



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Thais Oppenheimer Pitanga de Rezende

**ANÁLISE DA CORRELAÇÃO ENTRE DESCARGAS
EPILEPTIFORMES NO EEG INTERICTAL DE PACIENTES COM
EPILEPSIA GENERALIZADA IDIOPÁTICA E A CONECTIVIDADE
FUNCIONAL CEREBRAL**

Dissertação de mestrado apresentado ao
programa de Programa de Pós-Graduação em
Fisiopatologia em Clínica Médica da Faculdade de
Medicina de Botucatu, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Orientador: Prof. Associado. Luiz Eduardo Gomes Garcia Betting

**Botucatu
2020**

Thais Oppenheimer Pitanga de Rezende

**ANÁLISE DA CORRELAÇÃO ENTRE DESCARGAS EPILEPTIFORMES
NO EEG INTERICTAL DE PACIENTES COM EPILEPSIA
GENERALIZADA IDIOPÁTICA E A CONECTIVIDADE FUNCIONAL
CEREBRAL**

Dissertação de mestrado apresentado ao programa de Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Orientador: Prof. Associado Luiz Eduardo Gomes Garcia Betting

Botucatu
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Rezende, Thais Oppenheimer Pitanga de.

A Análise da correlação entre descargas epileptiformes no EEG interictal de pacientes com epilepsia generalizada idiopática e a conectividade funcional cerebral / Thais Oppenheimer Pitanga de Rezende. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Luiz Eduardo Gomes Garcia Betting
Capes: 40101002

1. Cérebro - Doenças. 2. Cérebro - Radiografia.
3. Eletroencefalografia. 4. Epilepsia.

Palavras-chave: Complexos espícula-onda lenta generalizados; Conectividade funcional; Epilepsias generalizadas idiopáticas.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Luiz Eduardo G G Betting pelo aprendizado

A colega de profissão Karen Fernanda Alves, pelos momentos compartilhados

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Neurologia, Psiquiatria e Psicologia, Adriano, Geraldo e Vanessa pela colaboração e pela amizade.

A todos aqueles que porventura não foram citados, mas que direta ou indiretamente auxiliaram neste trabalho.

RESUMO

Complexos espícula-onda lenta generalizados (CEOLs) são a marca registrada das epilepsias generalizadas idiopáticas (EGI). A conectividade funcional cerebral está prejudicada nesses pacientes, indicando uma disfunção tálamo-cortical. O impacto dos CEOLs na conectividade funcional no repouso pode ser útil para uma melhor compreensão dos mecanismos por trás das EGI. 20 pacientes com EGI (13 mulheres, idade média 34.7 ± 10 , 20-51) foram estudados. Todos os sujeitos foram submetidos à RNM de 3T. Imagens estruturais (T1) e sequências BOLD durante o repouso foram obtidas. A ferramenta Conn foi utilizada para estimar o mapa de correlações para cada indivíduo. A conectividade funcional baseada em sementes de toda a substância cinzenta e do tálamo foram calculadas. EEG interictal foi obtido no mesmo dia. Para cada paciente, o primeiro componente generalizado de cada CEOL foi selecionado e mapas das descargas epileptiformes foram extraídos com o algoritmo CLARA. Imagens funcionais e os mapas de atividade epileptiforme foram coregistrados e suavizados (figura 1). Então foi realizada uma análise de correlação voxel a voxel utilizando o modelo linear generalizado (GLM). Esta análise foi feita entre os mapas de conectividade em repouso da substância cinzenta e do tálamo, e os mapas de atividade epileptiforme no EEG. 158 CEOLs foram obtidos (média 7.9 ± 7.9 , 1 - 26). A análise de toda a substância cinzenta mostrou correlações negativas. O principal cluster foi localizado no giro frontal superior (98 mm^3 , $p = 0,032$). Análises do tálamo mostraram áreas posteriores com correlações positivas (88 mm^3 , cúneo, $p = 0.018$) e áreas anteriores com correlações negativas (60 mm^3 , giro frontal médio, $p = 0.044$). Em pacientes com EGI, áreas corticais responsáveis pela geração de CEOLs interictais foram correlacionadas com a conectividade funcional de repouso. O padrão foi heterogêneo, mas a conectividade funcional das áreas cerebrais anteriores foram correlacionadas negativamente com os mapas de atividade no EEG.

Palavras-Chaves: Complexos espícula-onda lenta generalizados (CEOLs). Epilepsias Generalizadas Idiopáticas (EGI). Conectividade Funcional.

ABSTRACT

Generalized spike and wave discharges (GSWDs) are the hallmark of idiopathic generalized epilepsies (IGE). MRI functional connectivity is impaired in these patients indicating thalamo cortical dysfunction. Impact of GSWD in the resting state functional connectivity may be useful for a better comprehension of the mechanisms behind IGE. 20 patients with IGE (13 women, mean age 34.7 ± 10 , 20-51) were investigated. All subjects were submitted to 3T MRI. Structural T1 images and fMRI BOLD time series during rest were obtained. Conn toolbox was used to estimate correlation maps for each subject. Seed-based functional connectivity of the whole gray matter and the thalamus were calculated. Interictal EEG was recorded in the same day. For each patient, first generalized components from all GSWDs were selected, averaged and the source was extracted with CLARA algorithm included in the BESA software. Functional and source images were coregistered and smoothed. Finally, for the whole group, voxel-wise correlation analysis was conducted between gray matter and thalami functional resting state images and EEG source maps using generalized linear model (GLM). 158 GSWDs were obtained (mean 7.9 ± 7.9 , 1-26). Analysis of the whole gray matter showed mainly negative correlations. Main cluster was localized in the superior frontal gyrus (98mm^3 , $p=0.032$). Analysis of the thalamus disclosed posterior areas of positive correlations (88mm^3 , cuneus, $p=0.018$) and anterior areas of negative correlations (60mm^3 , middle frontal gyrus, $p=0.044$). In patients with IGE, cortical areas responsible for interictal GSWDs generation were correlated with resting state functional connectivity. The pattern was heterogeneous but functional connectivity of anterior brain areas were anticorrelated with the EEG sources. This observation may be critical for a better interpretation of EEG-fMRI and resting state functional connectivity analysis.

Keywords: Generalized spike and wave discharges (GSWDs). Idiopathic Generalized Epilepsies (IGE). Functional Connectivity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplo de descarga generalizada do tipo predominante espícula-onda lenta regular (entre as linhas verticais vermelhas).	21
Figura 2. Mapas das descargas epileptiformes (imagem do foco) e de correlação / conectividade cerebral de pacientes com epilepsia generalizada idiopática. Média dos resultados obtidos sobreposta em um modelo tridimensional colorido de acordo com as escalas abaixo.....	28
Figura 3. Resultados da análise de correlação entre os mapas de localização das descargas epileptiformes generalizadas interictais e os mapas de conectividade de 3 regiões de interesse. A escala de cores abaixo da figura corresponde ao valor estatístico (r).....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados da análise de correlação entre os mapas de localização das descargas epileptiformes generalizadas interictais e os mapas de conectividade de 3 regiões de interesse. (substância cinzenta, tálamo direito e tálamo esquerdo) com todos os demais voxels	30
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

BOLD	Sinal Blood Oxygen Level Dependent
CEOL	Complexo espícula-onda lenta
EEG	Eletroencefalograma
EGI	Epilepsias generalizadas idiopáticas
EMJ	Epilepsia mioclônica juvenil
FAE	Fármaco antiepilético
FLAIR	Imagens de ressonância magnética - Fluid-attenuated inversion recovery
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GLM	Modelo linear geral
RM	Ressonância magnética
ROI	Região de interesse

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Quadro clínico	12
1.1.1 Ausência da Infância	13
1.1.2 Ausência da juventude	13
1.1.3 Epilepsia mioclonica Juvenil	13
1.1.4 Crises tônico clônicas isoladas.....	14
1.2 Neurofisiologia	15
1.3 Fisiopatologia.....	15
1.4 Estudos de conectividade funcional	16
2 JUSTIFICATIVA.....	18
3 OBJETIVOS	19
3.1 Hipótese principal.....	19
3.2 Objetivos gerais	19
3.3 Objetivos específicos	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Seleção dos sujeitos	20
4.2 Localização das descargas epileptiformes generalizadas	21
4.3 Ressonância magnética.....	23
4.4 Forma de análise dos resultados	25

4.4.1 Ressonância magnética	25
4.4.2 Análise de conectividade	25
5 RESULTADOS	27
5.1 Dados clínicos e de EEG	27
5.2 Correlação entre conectividade funcional e localização das descargas epileptiformes generalizadas interictais	29
6 DISCUSSÃO	32
7 CONCLUSÃO	34
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
ANEXO A.....	39

1 INTRODUÇÃO

A epilepsia é uma desordem do cérebro caracterizada por uma predisposição duradoura para gerar crises epiléticas e pelas consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais dessa condição. A definição de epilepsia requer a ocorrência de pelo menos uma crise epilética (Fisher et al., 2017).

A Epilepsia generalizada idiopática (EGI) corresponde a 20-40% das epilepsias, apesar de sua frequência, essa patologia se mantém subdiagnosticada. As EGIs são subdivididas em subtipos. As subsíndromes são divididas de acordo com idade de instalação e tipo de crise: ausência da infância e juventude, epilepsia mioclônica juvenil e crises tônico clônicas isoladas (Betting et al., 2006).

1.1 Quadro clínico

A principal manifestação clínica das epilepsias são as crises epiléticas. A interpretação da semiologia das crises epiléticas junto com o exame de eletroencefalograma (EEG) permite a classificação das epilepsias em diversas síndromes epiléticas (Fisher et al., 2017; Scheffer et al., 2017). Sob esta ótica, as epilepsias podem ser divididas em epilepsias focais e epilepsias generalizadas, entre as quais a epilepsia mioclônica juvenil (EMJ), a epilepsia ausência juvenil e as crises tônico e clônicas generalizadas.

1.1.1 Ausência da Infância

Ocorre precocemente na infância, com pico de incidência entre 4 a 7 anos. Pode ocorrer antes ou depois destas idades, porém o início é geralmente antes dos 10 anos de idade. É caracterizada por crises de ausência típica, como único tipo de crise. Ausências típicas duram de 4 a 30 segundos, com episódios de vagaos (perda de consciência e períodos de irresponsividade) com comprometimento de consciência associado e início e fim abruptos e sem sintomas de pós ictal. Podem haver automatismos associados, podem acontecer frequentemente chegando a mais de 100 em um dia, podem ser induzidas por hiperventilação por 3 a 4 minutos e o exame físico tende a ser normal (Koutroumanidis et al., 2005).

1.1.2 Ausência da juventude

Ocorre dos 7 aos 16 anos, com pico de início de 10 a 12 anos. As crises predominantes são de ausência. Podem acontecer muitas vezes ao dia, mas tipicamente não é tão frequente quanto a ausência infantil. Automatismos são mais frequentes, principalmente os periorais e automatismos de mão. Raramente podem ocorrer crises tônico clônicas generalizadas e crises mioclônicas (Koutroumanidis et al., 2005).

1.1.3 Epilepsia mioclônica Juvenil

Uma síndrome comum que pode ocorrer dos 8 aos 26 anos, com pico dos 12 aos 16. É caracterizada por 3 tipos de crises: abalos mioclônicos (tipicamente aos acordar ou quando o paciente está muito cansado), crises tônico clônico generalizadas e

ausências típicas. Crises mioclônicas são súbitas, afetam braços, pernas, face ou corpo. Crises tônico clônicas generalizadas, ocorrem em dois terços dos pacientes, e são mais comuns pela manhã, especialmente quando o paciente acorda mais cedo que o usual. Um terço dos pacientes sofrem com ausências típicas, que são mais comuns pela manhã. Fatores precipitantes para todos os tipos de crise são: fadiga, privação de sono, consumo de álcool e 40% dos pacientes são fotossensíveis. O exame clínico é normal (Koutroumanidis et al., 2005).

1.1.4 Crises tônico clônicas isoladas

Paciente com esta síndrome apresentam crises tônico clônicas isoladas. De início na adolescência, porém pode ocorrer na vida adulta. Tendem a ocorrer de 1 a 2 horas após o despertar. E os fatores desencadeantes são similares aos epilepsia mioclônica juvenil (Koutroumanidis et al., 2005).

1.2 Neurofisiologia

Paciente com EGI, independente do tipo, possuem achados típicos no EEG. Consistem em achado do complexo espícula-onda lenta (CEOL) e poliespícula onda, síncronas, generalizadas. Sendo a atividade de base do EEG normal. (Betting et al., 2006).

1.3 Fisiopatologia

A fisiopatologia da EGI envolve anormalidade na ligação da circuitaria tálamo cortical. A forma que o tálamo ativa o córtex em pacientes afetados pela epilepsia gera a presença de crises e descargas no EEG. Vários receptores envolvidos na gênese do problema têm sido estudados. O mais conhecido é o canal de Cálcio do Tipo T. Seu defeito desencadeia as crises de ausência (Chang & Lowenstein, 2003).

Desde a década de 40 o tálamo é considerado uma das principais regiões envolvidas no mecanismo das EGI. As primeiras hipóteses levavam em conta especialmente o achado eletroencefalográfico. Desta forma, acreditava-se que o tálamo seria responsável pelo aumento da sincronia inter-hemisférica causando as crises (Penfield & Jasper, 1954). Entretanto, especialmente após o surgimento de modelos animais, a interação entre tálamo e córtex passou a ser vista como fundamental na origem das descargas generalizadas (Gloor, 1968). Mais recentemente, estes estudos experimentais geraram fortes evidências de que o córtex é fundamental na gênese das crises. O envolvimento talâmico seria na realidade secundário, porém com importante

participação na manutenção das crises (Meeren et al., 2002). A ativação deste circuito ocorre de forma habitual durante o sono (Chang & Lowenstein, 2003).

Entretanto, uma falha neste mecanismo faz com que a ativação cortical que normalmente existe durante o sono ocorra durante a vigília. Deste modo, as EGI são ocasionadas por uma falha no mecanismo de manutenção do ciclo sono-vigília modulado pelo circuito tálamo-cortical (Chang & Lowenstein, 2003).

Estudos recentes vêm mostrando que descargas epiléticas generalizadas podem ser localizadas em determinadas regiões como giro frontal superior, a nível de hemisfério é mais comum em hemisfério direito, que na maioria das pessoas, é o dominante. (Jun et al., 2019)

Já estudos de volumetria com paciente com EGI evidenciaram atrofia na região rostral do giro frontal médio, cúneo e giro frontal superior esquerdo que pode que e giro precentral. (Ding-mei et al., 2019).

1.4 Estudos de conectividade funcional

A RM funcional é capaz de quantificar alterações hemodinâmicas locais de forma não invasiva constituindo-se uma técnica poderosa na localização de regiões cerebrais durante uma condição experimental. Estas alterações hemodinâmicas estão relacionadas ao chamado sinal BOLD (“Blood Oxygen Level Dependent”). O sinal BOLD, na realidade, é um sinal bastante complexo controlado por diversos parâmetros dependentes não só da oxigenação sanguínea, mas também de todo fluxo sanguíneo e volume cerebral (Ogawa et al., 1998). Este sinal reflete um aumento no fluxo sanguíneo

cerebral que ocorre para suprir a demanda cerebral de oxigênio durante uma determinada tarefa (Fox et al., 1988).

Durante a RM funcional adquirida em repouso, existem flutuações de baixa frequência do sinal BOLD. As regiões que apresentam estas flutuações são definidas como redes do estado de repouso e provavelmente refletem alguma forma de conectividade entre sistemas neuroanatomicos distintos (Fox & Raichle, 2007). Deste modo, a RM funcional em repouso auxilia na avaliação da integração entre múltiplos sistemas cerebrais.

2 JUSTIFICATIVA

A epilepsia é um dos transtornos neurológicos mais comuns no mundo, afetando 50 milhões de pessoas, 5 milhões na região das américas (OMS, 2019). As EGIs correspondem a até um terço das epilepsias. Deste modo o melhor conhecimento da fisiopatologia deste grupo de doenças é fundamental para o seu tratamento mais adequado.

O efeito das descargas epileptiformes generalizadas nas redes em repouso ainda não é conhecido. Recentemente, a disfunção da conectividade entre múltiplas regiões cerebrais é considerada como característica principal das epilepsias.

3 OBJETIVOS

3.1 Hipótese principal

A conectividade cerebral de pacientes com EGI avaliada por meio da RM funcional em repouso pode apresentar modulação pelas descargas epileptiformes generalizadas interictais.

3.2 Objetivos gerais

Investigar a fisiopatologia e a conectividade funcional dos pacientes com EGI.

3.3 Objetivos específicos

Investigar as relações entre a conectividade cerebral dos pacientes com EGI e a distribuição elétrica das descargas epiléticas generalizadas interictais obtidas por meio do EEG

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi submetido ao comitê de ética em pesquisa local. Todos os indivíduos assinaram termo de consentimento livre e esclarecido.

4.1 Seleção dos sujeitos

O presente estudo avaliou de forma prospectiva 20 pacientes com EGI. Os pacientes foram selecionados no Ambulatório de Epilepsia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB-UNESP) por meio da história clínica e do exame neurológico. Estes pacientes, estavam há pelo menos 6 meses com ausência de crises epiléticas.

Indivíduos com suspeita de EGI foram submetidos ao EEG interictal de rotina em aparelho Nihon Kohden (Tóquio, Japão) de 32 ou 64 canais. Os exames foram realizados utilizando o sistema 10-20 com dois eletrodos temporais anteriores para melhor cobertura das regiões temporais. Todos os registros interictais foram feitos com pelo menos 20 minutos incluindo fotoestimulação e hiperpnéia. A taxa de amostragem foi de 1000Hz e a impedância foi mantida abaixo de 10K Ω .

Os exames foram analisados por meio da avaliação visual convencional utilizando o programa Neurofax QP-112AK (versão 6-91, Nihon Kohden) que é fornecido com o aparelho de EEG e utilizado na rotina. Exames com atividade epileptiforme generalizada típica (figura 1) foram analisados de forma quantitativa.

Figura 1. Exemplo de descarga generalizada do tipo predominante espícula-onda lenta regular (entre as linhas verticais vermelhas).



4.2 Localização das descargas epileptiformes generalizadas

A análise quantitativa do EEG foi realizada por meio do programa BESA Research 6.0 (Gräefelfing, Alemanha). A localização das descargas generalizadas (solução inversa) foi feita por meio de metodologia conhecida como indeterminada (Pascual-Marqui et al., 1994). Os algoritmos são baseados na reconstrução da atividade elétrica cerebral em cada ponto de uma grade tridimensional de pontos de

solução, o número de pontos é bem maior que o número de pontos medidos na superfície (eletrodos). Cada ponto de solução é considerado como possível localização de uma fonte geradora de corrente, não havendo hipótese prévia sobre o número de dipolos no cérebro. O algoritmo utilizando nesta avaliação foi o chamado Classical LORETA Analysis Recursively Applied (CLARA). Esta técnica realiza a distribuição das imagens mais focalmente aplicando a solução de maneira iterativa. A matriz espacial em cada passo de iteração contém contribuições que refletem a imagem obtida no passo anterior. Ocorre, portanto, uma redução implícita do espaço em cada iteração. Primeiramente, uma imagem LORETA regularizada é computada. Depois em cada iteração, as seguintes ações são realizadas: suavização, redução a zero de todos os pontos com amplitudes menores que um limite de 1% da atividade com efetiva eliminação dos mesmos do espaço no passo seguinte. Após um número de iterações específico, a imagem da última iteração é mostrada (Pascual-Marqui et al., 1994).

No programa BESA, selecionamos a primeira espícula interictal generalizada para cada indivíduo, para melhor localização do início do paroxismo epiléptico. Os dados de cada paciente foram promediados quando possível (mais de uma descarga) e filtrados entre 5 e 35 Hz. Uma aproximação realística de um modelo anatômico para pacientes adultos foi utilizada para ajustar e mostrar a localização dos resultados. Usando a análise de componentes principais, a porção ascendente da média das descargas foi selecionada. Uma localização de dipolo equivalente foi gerada para cada indivíduo e as coordenadas de Talairach resultantes foram extraídas para análise (Talairach & Tournoux, 1988). Para o método CLARA, as coordenadas de Talairach também foram extraídas do local anatômico contendo a densidade máxima de corrente. A solução foi exportada como imagens tridimensionais ANALYZE de 1 milímetro.

4.3 Ressonância magnética

Os pacientes foram submetidos ao exame de RM. Para isto utilizamos aparelho MAGNETON® de 3 Tesla (Siemens, Verio, Erlangen, Alemanha) com bobina de 12 canais.

As imagens foram adquiridas no formato DICOM (Digital Imaging and Communications in Medicine) e em seguida convertidas para o formato NIfTI (Neuroimaging Informatics Technology Initiative) com o auxílio do programa MRICron (Rorden & Brett, 2000).

Todos os sujeitos foram submetidos ao exame de RM de alta resolução seguindo um protocolo específico para avaliação das epilepsias. Neste protocolo foram incluídos:

- *Short T1 inversion recovery* (STIR; espessura do corte, 2,2 mm; campo de visão (FOV), 180 mm; matriz, 230 × 256; tempo de repetição (TR), 2100 ms; tempo de eco (TE), 9,5 ms; tempo de inversão (TI), 499 ms; ângulo, 150 graus; tempo de aquisição, 3,36 min);
- *T2 periodically rotated overlapping parallels lines with enhanced reconstruction* (BLADE; espessura do corte, 2,2 mm; FOV, 180 mm; matriz, 230 × 256; TR, 4000 ms; TE, 135 ms; ângulo, 120 graus; tempo de aquisição, 3,22 min).
- *Fluid Attenuated Inversion Recovery* (FLAIR) Axial com 4,0 mm de espessura; ângulo de excitação 150°; TR, 9000 ms; TE, 80 ms; TI, 2500 ms; matriz, 208 x 256 e FOV 220 mm.

Para avaliação estrutural da substância cinzenta cerebral a sequência volumétrica tridimensional T1 foi selecionada:

- *Magnetization Prepared Rapid Gradient Echo T1 sequences* (MPRAGE; 192 cortes sagitais; espessura do corte, 1 mm; resolução, $0,5 \times 0,5$ mm; FOV, 256 mm; matriz, 256×256 ; TR, 2300 ms; TE, 2,47 ms; TI, 1100 ms; ângulo, 9 graus; tempo de aquisição, 5,21 min por volume).

Para análise de conectividade funcional, as imagens foram adquiridas com o indivíduo em repouso e orientado para permanecer de olhos abertos e fixos no teto do scanner. Esta sequência foi a primeira a ser obtida para evitar a fadiga e maximizar a colaboração do indivíduo:

- *Echo Planar Imaging* (EPI); 36 cortes; 3,0 mm de espessura; resolução de 3×3 mm; FOV, 192 mm; matriz, 64×64 mm; TR, 3000 ms; TE, 30 ms; tempo de aquisição, 6,08 min; número total de volumes, 120; ângulo de excitação, 90° .

Deste modo, os principais critérios de inclusão foram: a) Pacientes com história clínica, exame neurológico e EEG interictal de rotina compatíveis com EGI; c) Desejo de participar da presente pesquisa; d) Ausência de contraindicações para realização do exame de RM.

Como critérios de exclusão: a) Desejo de sair do estudo; b) Indivíduos durante a investigação apresentem diagnóstico de outros tipos de epilepsia ou crises não epiléticas; c) Indivíduos com dupla patologia.

É importante salientar que o EEG, foi realizado imediatamente após o exame de ressonância magnética, para que fosse evitado artefato devido à pasta condutora.

4.4 Forma de análise dos resultados

4.4.1 Ressonância magnética

A análise visual qualitativa dos exames de RM foi feita por dois investigadores independentes com experiência em neuroimagem e epilepsia.

4.4.2 Análise de conectividade

Para análise de conectividade funcional, foi utilizado o programa CONN versão 17 (Functional Connectivity Toolbox; Whitfield-Gabrieli & Nieto-Castanon, 2012) associado ao SPM12 (www.fil.ion.ucl.ac.uk), rodando sobre a plataforma Matlab R2012b (MathWorks; Natick, Estados Unidos da America).

As imagens estruturais T1 volumétricas foram registradas no espaço padrão do Montreal Neurological Institute - International Consortium for Brain Mapping (MNI - ICBM; Collins et al., 1995) e as substâncias branca e cinzenta segmentadas com a abordagem conhecida como segmentação unificada utilizando o algoritmo DARTEL (Diffeomorphic Anatomical Registration Through Exponentiated Lie Algebra; Ashburner, 2007).

O processamento das imagens funcionais consistiu em realinhamento, correção temporal e para artefatos de movimento, normalização (ICBM) e suavização espacial com filtro de 4,0 mm (largura à meia altura; Full Width at Half Maximum). As imagens funcionais de cada sujeito foram registradas com a sequência volumétrica T1. Em

seguida as imagens foram submetidas a um algoritmo para redução de ruído que aplica regressão linear e filtragem para remoção de artefatos fisiológicos e outros efeitos artefatuais que poderiam ser confundidos com o sinal BOLD. Para cada sujeito análise de três regiões de interesse (ROI) foram utilizadas: substância cinzenta, tálamo direito e tálamo esquerdo. Estas estruturas foram selecionadas com base no mecanismo das EGIs. A extração dos mapas de conectividade foi feita por meio de um modelo linear geral (GLM) para medidas ponderadas de regressão / correlação entre as séries temporais e as áreas de interesse. Neste caso, estes mapas representam o nível de conectividade funcional entre o ROI (média de todos os voxels contidos) e todas as localizações no cérebro (voxel individual).

Para avaliação das descargas generalizadas, os mapas de localização das descargas epileptiformes interictais de cada indivíduo, obtidos por meio do programa BESA, foram realinhados com os mapas de conectividade (individual) utilizando o programa SPM12. Em seguida, após suavização com filtro de 8 mm, análise de correlação foi feita por meio do GLM comparando voxel a voxel os mapas de conectividade (obtidos na etapa anterior) e os mapas de localização das descargas epileptiformes. Para esta última etapa utilizamos o programa BPM sob a plataforma SPM5 (Casanova et al., 2007).

5 RESULTADOS

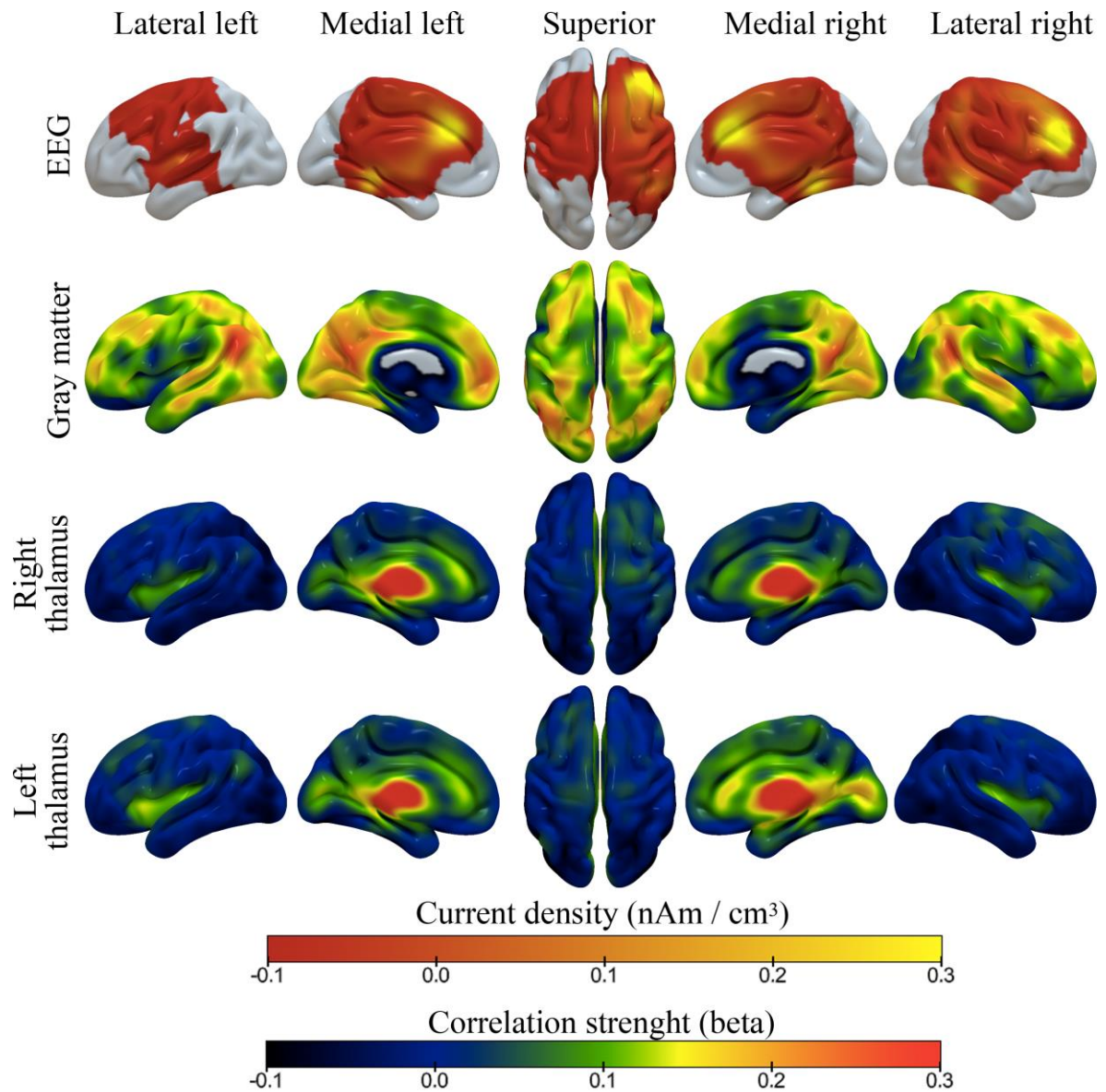
5.1 Dados clínicos e de EEG

20 pacientes apresentaram descargas generalizadas no EEG obtido no dia da RM. Os pacientes apresentaram média de idade de $34,7 \pm 10$ anos (mínimo de 20 - máximo 51), 13 mulheres, média de primeira crise de $10,3 \pm 5,9$ anos (4 -15) e a última crise ocorreu em média $0,8 \pm 1,2$ anos antes da avaliação (0 - 3). Com relação ao diagnóstico, 10 pacientes epilepsia mioclônica juvenil, 5 pacientes apresentavam epilepsia ausência juvenil, e 5 pacientes epilepsia com crises tônico-clônicas generalizadas.

O EEG mostrou total de 158 descargas, média de $7,9 \pm 7,9$ descargas epileptiformes generalizadas por paciente (1 - 26). A média de duração dos exames foi de $21,6 \pm 1,9$ min (19,1 - 25). A maioria dos pacientes apresentou descargas epileptiformes do tipo complexos espícula-onda lenta irregulares (10 pacientes), 4 pacientes complexos espícula-onda lenta regulares, 4 pacientes complexos espícula e poliespícula-onda lenta irregulares e 2 pacientes os 3 padrões anteriores.

A figura 2 apresenta os resultados da análise de localização das descargas epileptiformes interictais e os mapas de conectividade de acordo com as regiões de interesse selecionadas.

Figura 2. Mapas das descargas epileptiformes (imagem do foco) e de correlação / conectividade cerebral de pacientes com epilepsia generalizada idiopática. Média dos resultados obtidos sobreposta em um modelo tridimensional colorido de acordo com as escalas abaixo.



5.2 Correlação entre conectividade funcional e localização das descargas epileptiformes generalizadas interictais

Áreas de correlações positivas e negativas foram observadas. Com toda a substância cinzenta utilizada como ROI foram observadas 4 áreas de correlação (2 positivas e 2 negativas) com o tamanho total de 3212 mm³. A área mais significativa foi de correlação positiva localizada na região temporal superior ($r = +0.69$, $p < 0,0001$). Para o tálamo esquerdo, 5 áreas de correlação foram localizadas (4 positivas e 1 negativa) com tamanho total de 3520 mm³. A área mais significativa foi de correlação positiva localizada no giro lingual ($r = +0.75$, $p < 0,0001$). Finalmente, para o tálamo direito, 9 áreas de correlação foram observadas (5 positivas e 4 negativas) com total de 6158 mm³. A área mais significativa foi de correlação positiva localizada no cerebelo ($r = +0.85$, $p < 0,0001$).

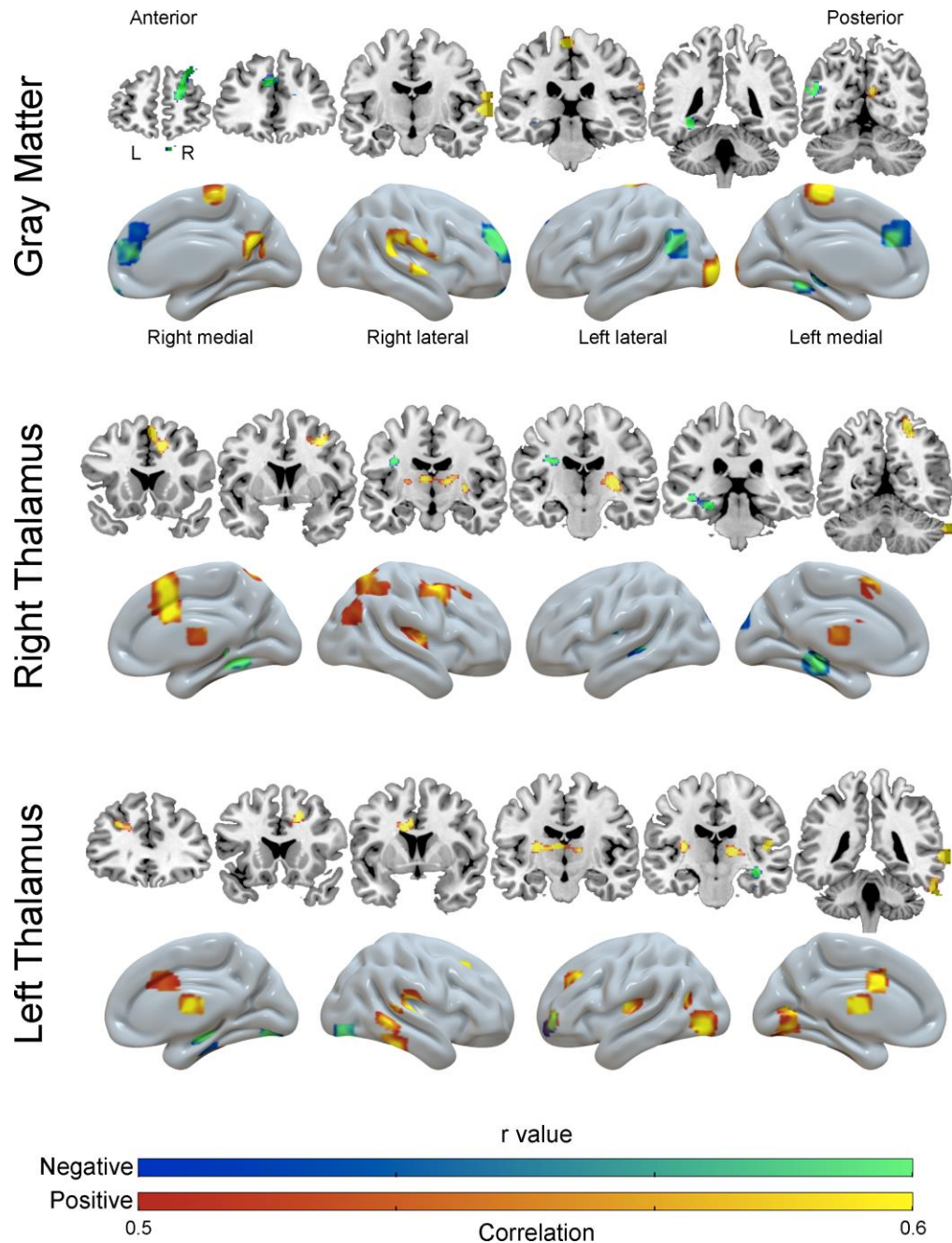
A tabela 1 e a figura 3 detalham os achados acima descritos.

Tabela 1. Resultados da análise de correlação entre os mapas de localização das descargas epileptiformes generalizadas interictais e os mapas de conectividade de 3 regiões de interesse. (substância cinzenta, tálamo direito e tálamo esquerdo) com todos os demais voxels

ROI - region of interest; cluster mm³ - cluster size; p(cor) - p value family wise error corrected; x,y,z {mm} - Montreal Neurological Institute coordinates.

ROI	p(cor)	cluster mm ³	r	Z	x,y,z {mm}	Anatomy
Gray matter	0.000	924	+0.69	3.29	72 -10 4	superior temporal
	0.000	890	+0.67	3.15	-28 -98 -4	inferior occipital
	0.000	972	-0.73	3.57	22 52 26	superior frontal
	0.042	426	-0.62	2.83	-10 34 28	paracingulate
Left thalamus	0.000	1092	+0.75	3.71	-20 -82 6	Lingual
	0.001	550	+0.75	3.67	72 -44 4	middle temporal
	0.000	864	+0.71	3.38	-28 -14 12	Putamen
	0.021	362	+0.68	3.21	60 -40 -32	inferior temporal
	0.018	370	-0.75	3.73	-48 60 0	middle frontal
Right thalamus	0.000	1256	+0.85	4.62	60 -62 -34	cerebellum
	0.000	976	+0.73	3.52	28 -16 4	Insula
	0.000	1422	+0.72	3.48	8 12 30	Cingulate
	0.008	408	+0.66	3.09	58 -74 30	middle temporal
	0.001	518	+0.66	3.08	22 -56 56	precuneus
	0.024	346	-0.68	3.21	32 -44 -4	Lingual
	0.012	384	-0.68	3.18	-28 -18 26	superior insula
	0.004	452	-0.66	3.08	-4 -106 26	occipital pole
	0.010	396	-0.66	3.08	-48 -32 -8	middle temporal

Figura 3. Resultados da análise de correlação entre os mapas de localização das descargas epileptiformes generalizadas interictais e os mapas de conectividade de 3 regiões de interesse. A escala de cores abaixo da figura corresponde ao valor estatístico (r).



6 DISCUSSÃO

De forma didática a dicotomia entre epilepsias generalizadas e focais permanece ainda válida (Panayiotopoulos, 2002; Fisher et al., 2017). O marcador neurofisiológico das EGIs são as descargas epileptiformes generalizadas com atividade de base normal. A fisiopatologia destas descargas observadas em pacientes com EGI permanece em investigação. As principais teorias para a sua origem envolvem duas estruturas fundamentais: o córtex e o tálamo.

Desde a década de 40 o tálamo é considerado uma das principais regiões envolvidas no mecanismo das EGIs. As primeiras hipóteses levavam em conta especialmente o achado eletroencefalográfico. Desta forma, acreditava-se que o tálamo seria responsável pelo aumento da sincronia inter-hemisférica causando as crises (Penfield & Jasper, 1954). Entretanto, especialmente após o surgimento de modelos animais, a interação entre tálamo e córtex passou a ser vista como fundamental na origem das descargas generalizadas (Gloor, 1968). Mais recentemente, estes estudos experimentais geraram fortes evidências de que o córtex é fundamental na gênese das crises. O envolvimento talâmico seria na realidade secundário, porém com importante participação na manutenção das crises (Meeren et al., 2005). A ativação deste circuito ocorre de forma habitual durante o sono (Chang & Lowenstein, 2003). Entretanto, uma falha neste mecanismo faz com que a ativação cortical que normalmente existe durante o sono ocorra durante a vigília. Deste modo, as EGIs são ocasionadas por uma falha no mecanismo de manutenção do ciclo sono-vigília modulado pelo circuito tálamo-cortical (Chang & Lowenstein, 2003).

O presente estudo acrescenta uma informação para este mecanismo hipotético das descargas generalizadas. As descargas generalizadas interictais influenciam de forma crítica os mapas de conectividade. Esta influência está diretamente relacionada com a localização da descarga. A análise dos tálamos mostrou que a conectividade destas estruturas é diretamente proporcional a densidade de corrente do EEG (correlação positiva) nos tálamos e nas regiões frontais mediais. Por outro lado, a substância cinzenta é inversamente correlacionada com as descargas em áreas mais anteriores e diretamente correlacionada em algumas áreas mais posteriores. A interpretação desta análise de correlação não é tarefa fácil. Uma das hipóteses seria que a conectividade dos tálamos estaria aumentada modulada pelas descargas epileptiformes. Já a conectividade cerebral estaria diminuída demonstrando efeito deletério destas descargas em relação ao córtex cerebral.

A metodologia combinada entre EEG e RM funcional pode ser uma interessante alternativa para confirmar e aprofundar os resultados aqui obtidos. Nas EGIs, durante a descarga epileptiforme generalizada ocorre aumento da atividade BOLD no tálamo e redução desta atividade nas regiões frontais medial e lateral, parietal posterior, cíngulo posterior, pré-cuneus, caudado e formação reticular. Esta topografia sugere o envolvimento da rede de modo padrão (van Graan et al., 2015). Nas epilepsias focais este método auxilia na detecção da zona epileptogênica (Khoo et al., 2017). Entretanto, é a realização deste exame é complexa e de custo elevado dificultando sua maior difusão.

7 CONCLUSÃO

Em pacientes com EGI, áreas corticais responsáveis pela geração de complexos espícula-onda lenta interictais foram correlacionadas com a conectividade funcional de repouso.

O padrão foi heterogêneo, mas a conectividade funcional das áreas cerebrais anteriores foram correlacionadas negativamente com os mapas de atividade no EEG.

Essa observação pode ser crucial para melhor interpretação da análise do EEG-RNM e da conectividade funcional de repouso e no entendimento da fisiopatologia da doença.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bernard S. Chang, MD, Daniel H. Lowenstein, MD. Epilepsy. N Engl J Med 2003;349:1257-66.

Betting LE, Mory, Cendes IL, Li ML, et al. EEG features in idiopathic generalized epilepsy: clues to diagnosis. Epilepsia 2006; 47 (3):523-528.

Casanova R, Srikanth R, Baer A, et al. Biological parametric mapping: A statistical toolbox for multimodality brain image analysis. Neuroimage 2007;34(1):137-143.

Chang BS, Lowenstein DH. Epilepsy N Engl J Med 2003;349(13):1257-1266.

Ding-mei Deng, Li-zhou Chen, Yu-wei Li, Ran Long, Guang-cai Tang, Fu-gang Han, Xian-ming Diao, Hong-liang Chen, Zhi-liang Long, Li-hua Qiu. Cortical morphologic changes in recent-onset, drug-naïve idiopathic generalized epilepsy, Magnetic Resonance Imaging, Volume 61, 2019, Pages 137-142.

Fisher, Robert S. et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. 2014. Epilepsia. 2017

Fox PT, Raichle ME, Mintun MA, Dence C. Nonoxidative glucose consumption during focal neurophysiologic neural activity. Science 1988;241:462-464.

Fox MD, Raichle ME. Spontaneous fluctuations in brain activity observed with functional magnetic resonance imaging. Nat Rev Neurosci 2007;8:700-711.

Gloor P. Generalized cortico-reticular epilepsies: some considerations on the pathophysiology of generalized bilaterally synchronous spike and wave discharge. Epilepsia 1968;9:249-263.

Jun, Ye-Hwa & Eom, et al Source localization of epileptiform discharges in childhood absence epilepsy using a distributed source model: a standardized, low-resolution, brain electromagnetic tomography (sLORETA) study. *Neurological Sciences*. 40(Suppl D). 2019

Khoo HM, Hao Y, von Ellenrieder N, Zazubovits N, Hall J, Olivier A, Dubeau F, Gotman J. The hemodynamic response to interictal epileptic discharges localizes the seizure-onset zone. *Epilepsia*. 2017;58(5):811-823.

Koutroumanidis M, Bourvari G, Tan SV. Idiopathic generalized epilepsies: clinical and electroencephalogram diagnosis and treatment. *Expert Rev Neurother*. 2005 Nov;5(6):753-67.

Meeren H, Van Luijtelaar G, Lopes da Silva F, Coenen A. Evolving concepts on the pathophysiology of absence seizures: the cortical focus theory. *Arch Neurol* 2005;62:371-376.

Ogawa S, Menon RS, Kim SG, Ugurbil K. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1998;27:447-474.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). *Epilepsia*. 2019. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_joomlabook&view=topic&id=213>. Acesso em: dez 2019.

Panayiotopoulos, C P. Panayiotopoulos Syndrome: A Common and Benign Childhood Epileptic Syndrome. 2002. John libbey eurotext. Volume 17

Pascual-Marqui, RD, CM. Michel, D. Lehmann, Low resolution electromagnetic tomography: a new method for localizing electrical activity in the brain. *Int J Psychophysiol*, 1994. 18(1): p. 49-65.

Penfield WG, Jasper HH. Epilepsy and the Functional Anatomy of the Human Brain. Boston, Mass: Little Brown & Co, 1954.

Rorden, Chris; Brett, Matthew. Stereotaxic Display of Brain Lesions. Behavioural Neurology. 2000;12(4):191-200.

Scheffer, I.E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M.B., French, J., Guilhoto, L., Hirsch, E., Jain, S., Mathern, G.W., Moshé, S.L., Nordli, D.R., Perucca, E., Tomson, T., Wiebe, S., Zhang, Y.-H. and Zuberi, S.M. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. Epilepsia, 58: 512-521. 2017.

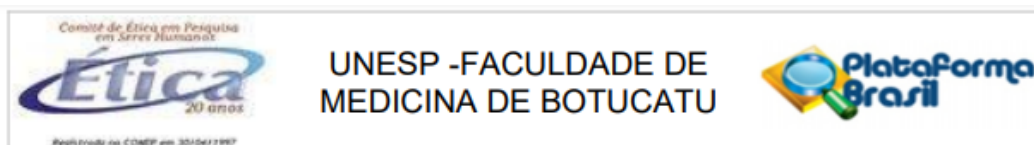
Talairach, J., Tournoux, P. Co-planar stereotaxic atlas of the human brain: 3-Dimensional proportional system: An approach to cerebral imaging. Thieme Medical Publishers, Inc., New York. 1988

Van Graan LA, Lemieux L, Chaudhary UJ. Methods and utility of EEG-fMRI in epilepsy. Quant Imaging Med Surg 2015;5(2):300-312.

Whitfield-Gabrieli S, Nieto-Castanon A. Conn: a functional connectivity toolbox for correlated and anticorrelated brain networks. Brain Connect 2012;2(3):125-141.

Ye-Hwa Jun, Tae-Hoon Eom, Young-Hoon Kim, Seung-Yun Chung, In-Goo Lee & Jung-Min Kim. Source localization of epileptiform discharges in childhood absence epilepsy using a distributed source model: a standardized, low-resolution, brain electromagnetic tomography (sLORETA) study. Neurol Sci 40, 993–1000 (2019).

ANEXO A



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise da correlação entre descargas epileptiformes no EEG interictal de pacientes com Epilepsia Generalizada Idiopática e a conectividade funcional cerebral

Pesquisador: THAIS OPPENHEIMER PITANGA DE REZENDE

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 08078518.0.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento Neurologia, Psicologia e Psiquiatria

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.318.658

Apresentação do Projeto:

A epilepsia generalizada idiopática (EGI) corresponde a 20-40% das epilepsias, apesar de sua frequência, essa doença se mantém subdiagnosticada. EGI são subdivididas em 5 subtipos. As subsíndromes são divididas de acordo com idade de instalação e tipo de crise: ausência da infância e juventude, epilepsia mioclônica Juvenil, crises tônico clônica ao acordar, crises tônico clônica durante o sono, epilepsia generalizada idiopática de início na idade adulta.

A principal manifestação clínica das epilepsias são as crises epiléticas.

O eletroencefalograma (EEG) tipicamente mostra descargas generalizadas com atividade de base normal, tipicamente a ressonância magnética de encéfalo (RME) está normal.

A fisiopatologia envolve uma interação anormal entre o tálamo e o córtex cerebral. A conectividade funcional obtida por meio da RME em repouso é capaz de fornecer importantes dados sobre o funcionamento cerebral normal e a fisiopatologia das doenças. O impacto das descargas epileptiformes generalizadas na conectividade funcional ainda é pouco conhecido.

Sendo assim, para conhecermos um pouco mais da fisiopatologia da EGI, avaliaremos de forma prospectiva 20 pacientes com EGI e 20 indivíduos controles voluntários. Os pacientes serão selecionados no Ambulatório de Epilepsia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP por meio da história clínica e do exame neurológico. Indivíduos com suspeita de EGI serão submetidos ao EEG de rotina para confirmação diagnóstica. O EEG interictal será

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

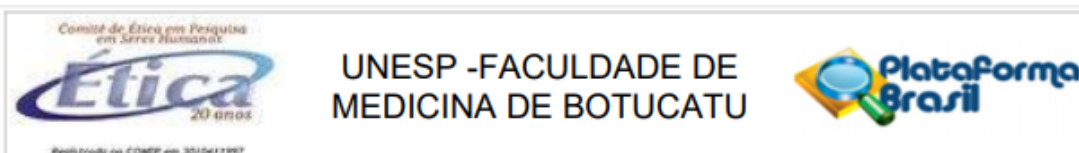
CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 3.318.658

registrado por 20 minutos. Depois de confirmado o diagnóstico e observada a presença de descargas interictais o paciente será submetido à RME.

Os principais critérios de inclusão são: a) pacientes com história clínica, exame neurológico e EEG interictal de rotina compatíveis com EGI; b) desejo de participar da presente pesquisa; c) ausência de contraindicações para realização do exame de RM. E como critérios de exclusão: a) desejo de sair do estudo; b) indivíduos durante a investigação apresentem diagnóstico de outros tipos de epilepsia ou crises não epiléticas; c) indivíduos com dupla patologia.

A sequência BOLD em repouso será utilizada para adquirir os mapas de conectividade funcional. A densidade de descargas serão correlacionada com o padrão de ativação nos mapas funcionais.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivos gerais

O projeto objetiva investigar a fisiopatologia e a conectividade funcional dos pacientes com EGI.

Objetivos específicos

O objetivo específico do projeto é a investigação estrutural e de conectividade do cérebro dos pacientes com EGI e correlação com as descargas epiléticas ao EEG.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O eletroencefalograma é um exame não invasivo, sendo possível, apenas alergias cutâneas a pasta utilizada que são muito raras.

A ressonância magnética também é um exame não invasivo, sem radiação significativa.

A realização destes exames são protocolo na investigação de epilepsia no ambulatório de epilepsia da UNESP, a pesquisa visa apenas associar achados em ambos exames.

Benefícios:

Melhor elucidação da fisiopatologia da doença em questão.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto encontra-se pendente e o pesquisador apresentou adequadamente todas as pendências.

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

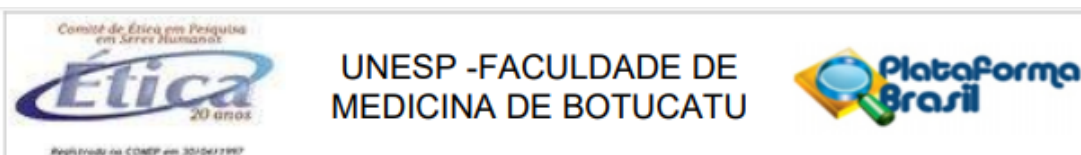
CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 3.318.658

Apresenta objetivos claros, metodologia bem descrita, avaliação de riscos e benefícios, sendo de relevância clínica, pois o estudo permitirá encontrar relação entre as descargas epiléticas e a alteração da conectividade cerebral, e poder relacionar estruturas cerebrais alteradas neste tipo de epilepsia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos de apresentação obrigatória:

- Folha de rosto: preenchida e mantida com o número de 40 participantes da pesquisa;
- Termo de Anuência Institucional: anexado;
- Informações básicas do projeto e projeto completo: adequados e completos. Na metodologia das informações básicas do projeto e do projeto completo, o tamanho amostral foi corrigido para 40 participantes, divididos em dois grupos: 20 pacientes com EGI e 20 indivíduos controles voluntários.
- TCLE: elaborado na forma de convite; escrito em linguagem clara; explica os objetivos da pesquisa e os procedimentos que serão realizados, garante o sigilo dos dados pelos pesquisadores; descreve os benefícios em participar; apresenta telefones e emails dos pesquisadores, e endereço e telefones do Comitê de Ética em Pesquisa da FMB-UNESP. Foi inserido o nome do Professor Orientador do projeto de pesquisa.
- Cronograma de execução: o início do recrutamento dos participantes foi modificado para 30/05/2019, após a aprovação do CEP.

Recomendações:

Apresentar Relatório Final de Atividades ao final da execução da presente pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise em REUNIÃO ORDINÁRIA, o Colegiado deliberou APROVADO o projeto de pesquisa apresentado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberação do Colegiado em REUNIÃO ORDINÁRIA do Comitê de Ética em Pesquisa da FMB/UNESP, realizada em 06 de MAIO de 2019, o projeto analisado encontra-se APROVADO, sem necessidade de envio à CONEP.

No entanto, ao final da execução do projeto de pesquisa, é necessário enviar o "Relatório Final de

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

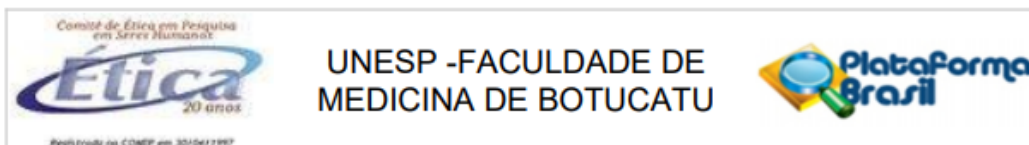
UF: SP

Telefone: (14)3880-1609

Município: BOTUCATU

CEP: 18.618-970

E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 3.318.658

Atividades", na forma de "NOTIFICAÇÃO", via sistema Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1130748.pdf	01/04/2019 13:14:44		Aceito
Outros	carta_resposta.docx	01/04/2019 13:11:41	THAIS OPPENHEIMER PITANGA DE REZENDE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	17/03/2019 21:44:12	THAIS OPPENHEIMER PITANGA DE REZENDE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.pdf	17/03/2019 21:43:49	THAIS OPPENHEIMER PITANGA DE REZENDE	Aceito
Outros	declaracao_hcfmb.pdf	30/01/2019 10:42:07	THAIS OPPENHEIMER PITANGA DE REZENDE	Aceito
Outros	termo_de_anuencia_thais.pdf	24/10/2018 11:00:18	THAIS OPPENHEIMER PITANGA DE REZENDE	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_thais.pdf	24/10/2018 10:58:44	THAIS OPPENHEIMER PITANGA DE REZENDE	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

CEP: 18.618-970

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br



UNESP -FACULDADE DE
MEDICINA DE BOTUCATU



Continuação do Parecer: 3.318.658

BOTUCATU, 10 de Maio de 2019

Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador(a))

Endereço: Chácara Butignolli , s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br