 826-829.
- [3] E. H. Kossof, P. L. Pyzik, J. R. McGrogan, E.P.G. Vinning, J.M. Freeman, Efficacy of the ketogenic diet for infantile spasms. *Pediatrics*. 109 (2002) 780-783
- [4] J. Freeman, P. Veggiotti, G. Lanzi, A. Tagliabue, E. Perucca, The ketogenic diet: from molecular mechanisms to clinical effects. *Epilepsy research*. 68 (2006) 145-180
- [5] C.E. Stafstrom, Dietary approaches to epilepsy treatment: old and new options on the menu. *Epilepsy Currents*. 4 (2004) 215-222
- [6] J.M. Freeman, E.P.G. Vining, D.J. Pillas, P.L Pyzik, J.C Casey, M.T Kelly, The efficacy of the ketogenic diet - 1998: a prospective evaluation of intervention in 150 children, *Pediatrics*. 102 (1998a) 1358–1363.
- [7] A. M. Hassan, D.L. Keene, S.E. Whiting, S.E. Jacob, J.R. Champagne, P. Humphreys, Ketogenic diet in the treatment of refractory epilepsy in childhood, *Pediatr Neurol*. 21 (1999)548-552.
- [8] G. Coppola, P. Veggiotti, R. Cusmai, S. Bertoli, S. Cardinali, C. Dionisi-Vici, M. Elia, M.L. Lispi, C. Sarnelli, A. Tagliabue, C. Toraldo, A. Pascotto, The ketogenic diet in children, adolescents and young adult with refractory epilepsy: an Italian multicentric experience, *Epilepsy Research*. 48 (2002) 221–227.

- [9] C.R Roe, L. Sweetman, D.S. Roe, S. David, H. Brunengraber, Treatment of cardiomyopathy and rhabdomyolysis in long-chain fat oxidation disorders using an anaplerotic odd-chain triglyceride, *J. Clin. Invest.* 110(2002) 259-269.
- [10] F. Mochel, P. DeLonay, G. Touati, H. Brunengraber, R.P. Kinman, D. Rabier, C.R. Roe, J. Saudubray, Pyruvate carboxilase deficiency: clinical and biochemical response to anaplerotic diet therapy. *Molecular Genetics and Metabolism* 84(2005) 305-312.
- [11] E.P.G. Vining, Clinical efficacy of the ketogenic diet. *Epilepsy Research.* 37 (1999) 181–190.
- [12] G. Magrath, A. Macdonald, W. Whitehouse, Dietary practices and use of the ketogenic diet in the UK. *Seizure.* 9(2000) 128–130.
- [13] J. Carrol, D. Koenigsberger, The ketogenic diet: a practical guide for caregivers. *Journal of the American Dietetic Association.* 98(1998) 316-321
- [14] C. Hemingway, J. M. Freeman, D.J. Pillas, P. L. Pyzyk, The ketogenic diet: 3- to 6- year follow-up of 150 children enrolled prospectively. *Pediatrics* 108(2001) 898-905.
- [15] M. Dahlin, A. Elfving, U. Ungerstedt, P. Amark, The ketogenic diet influences the levels of excitatory and inhibitory amino acids in the CSF in children with refractory epilepsy, *Epilepsy Research* 64(2005) 115-125.
- [16] A.A.P. Leão, Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *Neurophysiol* 7 (1944) 359-390
- [17] A. Gjedde, A. J. Hansen, B. Quistorff, Blood-brain glucose transfer in spreading depression, *J. Neurochem.* 37 (1981) 807-812

- [18] B.Grafstein, Mechanisms of spreading cortical depression, *J. Neurophysiol.* 19 (1956) 154-171.
- [19] R.J. Do Carmo, H. Martins-Ferreira, Spreading Depression of Leão probed with ion-selective microelectrodes in isolated chick retina, *An Acad. Brasil. Cienc.* 56 (1984) 402-421
- [20] R.R.G. Costa-Cruz, A. Amâncio-dos-Santos, R.C.A. Guedes, Characterization of cortical spreading depression in adult well-nourished and malnourished rats submitted to the association of pilocarpine-induced epilepsy plus streptozotocin-induced hyperglycemia, *Neuroscience Letters.* 401(2006) 271-275
- [21] P. G. Reeves, Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J. Nutrition.* 127(1997) 838S-841S
- [22] R.L. Leino, D.Z. Gerhart, R. Duelli, B.E. Enerson, L.R. Drewes, Diet-induced ketosis increases monocarboxylate transporter (MCT1) levels in rat brain. *Neurochemistry International* 38(2001) 519-527.
- [23] M. Yudkoff, Y. Daikhin, I. Nissim, O. Horyn, A. Lazarow, B. Luhovyy, S. Wehrli, I. Nissim, Response of brain amino acid metabolism to ketosis, *Neurochemistry International* 47 (2005) 119–128.
- [24] C.M. Cheng, B. Kelley, J. Wang, D. Strauss, D.A. Eagles, C. A. Bondy, A ketogenic diet increases brain insulin-like growth factor receptor and glucose transporter gene expression, *Endocrinology* 144(2003) 2676-2682.
- [25] T.M. Melø, A. Nehlig, U. Sonnewald, Neuronal-glia interactions in rats fed a ketogenic diet. *Neurochemistry International.* 48 (2006) 498–507.

- [26] O.E. Owen, A. P. Morgan, H. G. Kemp, J.M. Sullivan, M. G. Herrera, G.F. Jr Cahill, Brain Metabolism during Fasting, *The Journal of Clinical Investigation*. 46 (1967) 1589-1595.
- [27] A. M. Hassan, D.L. Keene, S.E. Whiting, P.J. Jacob, J.R. Champagne, P. Humphreys, Ketogenic diet in the treatment of refractory epilepsy in childhood. *Pediatr Neurol*. 21(1999) 548-552.
- [28] B.V. Maydell, E. Wyllie, N. Akhtar, P. Kotagal, K. Powaski, K. Cook, A. Weinstock, A. D. Rothner, Efficacy of the ketogenic diet in focal versus generalized seizures. *Pediatr. Neurol*. 25(2001) 208-212.
- [29] K.J. Bough, R. Valiyil, F.T. Han, D.A Eagles, Seizure resistance is dependent upon age and calorie restriction in rats fed a ketogenic diet, *Epilepsy Research*. 25(1999) 21-28.
- [30] S.W. Su, M.R. Cílio , Y. Sogawa, D. Silveira, G.L. Holmesa, C.E. Stafstroma, Timing of ketogenic diet initiation in an experimental epilepsy model, *Developmental Brain Research*.125(2000)131-138.
- [31] A.P. Rocha-de-Melo, J.B. Cavalcanti, A.S. Barros, R.C.A. Guedes, Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and adulthood, *Nutritional Neuroscience*. 9(2006) 155-160.
- [32] A. Nehlig, Age-dependent pathways of brain energy metabolism: the suckling rat, a natural model of the ketogenic diet. *Epilepsy Research*. 37(1999) 211-221
- [33] K.J.Bough, P.A. Schwartzkroin, J.M. Rho, Calorie Restriction and ketogenic diet diminish neuronal excitability in rat dentate gyrus in vivo, *Epilepsia*. 44(2003) 752-760.

- [34] D.A. Eagles, S.J. Boyd, A. Kotak, and F. Allan, Calorie restriction of a high-carbohydrate diet elevates the threshold of PTZ-induced seizures to values equal to those seen with a ketogenic diet, *Epilepsy Research*. 54(2003) 41-52
- [35] M. Yudkoff, Y. Daikhin, I. Nissim, O. Horyn, B. Luhovyy, A. Lazarow, I. Nissim, Short-term fasting, seizure control and brain amino acid metabolism, *Neurochemistry International*. 48(2006) 650-656.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através da exposição dos principais mecanismos de redução da excitabilidade cerebral provocados pela dieta cetogênica, a intenção deste trabalho foi de explorar mais uma possível alternativa de tratamento a pacientes com desordens na excitabilidade cerebral, a exemplo da epilepsia.

Encontramos em nossos resultados uma redução significativa da velocidade de propagação da Depressão Alastrante Cortical apenas nos animais que receberam as dietas cetogênicas a curto prazo. Desta forma, concluímos que a idade do animal durante o tratamento pode interferir no seu resultado, independente do tipo de dieta cetogênica utilizada (TCL ou TCM).

O uso da trienantina como alternativa terapêutica para redução da excitabilidade cerebral apresentou uma forte tendência de maior eficiência na redução da atividade elétrica cerebral em relação à dieta cetogênica clássica, neste sentido, mais estudos ainda devem ser feitos para confirmação da mesma.

Em virtude das características metabólicas particulares da trienantina, principalmente o fato de ser anaplerótica e gliconeogênica, resta uma questão a ser futuramente resolvida, já que estas características podem influenciar a cetogênese como fator imprescindível para redução da atividade elétrica cerebral. O fato da oxidação da trienantina gerar mais rapidamente duas moléculas de acetilCoA, o qual contribui para cetogênese, e uma molécula de propionil CoA, que contribui com a gliconeogênese, seria interessante investigar qual sistema seria mais favorecido, visto que a velocidade de síntese de ambas as moléculas é grande e que é possível haver redução da atividade elétrica cerebral nas duas situações.

Assim, visto que a eficiência da dieta cetogênica rica em trienantina na redução da atividade elétrica cerebral foi comprovada, muito estudos ainda devem ser realizados a fim de esclarecer seus principais mecanismos de ação na redução da excitabilidade cerebral, ampliando desta forma a possibilidade de sua utilização como terapia não farmacológica à pacientes com epilepsia, dentre outras doenças afins.

REFERÊNCIAS

3 REFERÊNCIAS

1. Bough K. J., Gudi K., Han F.T., Alyssa H. Rathod A.H., Eagles D.A. An anticonvulsant profile of the ketogenic diet in the rat. *Epilepsy Research* 2002; 50: 313-325.
2. Bough K. J., Valiyil R., Han F. T., Eagles D.A. Seizure resistance is dependent upon age and calorie restriction in rats fed a ketogenic diet. *Epilepsy Research*. 1999; 35: 21–28.
3. Bough K.J., Yao S.G., Eagles D.A. Higher ketogenic diet ratios confer protection from seizures without neurotoxicity. *Epilepsy Research*. 2000; 38:15-25.
4. Carrol J, Koenigsberger D. The ketogenic diet: a practical guide for caregivers. *Journal of the American Dietetic Association*. 1998; 98(3): 316-321.
5. Cheng C.M., Kelley B., Wang J., Strauss D., Eagles D.A., Bondy C. A. A ketogenic diet increases brain insulin-like growth factor receptor and glucose transporter gene expression. *Endocrinology*.2003; 144(6): 2676-2682.
6. Coppola G., Veggiotti P., Cusmai R., Bertoli S., Cardinali S., Dionisi-Vici C., Elia M., Lispi M.L., Sarnelli C., Tagliabue A., Toraldo C., Pascotto A. The ketogenic diet in children, adolescents and young adult with refractory epilepsy: an Italian multicentric experience. *Epilepsy Research*. 2002; 48: 221–227.
7. Dahlin M., Elfving A., Ungerstedt U., Amark P. The ketogenic diet influences the levels of excitatory and inhibitory amino acids in the CSF in children with refractory epilepsy. *Epilepsy Research*. 2005; 64: 115-125.

8. Eagles D.A., Boyd S. J., Kotak A., Allan F. Calorie restriction of a high-carbohydrate diet elevates the threshold of PTZ-induced seizures to values equal to those seen with a ketogenic diet. *Epilepsy Research*. 2003; 54: 41–52.
9. 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.
10. Freeman, J.M., Vining, E.P.G., Pillas, D.J., Pyzik, P.L., Casey, J.C., Kelly, M.T. The efficacy of the ketogenic diet - 1998: a prospective evaluation of intervention in 150 children. *Pediatrics*. 1998a; 102, 1358–1363.
11. Greene A.E., Todorova M. T., McGowan R., Seyfried T.N. Caloric restriction inhibits seizure susceptibility in epileptic El Mice by reducing blood glucose. *Epilepsia*. 2001; 42(11): 1371-1378.
12. Harney J.P., Madara J., Madara J., l'Anson H. Effects of acute inhibition of fatty acid oxidation on latency to seizure and concentrations of hydroxybutyrate in plasma of rats maintained on calorie restriction and/or the ketogenic diet. *Epilepsy Research*. 2002; 49: 239–246.
13. Hassan A. M., Keene D.L., Whiting S.E., Jacob P.J., Champagne J.R., Humphreys P., Ketogenic diet in the treatment of refractory epilepsy in childhood. *Pediatr Neurol*. 1999; 21:548-552.
14. Hemingway, C., Freeman, J. M., Pillas, D.J., Pyzyk, P. L. The ketogenic diet: 3- to 6- year follow-up of 150 children enrolled prospectively. *Pediatrics*. 2001; 108; 898-905.

15. Kossof E. H., Pyzik P. L., McGrogan J. R., Vinning E.P.G., Freeman J.M. Efficacy of the ketogenic diet for infantile spasms. *Pediatrics*. 2002; 109: 780-783.
16. Leão, A.A. P. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *Neurophysiol*. 1944; 7: 359-390.
17. Leino R.L., Gerhart D.Z., Duelli R., Enerson B.E., Drewes L.R. Diet-induced ketosis increases monocarboxylate transporter (MCT1) levels in rat brain. *Neurochemistry International* 2001; 38: 519-527.
18. Lennox, W.G. *Epilepsy and related disorders*. Little & Brown. J&A Churchill LTD. London. 1961; Vol.1 p. 13-14.
19. Lennox, W.G. *Epilepsy and related disorders*. Little & Brown. J&A Churchill LTD. London. 1961; Vol.2; 736, 826-829.
20. Likhodii S.S., Burnham. Ketogenic diet: does acetone stop the seizures? *Med. Sci. Monit*. 2002; 8 (8): HY19-24.
21. Magrath G., Macdonald A., Whitehouse W. Dietary practices and use of the ketogenic diet in the UK. *Seizure*. 2000; 9: 128–130.
22. Marten B., Pfeuffer M., Schrezenmeir J. Medium-chain triglycerides. *International Dairy Journal*. 2006; 16: 1374-1382.
23. Maydell B.V., MD, Wyllie E., Akhtar N., Kotagal P., Powaski K., Cook K., Weinstock A., Rothner A. D. Efficacy of the ketogenic diet in focal versus generalized seizures. *Pediatr. Neurol*. 2001; 25: 208-212.
24. Melø T.M., Nehlig A., Sonnewald U. Neuronal-glia interactions in rats fed a ketogenic diet. *Neurochemistry International*. 2006; 48: 498–507.
25. Mochel, F., DeLonay, P., Touati, G., Brunengraber, H., Kinman, R.P., Rabier, D., Roe, C.R., Saudubray, J. Pyruvate carboxylase deficiency:

- clinical and biochemical response to anaplerotic diet therapy. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2005; 84: 305-312.
26. Musa-Veloso K., Rarama E., Comeau F., Curtis R., Cunnane S. Epilepsy and the ketogenic diet: assessment of ketosis in children using breath acetone. *Pediatric Research*. 2002; 52(3): 443-448.
27. Nebeling L.C., Lerner E. Implementing a ketogenic diet based on medium-chain triglyceride oil in pediatrics patients with cancer. *Journal of the American Dietetic Association*. 1995; 95(6): 693-697.
28. Nehlig A. Age-dependent pathways of brain energy metabolism: the suckling rat, a natural model of the ketogenic diet. *Epilepsy Research*. 1999; 37; 211-221.
29. Owen O.E., Morgan A. P., Kemp H. G., Sullivan J.M., Herrera M. G., Cahill G.F. Jr. Brain Metabolism during Fasting. *The Journal of Clinical Investigation*. 1967; 46(10): 1589-1595.
30. Reeves, P. G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J. Nutrition*. 1997; 127: 838S-841S.
31. Stafstrom C.E. Dietary approaches to epilepsy treatment: old and new options on the menu. *Epilepsy Currents*. 2004; 4 (6): 215-222.
32. Su S.W., M. Cilio M.R., Sogawa Y., Silveira D., Holmes G.L., Stafstrom C.E. Timing of ketogenic diet initiation in an experimental epilepsy model. *Developmental Brain Research*. 2000; 125:131–138.
33. Thavendiranathan P., Chow C., Cunnane S., Burnhama W.M. The effect of the 'classic' ketogenic diet on animal seizure models. *Brain Research* 2003; 959: 206–213.

34. Thavendiranathan P., Mendonca A., Dell C., Likhodii S.S., Musa K., Iracleous C., Cunnane S.C., Burnham W. M. The MCT ketogenic diet: effects on animal seizure models. *Experimental Neurology*. 2000; 161: 696-703.
35. Vining E.P.G., Clinical efficacy of the ketogenic diet. *Epilepsy Research*. 1999; 37: 181–190.
36. Yudkoff M., Daikhin Y., Nissim I., Grunstein R., Nissim I. Effects of ketone bodies on astrocyte amino acid metabolism. *J. Neurochem*. 1997; 69: 682-692.
37. Yudkoff M., Daikhin Y., Nissim I., Horyn O., Lazarow A., Luhovyy B., Wehrli S., Nissim I. Response of brain amino acid metabolism to ketosis. *Neurochemistry International* 2005; 47: 119–128.
38. Yudkoff M., Daikhin Y., Nissim I., Horyn O., Luhovyy B., Lazarow A., Nissim I. Short-term fasting, seizure control and brain amino acid metabolism. *Neurochemistry International*. 2006; 48: 650-656.