

Análise de variações biológicas em indivíduos com gagueira  
desenvolvimental persistente familiar

**Breila Vilela de Oliveira**

**BOTUCATU – SP**

**2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Análise de variações biológicas em indivíduos com gagueira  
desenvolvimental persistente familiar

**Candidata: Breila Vilela de Oliveira**

**Orientador: Prof. Dr. Danilo Moretti-Ferreira**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Genética).

**BOTUCATU - SP  
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSANGELA APARECIDA LOBO**

Oliveira, Breila Vilela de.

Análise de variações biológicas em indivíduos com gagueira  
desenvolvimental persistente familiar / Emerson Carlos Sarti Ferrasi. –  
Botucatu : [s.n.], 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de  
Bióciências de Botucatu

Orientador: Danilo Moretti-Ferreira

Capes: 20205007

1. Distúrbios da fala. 2. Gagueira. 3. Genética - Pesquisa. 4.  
Ressonância magnética. 5. Fonoaudiologia.

Palavras-chave: Gagueira; Genética; Neuroimagem.

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho...*

*Aos meus pais, **José Roberto e Marilza**, pelo amor, carinho e dedicação. Agradeço pelo incentivo e encorajamento em todos os momentos da minha vida e principalmente em cada etapa desta conquista.*

*Ao meu irmão, **Breno**, pelo amor, amizade e companheirismo.*

*À tia **Rita** (minha segunda mãe), por todo apoio, incentivo e amor. Agradeço cada palavra e atitude que me fizeram chegar até aqui!*

*A todas as **pessoas que gaguejam**, principalmente as que colaboraram com este trabalho.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela minha saúde e pela força para chegar até o fim.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
UNESP – Campus Botucatu, pelo aprendizado.

Ao Instituto de Biociências de Botucatu, sua direção, corpo docente e funcionários.

Ao Departamento de Genética e todos seus funcionários,

Ao Serviço de Aconselhamento Genético

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

À Fundação de para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP) pelo auxílio financeiro concedido para realização dos exames de neuroimagem funcional.

Ao meu orientador Prof. Dr. Danilo Moretti-Ferreira, pelos ensinamentos e confiança, e pela oportunidade deste trabalho.

À Profa. Dra. Cristiane Moço Canhetti de Oliveira, do Departamento de Fonoaudiologia da UNESP de Marília, pelos ensinamentos.

À Profa. Dra. Cláudia Regina Furquim de Andrade e equipe, do Departamento de Fisioterapia, Fonoaudiologia e Terapia Ocupacional da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelos ensinamentos.

Ao meu amigo Gustavo Henrique Vieira, pela amizade e todo apoio neste trabalho.

À Prof. Dra. Regina Helena Garcia Martins pelo auxílio na seleção do grupo amostral.

À TOMOCENTRO – Botucatu, em especial ao Prof. Dr. Altamir Santos Teixeira, pela realização dos exames de neuroimagem funcional.

À minha amiga Larissa Caroline Fialho, por toda ajuda prestada neste trabalho, pelas conversas, risadas e companheirismo em todos os momentos.

À Dra. Deise Helena Souza que sempre estive pronta a me ensinar e auxiliar.

À Ana Carolina Tomaz Tavares, Dharlan Leme e Rosana Aparecida Bicudo da Silva pelo auxílio nas coletas de sangue.

À amigas Camila Oliveira, Michele Faria e Patrícia Sanches pela amizade e momentos de descontração em Botucatu durante esses anos.

Ao meu querido amigo Carlos Eduardo Frigério Domingues, pelas conversas, risadas, e principalmente por toda ajuda prestada, desde o processo seletivo até hoje! Agradeço toda dedicação, sem a qual não poderia ter chegado até o fim.

Aos funcionários da pós-graduação.

A todos os familiares e amigos pela preocupação, apoio e momentos de descontração.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente na conclusão com esse trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	8
ABSTRACT .....	9
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA .....	10
1.1. Fatores genéticos envolvidos com a gagueira .....	10
1.1. Artigo científico.....	10
1.2. Neuroimagem e neurofisiologia na gagueira desenvolvimental persistente familiar.....	24
2. OBJETIVOS.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1. Casuística.....	28
3.1.1. Ética .....	28
3.1.2. Critérios de inclusão .....	29
3.1.3. Critérios de exclusão.....	29
3.2. Avaliação fonoaudiológica.....	30
3.2.1. Entrevista fonoaudiológica .....	30
3.2.2. Diagnóstico de gagueira.....	30
3.3. Avaliação molecular.....	31
3.3.1. Coleta de amostras sanguíneas e purificação do DNA genômico .....	31
3.3.2. Quantificação e qualidade das amostras de DNA genômico .....	32
3.3.3. Sequenciamento do DNA .....	32
3.4. Avaliação de neuroimagem funcional .....	38
3.4.1. Tarefas de Fala.....	38
4. RESULTADOS .....	39
4.1. Resultados da avaliação fonoaudiológica.....	39
4.3. Resultados da avaliação molecular.....	42
4.4. Resultados da avaliação de neuroimagem funcional.....	42
5. DISCUSSÃO .....	50
6. CONCLUSÃO.....	52
7. BIBLIOGRAFIA .....	53
8. ANEXOS .....	57
8.1. Anexo 1 .....	57
8.2. Anexo 2 .....	59
8.3. Anexo 3 .....	61
8.4. Anexo 4 .....	62

## RESUMO

A gagueira é uma desordem da comunicação oral que tem uma característica multidimensional. O modelo exato de transmissão da herança genética para a gagueira ainda não está claramente definida e, provavelmente pode ser diferente entre diferentes famílias e populações. As análises genômicas demonstram, concomitantemente, a relevância dos componentes genéticos envolvidos e sua complexidade, sugerindo assim tratar-se de uma doença poligênica, na qual diversos genes de efeitos variados podem estar envolvidos com o aumento da susceptibilidade de ocorrência da gagueira. Estudos de neuroimagem funcional vêm sendo realizados com indivíduos gagos ao longo dos anos. A Ressonância magnética funcional (RMf), por ser um método não invasivo, é um exame muito utilizado para avaliar as atividades cerebrais no momento de fala. O objetivo deste trabalho foi o de verificar se existem variações biológicas em indivíduos com gagueira desenvolvimental persistente familiar (GDPF) por meio de três métodos de avaliação: fonoaudiológica, genética e de neuroimagem funcional, que foram aplicados em 8 indivíduos adultos do sexo masculino, destros, diagnosticados com GDPF. As avaliações também foram realizadas nos controles, os quais foram pareados por sexo e idade ao grupo amostral. Para a avaliação fonoaudiológica foi utilizada a metodologia proposta por Andrade (2004) e o SSI-3. Todos os participantes tiveram amostras de seu DNA coletados a partir de amostras de sangue periférico. Foi realizado sequenciamento dos éxons do gene *FOXP2*. Para avaliação de neuroimagem funcional foi utilizada a RMf, aplicando-se três tarefas de fala diferentes. Os achados fonoaudiológicos foram distintos em gagos e controles. Os resultados da avaliação genética não apontaram variação biológica entre gagos e controles, já os resultados da RMf mostraram variação entre os dois grupos quanto ao hemisfério e/ou lobo cerebral ativado.

**Descritores:** gagueira desenvolvimental; genética; neuroimagem funcional.

## **ABSTRACT**

Stuttering is a disorder of oral communication that has a multidimensional character. The exact transmission pattern of genetic inheritance for stuttering is still not clearly defined and might probably be different among different families and populations. Genomic analysis have shown, concomitantly, the relevance of the genetic components involved and their complexity, thus suggesting that this is a polygenic disease in which several genes of different effects may be involved with the increased susceptibility of occurrence of stuttering. Functional neuroimaging studies have been conducted with stutterers throughout the years. A magnetic resonance imaging (fMRI), to be a noninvasive method, is a test much used to assess brain activity when speech. The objective of this study was to check whether there are biological variations among individuals with familial persistent developmental stuttering (FPDS) through three methods of evaluation: speech therapy, genetic and neuroimaging data, which were applied in 8 adult male, right-handed diagnosed with FPDS. The evaluations were also performed at the controls, who were the same sex and age of the sample group. For the speech evaluation was used the methodology proposed by Andrade (2004) and SSI-3. All participants had their DNA samples collected from peripheral blood samples. We carried out sequencing of exons of the gene FOXP2. To evaluate functional neuroimaging was used fMRI, applying three different speech tasks. Speech disorders found were different in stutterers and controls. The evaluation results showed no genetic variation between stutterers and biological controls and the results of fMRI showed variation between the two groups in the hemisphere and/or cerebral lobe activated.

**Key words:** Developmental stuttering; genetic; magnetic resonance imaging.

## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. FATORES GENÉTICOS ENVOLVIDOS COM A GAGUEIRA

Com a intenção de estudarmos a literatura sobre a Gagueira desenvolvimental persistente familiar (GDPF) e a genética, realizamos uma vasta revisão bibliográfica. A partir desta revisão, escrevemos um trabalho para divulgação nacional que foi publicado na Revista da Sociedade Brasileira de Fonoaudiologia em Dezembro/2012.

#### 1.1.1. Artigo científico

**Gagueira desenvolvimental persistente familiar: perspectivas genéticas**

*Familial persistent developmental stuttering: genetic perspectives*

**Breila Vilela de Oliveira<sup>1\*</sup>, Carlos Eduardo Frigério Domingues<sup>2\*</sup>, Fabíola Staróbole Juste<sup>3</sup>, Claudia Regina Furquim de Andrade<sup>3</sup>, Danilo Moretti-Ferreira<sup>4</sup>**

(1) Programa de Pós-graduação (Mestrado) em Ciências Biológicas (Genética), Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Botucatu (SP), Brasil.

(2) Programa de Pós-graduação (Doutorado) em Ciências Biológicas (Genética), Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Botucatu (SP), Brasil.

(3) Departamento de Fisioterapia, Fonoaudiologia e Terapia Ocupacional, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo – USP – São Paulo (SP), Brasil.

(4) Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Botucatu (SP), Brasil.

\* Contribuíram com igual relevância para a produção do trabalho.

Trabalho realizado no Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Botucatu (SP), Brasil.

**Financiamento:** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Fundação Lucentis.

**Endereço para correspondência:**

Danilo Moretti-Ferreira

Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, Departamento de Genética, Serviço de Aconselhamento Genético

Distrito de Rubião Júnior S/N, Botucatu (SP), Brasil, CEP: 18618-970.

E-mail: [sag@fmb.unesp.br](mailto:sag@fmb.unesp.br)

**Conflito de interesses:** Não

## RESUMO

A gagueira é uma desordem da comunicação oral que tem uma característica multidimensional. A predisposição biológica no desenvolvimento da gagueira ainda não é bem compreendida, mas contribuições genéticas para esta predisposição são reforçadas tanto por referências à agregação familiar da gagueira, quanto à gagueira familiar, que têm aparecido na literatura há mais de 70 anos. Assim, procuramos estabelecer uma revisão quanto aos prováveis fatores genéticos envolvidos com a manifestação da gagueira desenvolvimental persistente familiar. A identificação de genes relacionados à gagueira, bem como de alterações em suas estruturas (por exemplo, mutações), contribuem significativamente para sua compreensão. O modelo exato de transmissão da herança genética para a gagueira ainda não está claramente definida e, provavelmente pode ser diferente entre diferentes famílias e populações. As análises genômicas demonstram, concomitantemente, a relevância dos componentes genéticos envolvidos e sua complexidade, sugerindo assim tratar-se de uma doença poligênica, na qual diversos genes de efeitos variados podem estar envolvidos com o aumento da susceptibilidade de ocorrência da gagueira. O clínico deverá estar alerta ao fato de que uma criança com histórico familiar positivo para gagueira poderá ter uma forte tendência a desenvolver o distúrbio de forma crônica. É importante que o clínico esteja atento, de modo a fornecer às famílias orientações precisas sobre o distúrbio. As avaliações objetivas e os tratamentos controlados têm um papel muito importante para o domínio da evolução do distúrbio.

**Descritores:** Fonoaudiologia; Fala; Gagueira/etiologia; Genética; Genes; Padrões de herança.

**ABSTRACT**

Stuttering is a disorder of oral communication that has a multidimensional character. The biological predisposition in the development of stuttering is still not well understood, but genetic contributions to this predisposition are enhanced by both references to the familial aggregation of stuttering and to familial stammering, which have appeared in the literature for over 70 years. Thus, we conducted a review as to the likely genetic factors involved in the manifestation of familial persistent developmental stuttering. The identification of genes related to stuttering, as well as alterations in their structures (e.g., mutations), contribute significantly to its understanding. The exact transmission pattern of genetic inheritance for stuttering is still not clearly defined and might probably be different among different families and populations. Genomic analysis have shown, concomitantly, the relevance of the genetic components involved and their complexity, thus suggesting that this is a polygenic disease in which several genes of different effects may be involved with the increased susceptibility of occurrence of stuttering. The clinician should be alert to the fact that a child with positive familial history for stuttering may have a strong tendency to develop the disorder chronically. It is important that the clinician is aware, in order to provide precise information about the disorder to the families. Objective evaluations and controlled treatments play an important role in the knowledge of the disorder's development.

**Keywords:** Speech, language, and hearing sciences; Speech; Stuttering/etiology; Genetics; Genes; Inheritance patterns

**INTRODUÇÃO**

A fala envolve componentes linguísticos (aspectos formais, segmentais) e paralinguísticos (aspectos prosódicos, supra-segmentais), processados por diferentes vias neurais, os quais, integrados e em sincronia, são fundamentais para a constituição de uma fala fluente que deve ter um fluxo contínuo, mantendo-se a sequência, velocidade, ritmo e duração considerados normais para que as unidades fonológicas, lexicais, morfológicas e/ou sintáticas sejam adequadamente produzidas. Quebras ou

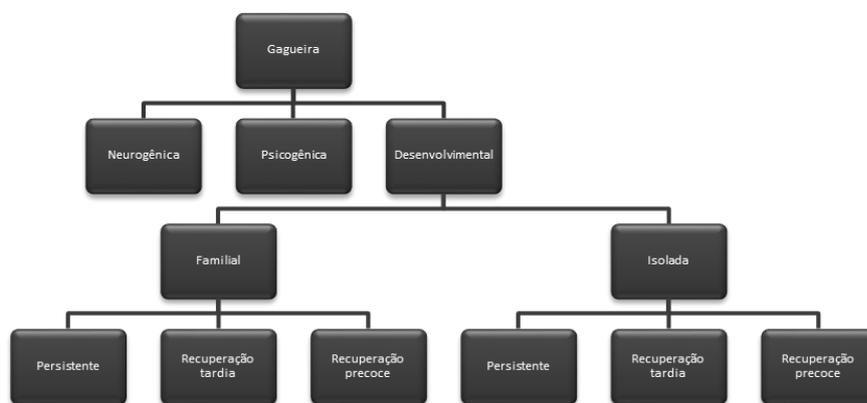
rupturas involuntárias em quaisquer unidades linguísticas caracterizam as disfluências, as quais podem ser consideradas comuns (hesitações; interjeições; revisões; palavras não terminadas; e repetição de palavras, segmentos ou frases) ou gags (repetição de sons ou sílabas; prolongamentos; bloqueios; pausas e intrusão). A gagueira é uma desordem da comunicação oral, complexa que não pode ser considerada como uma entidade nosológica única, pois tem uma característica multidimensional, e é frequentemente experimentada pelo indivíduo como uma perda de controle da própria fala<sup>(1)</sup>.

Durante a infância, devido ao complexo processo de aquisição e desenvolvimento da linguagem, é comum crianças apresentarem disfluências (hesitações, repetição de sons, sílabas ou palavras), tendendo a estabilizar o fluxo de fala ao adquirir maior domínio linguístico-fonológico e morfosintático-semântico-pragmático. Em 80% das crianças essas disfluências são normais e tendem a desaparecer em seis meses, porém em crianças que apresentam fatores predisponentes para a gagueira, essas disfluências poderão evoluir para um quadro crônico conhecido como gagueira desenvolvimental que afeta 5% das crianças, principalmente na faixa etária entre 18 meses a 7 anos, podendo ocorrer até aos 12 anos em alguns casos, com prevalência média de 1% na população. Dentre os fatores de risco para a gagueira desenvolvimental, descritos na literatura, pode-se destacar a idade; o sexo; o tempo de duração das disfluências; a tipologia das rupturas; morbidade pré, peri e pós natal; os déficits de comunicação associados; estresses psicossociais; o histórico familiar positivo para gagueira; e reação da criança, da família e da sociedade frente ao problema<sup>(1)</sup>.

A gagueira também pode se manifestar em outras duas circunstâncias distintas, a partir de lesões, em uma ampla gama de áreas cerebrais, a qual denominamos gagueira adquirida ou neurogênica<sup>(2)</sup> e outra, envolvendo aspectos psicológicos.

A gagueira desenvolvimental é subdividida em: desenvolvimental persistente – presente durante um período igual ou superior a 36 meses após sua manifestação; recuperação tardia - recuperada entre 18 e 36 meses após seu início e recuperação precoce – recuperação antes de 18 meses após a instauração do distúrbio<sup>(3)</sup>. Nos casos

em que há recorrência na família em que dois ou mais indivíduos são acometidos pela gagueira, esta é denominada de desenvolvimental familiar<sup>(4)</sup>, propósito deste trabalho. Nos casos em que há apenas um indivíduo gago na família, denomina-se desenvolvimental isolada. Assim, a classificação da gagueira<sup>(1-4)</sup> pode ser representada esquematicamente (Figura 1).



**Figura 1.** Classificação da gagueira

A predisposição biológica no desenvolvimento da gagueira ainda não é bem compreendida, mas contribuições genéticas para esta predisposição são reforçadas por referências quanto à agregação familiar da gagueira, que têm aparecido na literatura há mais de 70 anos<sup>(5-8)</sup>. Assim, devido aos relevantes e recentes achados científicos, no âmbito biológico, procuramos estabelecer uma revisão quanto aos prováveis fatores genéticos envolvidos com a manifestação da gagueira desenvolvimental persistente familiar e desta forma contribuir com o seu melhor entendimento.

## REVISÃO DE LITERATURA

Os principais argumentos que fundamentam o envolvimento de fatores genéticos na gagueira são: estudos de gêmeos, com maior concordância entre gêmeos

monozigóticos (62,5% a 90%) em relação a gêmeos dizigóticos (6,6% a 9%)<sup>(8-13)</sup>; a agregação familiar, em que as disfluências são mais propensa a se desenvolver em indivíduos consanguíneos, em detrimento aos casos em que não há essa relação<sup>(9,14-16)</sup> e a similaridade fenotípica desenvolvida entre gags, como repetições, prolongamentos de sons e sílabas de palavras sem estarem ligadas a diferenças de língua e cultura<sup>(15,17-19)</sup>.

Desta forma, acredita-se que existam regiões do genoma que carregam informações importantes para o desenvolvimento humano (genes), os quais uma vez alterados (mutados), podem promover pequenas e sutis mudanças na estrutura e função do cérebro<sup>(20-23)</sup>, em indivíduos com gagueira desenvolvimental persistente familiar, o que tem conduzido grupos de pesquisa a realizar amplos estudos genéticos nas últimas décadas.

A gagueira desenvolvimental persistente familiar é considerada uma afecção com padrão de herança complexa ou multifatorial<sup>(24)</sup>. Tal característica é resultado de interações complexas de diversos fatores predisponentes como o genótipo em um ou mais loci e diversos componentes ambientais capazes de ativar, acelerar ou intensificar a manifestação da doença. Estudos de mapeamento gênico, associados a análises estatísticas variadas e complexas, como estudos de associação e análise ligação, têm sido exaustivamente utilizados nos processos de localização e identificação dos loci e alelos especificamente envolvidos que fornecem uma prova definitiva da contribuição genética para a gagueira<sup>(25)</sup>.

A busca de genes que influenciem características complexas tem sido muito mais desafiadora do que os estudos genéticos de traços mendelianos<sup>(26)</sup>. Vários fatores contribuem para este problema, incluindo a heterogeneidade etiológica e genética e, a necessidade de modelos genéticos complexos com muitas variáveis para efeitos de locus, interações gene-gene e gene-ambiente, o que justifica o uso de diversos métodos estatísticos. Um método adequado de análise genética para a gagueira exige uma combinação de passos para a identificação de regiões cromossômicas, nas quais residem as variações genéticas e que caracterizam a etiologia complexa desta doença<sup>(25)</sup>.

O exato modelo de transmissão da herança genética na gagueira ainda não foi bem definido e, além disso, há a possibilidade de ser diferente entre as diferentes populações<sup>(27)</sup>. Há indícios de que exista um gene principal, responsável pelo aumento do risco de ocorrência da gagueira, quando combinado com outros genes<sup>(28)</sup>. Diversos estudos genéticos foram realizados com o objetivo de identificar possíveis regiões e/ou genes relacionados com a afecção (Quadro 1).

**Quadro 1.** Panorama geral dos estudos genéticos publicados.

Região cromossômica	Método	Grupo amostral de disfluentes	Referência
1	Análise de ligação NPL = 1,1	Huteritas *n	Cox N, Yairi E. Genetics of stuttering: insights and recent advances. ASHA leader 5 (16). Bethesda: Amer. Speech Lang. Hear. Association. Abstract. 2000(674).
1	Triagem genômica (análise de ligação)	Paquistaneses n=56 famílias	Riaz N, Steinberg S, Ahmad J, Pluzhnikov A, Riazuddin S, Cox NJ, et. al. Genomewide Significant Linkage to Stuttering on Chromosome 12. Am J Hum Genet. 2005;76(4):647-51.
3q	Triagem genômica (análise de ligação) e estudo de gene candidato <i>DRD3</i> – receptor de dopamine	Paquistaneses n=1 família	Raza; Riazuddin; Drayna <sup>(30)</sup>
5	Triagem genômica (análise de ligação)	Paquistaneses n=56 famílias	Riaz N, Steinberg S, Ahmad J, Pluzhnikov A, Riazuddin S, Cox NJ, et. al. Genomewide Significant Linkage to Stuttering on Chromosome 12. Am J Hum Genet. 2005;76(4):647-51.
5	Estudo do gene candidato <i>DAT</i> (SLC6A3) – transportador de dopamine	População chinesa <i>Han</i> n=112 indivíduos	Lan et al. <sup>(29)</sup>
7	Triagem genômica (análise de ligação)	Paquistaneses n = 56 famílias	Riaz N, Steinberg S, Ahmad J, Pluzhnikov A, Riazuddin S, Cox NJ, et. al. Genomewide Significant Linkage to Stuttering on

**[R1] Comentário:** Autores: verificar comentário apresentado na versão em inglês.

			Chromosome 12. Am J Hum Genet. 2005;76(4):647-51.
7	Triagem genômica (análise de ligação) (grupo de homens) LOD = 2,99 - 153cM	Americanos (origem europeia), suecos e israelenses n=100 famílias	Suresh R, Ambrose N, Roe C, Pluzhnikov A, Wittke-Thompson JK, Ng MC et. al. New complexities in the genetics of stuttering: significant sex-specific linkage signals. Am J Hum Genet. 2006;78(4):554-63.
7q	Análise do gene <i>CNTNAP2</i>	Paciente brasileiro	Petrin et al. <sup>(35)</sup>
9	Triagem genômica (análise de ligação) (gagos recuperados e persistentes) LOD = 2.3 - 60cM	Americanos (origem europeia), suecos e israelenses n=100 famílias	Suresh R, Ambrose N, Roe C, Pluzhnikov A, Wittke-Thompson JK, Ng MC et. al. New complexities in the genetics of stuttering: significant sex-specific linkage signals. Am J Hum Genet. 2006;78(4):554-63
11	Estudo do gene candidato <i>DRD2</i> – receptor de dopamina	População chinesa <i>Han</i> n=112 indivíduos	Lan et al. <sup>(29)</sup>
12q	Triagem genômica (análise de ligação)	Paquistaneses n=56 famílias	Riaz N, Steinberg S, Ahmad J, Pluzhnikov A, Riazuddin S, Cox NJ, et. al. Genomewide Significant Linkage to Stuttering on Chromosome 12. Am J Hum Genet. 2005;76(4):647-51.
12q	Análise dos genes <i>GNPTAB/GNPTG/NAGPA</i>	Paquistaneses n=46 indivíduos	Kang et al. <sup>(32)</sup>
13	Triagem genômica (análise de ligação) NPL = 1,38	Huteritas *n	Cox N, Yairi E. Genetics of stuttering: Insights and recent advances. ASHA leader 5 (16). Bethesda: Amer Speech Lang Hear Association. Abstract . 2000 (674).

**[R2] Comentário:** idem à primeira

Breila: Está certo!

15	Triagem genômica (análise de ligação) (gagos persistentes) LOD = 1,95 - 23cM	Americanos (origem europeia), suecos e israelenses n=100	Suresh R, Ambrose N, Roe C, Pluzhnikov A, Wittke-Thompson JK, Ng MC et. al. New complexities in the genetics of stuttering: significant sex-specific linkage signals. <i>Am J Hum Genet.</i> 2006;78(4):554-63
16q	Triagem genômica (análise de ligação)	1 família paquistanesa de casamentos consanguíneos n=26 indivíduos (14 afetados)	Raza MH, <a href="#">Amjad R</a> , <a href="#">Riazuddin S</a> , <a href="#">Drayna D</a> . <sup>(16)</sup>

**Legenda:** \*n = número de indivíduos no trabalho não disponível

Recentes descobertas têm apontado para variadas regiões do genoma que uma vez alteradas podem estar possivelmente relacionados à gagueira como por exemplo genes da família dos receptores (*DRD2*; *DRD3*) e, transportadores (*SLC6A3*) de dopamina<sup>(29,30)</sup> bem como outros até então relacionados a outras doenças, como as Mucopolissacaridoses Tipo II e III – *GNPTAB* (*N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase, alpha and beta subunits*)<sup>(31)</sup> *GNPTG* (*N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase, gamma subunit*), e ao gene *NAGPA* (*N-acetylglucosamine-1-phosphodiester alpha-N-acetylglucosaminidase*) que atua na mesma via metabólica<sup>(32)</sup>. Nas regiões cromossômicas 7q31 e 7q35 estão localizados, respectivamente, os genes *FOXP2* (*Forkhead Box P2*) e *CNTNAP2* (*Contactin-associated protein-like 2*) os quais tem sido, permanentemente, apontados como genes diretamente relacionados aos distúrbios de fala e de linguagem<sup>(33,34)</sup>.

Evidências de interrupções, que afetam a correta funcionalidades dos genes, como alterações apresentadas na variação do número de cópias em certas regiões do genoma (CNVs), nos rearranjos cromossômicos e mutações, podem implicar numa variedade de condições genética e consequentemente, neuropatológicas<sup>(35)</sup>. Assim, acredita-se que estas alterações devam interferir em toda a dinâmica do desenvolvimento neuronal e que, perturbações nesse sentido, resultem num aumento significativo das chances de alguma forma de disfunção neurológica com prováveis implicações em relação aos centros nervosos da fala e da linguagem<sup>(36)</sup>, os quais uma

vez alterados, devam promover a ocorrência de disfluências que possam culminar no desenvolvimento da gagueira.

A predisposição genética pode afetar a fluência quanto à capacidade do indivíduo em relação ao controle motor da própria fala. Uma resposta ineficiente ao esforço muscular desempenhado e a sua resposta autônoma, pode implicar em contrações musculares em tempos diferentes ou a percursos com atos dessincronizados<sup>(37)</sup>. Evidências recentes sugerem que a gagueira desenvolvimental persistente familiar ocorra devido a disfunções cerebrais<sup>(38)</sup>, atribuídas diretamente a fatores genéticos<sup>(20,39,40)</sup>.

## **DISCUSSÃO**

Torna-se evidente que os genes que predisõem ao aparecimento da gagueira, até então relacionados estão sendo melhor estudados e que alterações em um ou mais genes relacionados podem contribuir significativamente para a manifestação da gagueira além disso, exato modelo de transmissão ainda não está claramente definido e, provavelmente pode ser diferente entre diferentes famílias e populações<sup>(27)</sup>.

Por se tratar de uma doença de caráter multidimensional e de herança complexa, a gagueira deve ser investigada levando-se em consideração todos os fatores de risco, para a obtenção de um diagnóstico preciso e definitivo dos pacientes portadores. Os resultados obtidos a partir de análises genômicas, por meio de estudos de ligação e associação, na identificação de possíveis genes candidatos, bem como de alterações e interações em vias celulares que possam estar atreladas ao fenótipo, demonstram, concomitantemente, a relevância dos componentes biológicos envolvidos e sua complexidade, o que sugere de fato, tratar-se de uma doença poligênica na qual diversos genes, de efeitos variados, podem estar envolvidos com o aumento da susceptibilidade de ocorrência da gagueira<sup>(25)</sup>.

## **COMENTÁRIOS FINAIS**

A sobreposição dos diversos fatores genéticos possivelmente envolvidos com a manifestação da gagueira e as já caracterizadas aos distúrbios da fala e linguagem

como a síndrome de Tourette, o autismo, o distúrbio específico de linguagem e a dislexia, permite-nos inferir de que há provavelmente, um compartilhamento dos mecanismos moleculares básicos envolvidos, os quais uma vez suplementados, a partir da atuação de outros fatores biológicos (genes secundários) e ambientais, possam implicar no acometimento da gagueira.

Identificar a variação genética responsável pela gagueira é um grande desafio enfrentado por diversos grupos de pesquisa a qual, uma vez melhor compreendida é determinante para o entendimento de sua etiologia primária, dos aspectos epidemiológicos e dos possíveis fatores não genéticos envolvidos e que tem importantes implicações no diagnóstico e no prognóstico do paciente.

Desta forma, o fonoaudiólogo deverá estar alerta ao fato de que uma criança com histórico familiar positivo para gagueira poderá ter uma forte tendência a desenvolver o distúrbio de forma crônica, além de apresentar possivelmente outros parentes afetados na família. É importante que o clínico esteja apto a fornecer às famílias orientações precisas sobre o distúrbio. As avaliações objetivas e os tratamentos controlados tem um papel muito importante para o controle da evolução do distúrbio.

## REFERÊNCIAS

1. Andrade CR de. Abordagem neurolinguística e motora da gagueira. In: Tratado de Fonoaudiologia. Org. Ferreira LP, Befi-Lopes DM; Limongi SCO. Ed Roca: São Paulo; 2004. p. 1001-26.
2. Grant AC, Biousse V, Cook AA, Newman NJ. Stroke-Associated Stuttering. Arch Neurol. 1999;56(5):624-27.
3. Yairi E, Ambrose NG, Cox N. Genetics of stuttering: A critical review. J Speech Hear Res. 1996;39(4):771-84.
4. Yairi E, Ambrose NG, Paden EP, Throneburg RN. Predictive factors of persistence and recovery: pathways of childhood stuttering. J Commun Disord. 1996;29(1):51-77.
5. Bryngleson B. Sidedness as an etiological factor in stuttering. The Pedagogical Seminary and Journal of Genetic Psychology. 1935;47(1):204-17.
6. Wepman JM. Familial Incidence in stammering. J Speech Disord. 1939;4(3):199-204.

7. Gray M. The X Family: a clinical and laboratory study of a "stuttering" family. *J Speech Disord.* 1940;5(4):343-8.
8. Howie PM. Concordance for stuttering in monozygotic and dizygotic twin pairs. *J Speech Hear Res.* 1981;24(3):317-21.
9. Felsenfeld S, Kirk KM, Zhu G, Statham DJ, Neale MC, Martin NG. A study of the genetic and environmental etiology of stuttering in a selected twin sample. *Behav Genet.* 2000;30(5):359-66.
10. Ooki S. Genetic and environmental influences on stuttering and tics in Japanese twin children. *Twin Res Hum Genet.* 2005;8(1):69-75.
11. Dworzynski K, Remington A, Rijdsdijk F, Howell P, Plomin R. Genetic etiology in cases of recovered and persistent stuttering in an unselected, longitudinal sample of young twins. *Am J Speech Lang Pathol.* 2007;16(2): 169-78.
12. Fagnani C, Fibiger S, Skythe A, Hjelmberg JV. Heritability and environmental effects for self-reported periods with stuttering: a twin study from Denmark. *Logoped Phoniatr Vocol.* 2011;36(3):114-20.
13. Rautakoski P. Genetic and environmental effects on stuttering: a twin study from Finland. *J Fluency Disord.* 2012;37(3):202-10.
14. Andrews G, Morrisyates A, Howie P, Martin NG. Genetic factors in stuttering confirmed. *Arch Gen Psychiatry.* 1991;48(11):1034-5.
15. Felsenfeld S, Plomin R. Epidemiological and offspring analyses of developmental speech disorders using data from the Colorado Adoption Project. *J Speech Lang Hear Res.* 1997;40(4):778-91.
16. Raza MH, Amjad R, Riazuddin S, Drayna D. Studies in a consanguineous family reveal a novel locus for stuttering on chromosome 16q. *Hum Genet.* 2012;131(2):311-13.
17. Wingate ME. A standard definition of stuttering. *J Speech Hear Disord.* 1964;29:484-9.
18. Bloodstein O, Grossman M. Early stutterings: some aspects of their form and distribution. *J Speech Hear Res.* 1981;24(2):298-302.
19. Bloodstein O. A handbook on stuttering. 5a ed. Chicago: National Easter Seal Society; 1995.
20. Yairi E, Ambrose N. Onset of stuttering in preschool children: selected factors. *J Speech Hear Res.* 1992;35(4):782-8.
21. Ambrose NG, Yairi E. Normative disfluency data for early childhood stuttering. *J Speech Lang Hear Res.* 1999;42(4):895-909.

22. Fox PT, Ingham RJ, Ingham JC, Zamarripa F, Xiong JH, Lancaster JL. Brain correlates of stuttering and syllable production: A PET performance-correlation analysis. *Brain*. 2000;123(10):1985-2004.
23. Foundas AL, Corey DM, Angeles V, Bollich AM, Crabtree–Hartman E, Heilman KM. Atypical cerebral laterality in adults with persistent developmental stuttering. *Neurology*. 2003;61(10):1378-85.
24. Ambrose NG, Cox NJ, Yairi E. The genetic basis of persistence and recovery in stuttering. *J Speech Lang Hear Res*. 1997;40(3):567-80.
25. Wittke-Thompson JK, Ambrose N, Yairi E, Roe C, Cook EH, Ober C, et al. Genetic studies of stuttering in a founder population. *J Fluency Disord*. 2007;32(1):33-50.
26. Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet*. 2003;33(Suppl):228-37.
27. Alm PA, Risberg J. Stuttering in adults: the acoustic startle response, temperamental traits, and biological factors. *J Commun Disord*. 2007;40(1):1-41.
28. Yairi E, Ambrose NG, Grinager N. *Early childhood stuttering*. Austin: Pro-Ed, Inc; 2005.
29. Lan J, Song M, Pan C, Zhuang G, Wang Y, Ma W, et al. Association between dopaminergic genes (SLC6A3 and DRD2) and stuttering among Han Chinese. *J Hum Genet*. 2009;54(8):457-60.
30. Raza MH, Riazuddin S, Drayna D. Identification of an autosomal recessive stuttering locus on chromosome 3q13.2-3q13.33. *Hum Genet*. 2010;128(4):461-3.
31. Fedyna A, Drayna D, Kang C. Characterization of a mutation commonly associated with persistent stuttering: evidence for a founder mutation. *J Hum Genet*. 2011;56(1):80-2.
32. Kang C, Riazuddin S, Mundorff J, Krasnewich D, Friedman P, Mullikin JC, et al. Mutations in the lysosomal enzyme-targeting pathway and persistent stuttering. *N Engl J Med*. 2010;362(8):677-85.
33. Peter B. Replication of CNTNAP2 association with nonword repetition and support for FOXP2 association with timed reading and motor activities in a dyslexia family sample. *J Neurodev Disord*. 2011;3(1):39-49.
34. Fujita E, Tanabe Y, Momoi MY, Momoi T. CNTNAP2 expression in the cerebellum of Foxp2 (R552H) mice, with a mutation related to speech-language disorder. *Neurosci Lett*. 2012;506(2):277-80.

35. Petrin AL, Giacheti CM, Maximino LP, Abramides DV, Zanchetta S, Rossi NF, et al. Identification of a microdeletion at the 7q33-q35 disrupting the CNTNAP2 gene in a Brazilian stuttering case. *Am J Med Genet.* 2010;152A(12):3164-72.
36. Newbury D, Fisher S, Monaco A. Recent advances in the genetics of language impairment. *Genome Med.* 2010;2(1):6.
37. Andrade CR. História natural da gagueira – estudo I: perfil da fluência. *Pró-Fono.* 2002;14(3):351-60.
38. Sommer M, Koch MA, Paulus W, Weiller C, Büchel C. Disconnection of speech-relevant brain areas in persistent developmental stuttering. *Lancet.* 2002;360(9330):380-3.
39. Foundas AL, Bollich AM, Corey DM, Hurley M, Heilman KM. Anomalous anatomy of speech-language areas in adults with persistent developmental stuttering. *Neurology.* 2001;57(2):207-15.
40. Ingham RJ, Ingham JC, Finn P, Fox PT. Towards a functional neural systems model of developmental stuttering. *J Fluency Disord.* 2003;28(4):297-317; quiz 317-8.

### 1.1. NEUROIMAGEM E NEUROFISIOLOGIA NA GAGUEIRA DESENVOLVIMENTAL PERSISTENTE FAMILIAL

Existem dois tipos de modalidades de neuroimagem, as estruturais (principalmente anatômicas), as quais incluem a tomografia computadorizada, a ultrassonografia e a ressonância magnética; e as funcionais (principalmente fisiológicas), que abrangem a Eletroencefalografia, a Magnetoencefalografia (MEG), a Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET), a Tomografia Computadorizada com Emissão Simples de Fótons (SPECT) e a Ressonância Magnética Funcional (RMf) (INGHAM et. al., 1996).

Estudos realizados por meio de PET, RMf e MEG tem fornecido informações quanto às regiões neurais que estão implicadas na produção da fala. (INGHAM et. al., 2003).

A RMf, por ser um método não invasivo, é um exame de neuroimagem funcional muito utilizado para avaliar as atividades cerebrais no momento de fala (BUCHBINDER; COSGROVE,1998). É uma avaliação indireta da função cerebral, baseado na conexão neurovascular a fim de induzir atividade neuronal a partir de variações vasculares e de consumo de oxigênio. Existem dois principais tipos de sequência de pulso para obtenção de dados de RMf: *Blood Oxygen Level Dependent (BOLD)* – contraste dependente do nível de oxigenação sanguínea – e o *Arterial Spin Labelling (ASL)* – marcação dos spins arteriais (MARTIN, 2007).

O BOLD é a sequência mais amplamente utilizada e baseia-se na detecção de variações da oxigenação sanguínea com influência do aumento de fluxo e volume sanguíneos. É uma técnica que detecta os efeitos magnéticos da oxi- e desoxi-hemoglobina. Em uma área onde há maior oferta de oxigênio, como nas áreas ativadas, haverá redução da relação entre desoxi/oxi-hemoglobina, gerando aumento do sinal de ressonância magnética (OGAWA et al., 1990).

Estudos de neuroimagem com indivíduos gagos tiveram início na década de 20, em que 2 pesquisadores observaram uma anormalidade do sistema neurológico em indivíduos com gagueira crônica (ORTON, 1927; ORTON; TRAVIS, 1929). Mais tarde, estudos com PET, sugeriram que os indivíduos com gagueira desenvolvimental persistente apresentam menor atividade nos centros da fala localizados no hemisfério esquerdo, bem como em determinadas áreas auditivas, ao mesmo tempo, as áreas

correspondentes no hemisfério direito pareciam ativas, mas não de forma comum (FOX et. al., 1996). Foi sugerido então, que essa ativação anormal do hemisfério direito deveria ser uma tentativa de compensação pela disfunção do hemisfério esquerdo e não a causa da gagueira. Essa hipótese foi formulada ao observar, em um estudo realizado com gogos desenvolvimentais, que o hemisfério esquerdo estava mais ativo durante os momentos de produção de fala gaguejada, enquanto que a hiperativação do hemisfério direito estava mais correlacionada aos momentos de fala fluente. (BRAUN et. al., 1997)

Um estudo utilizando magnetoencefalografia (MEG), tendo como objetivo comparar a ativação cortical em gogos desenvolvimentais e fluentes, durante a fala, constatou que a primeira área a ser ativada em indivíduos fluentes foi a área de Broca (programação motora da fala) e em seguida, o sulco central e lateral esquerdo e o córtex pré-motor esquerdo (preparação motora da fala). Nos indivíduos gogos, a preparação motora da fala antecipou sua programação, sugerindo déficit nas conexões neuronais (SALMELIN, 2000).

Um estudo de neuroimagem funcional utilizando PET, investigou a ativação cerebelar durante tarefas de fala em indivíduos com gagueira desenvolvimental e fluentes. Foi observada uma maior ativação desta área em indivíduos com o distúrbio quando comparado com o resultado do exame em indivíduos normais (FOX, et. al., 2000).

Foi realizado um estudo de caso no Brasil, com um adulto do sexo masculino utilizando PET. O exame foi realizado durante tarefa de fala e no repouso. Não foram identificadas correlações corticais específicas entre as duas condições de avaliação (Andrade et. al., 2001).

Em um estudo utilizando RMf realizado com adolescentes e adultos com gagueira desenvolvimental foi verificada hiperativação da ínsula anterior direita e cerebelo, a qual não foi observada em indivíduos fluentes (BROWN et. al., 2005). Esses achados também foram encontrados em um estudo posterior (WATKINS et. al., 2007).

Posteriormente, outros pesquisadores encontram respostas neurais distintas em indivíduos com gagueira desenvolvimental e indivíduos fluentes durante o planejamento e execução motora da fala. Para isso utilizaram exame de RMf. Os indivíduos com gagueira tiveram menor ativação nas regiões frontal e temporo-parietal comparado aos controles durante a percepção e planejamento da fala. Durante a produção de fala os

indivíduos com gagueira tiveram menor ativação do que os controles no giro temporal superior esquerdo nas áreas pré-motoras esquerdas. Por outro lado, tiveram maior ativação no giro temporal superior direito, insula, putâmen e regiões motoras pré-centrais (CHANG et. al., 2009).

Foi observado em um estudo com RMf que adultos gogos e controles indivíduos adultos com gagueira desenvolvimental apresentaram maior ativação no giro frontal inferior direito, lobo temporal direito e córtex sensório-motor comparado aos controles (LOUCKS et. al., 2011).

Outro estudo com RMf, constatou que gogos desenvolvimentais apresentaram maior ativação na área motora suplementar (SMA) direita e esquerda e giro precentral direito e esquerdo que os controles (INGHAM et. al., 2012).

A revisão de literatura de estudos de neuroimagem e gagueira desenvolvimental estão ilustradas na tabela 1.

**Tabela 1.** Revisão da literatura sobre artigos de neuroimagem em portadores de gagueira desenvolvimental

<b>Autores</b>	<b>N</b>	<b>Exame de NF</b>	<b>Resultados do casos</b>	<b>Tarefa de fala</b>
Fox et. al., 1996	Casos: 10 Controles: 10	PET	Hipoativação HE (áreas da linguagem) Hiperativação HD (córtex motor, regiões subcorticais e cerebelo) Ausência de ativação do lobo temporal	Leitura
Braun et. al., 1997	Casos: 18 Controles: 20	PET	Hipoativação HE Hiperativação HD (hipótese de compensação)	Fala semi-espontânea
Fox et. al., 2000	Casos: 10 Controles: 10	PET	Hiperativação do cerebelo	Leitura
Salmelin et. al., 2000	Casos: 9 Controles: 10	MEG	Ativação do sulco central e lateral esquerdo e córtex pré-motor esquerdo antecipou a ativação da área de Brocca.	Leitura
Andrade e. al., 2001	Estudo de caso n=1	PET	Não houve diferença de ativação comparando situação de fala e repouso.	Fala semi-espontânea
Watkins et. al., 2007	Casos: 20 Controles: 10	RMf	Hiperativação da ínsula anterior direita e cerebelo	Leitura
Chang et. al., 2009	Casos: 20 Controles: 20	RMf	Maior ativação no giro temporal superior direito, insula, putâmen e regiões motoras pré-centrais	Leitura
Loucks et. al., 2011	Casos: 11 Controles: 10	RMf	Maior ativação no giro frontal inferior direito, lobo temporal direito e córtex sensório-motor	Leitura
Ingham et. al., 2012	Casos: 8 Controles: 12	PET e RMf	Maior ativação na Área motora suplementar (SMA) e giro precentral	Nomeação de figuras

**Legenda:** N: número da amostra; NF: neuroimagem funcional.

## 2. OBJETIVOS

Nosso estudo teve como objetivo principal verificar se existem variações biológicas em indivíduos com GDPF.

Para isto utilizamos 3 métodos de avaliações diferentes e procuramos prováveis correlações entre tais achados:

1. Avaliação fonoaudiológica;
2. Avaliação molecular de um gene candidatos à GDPF.
3. Avaliação de neuroimagem funcional.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. CASUÍSTICA

- Grupo amostral: Composto por 8 indivíduos adultos, destros, do sexo masculino, diagnosticados com GDPF, encaminhados para o Serviço de Aconselhamento Genético (SAG) pelo ambulatório de Foniatria e Distúrbios da Voz da Disciplina de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (Unesp), com idade variando de 19,3 a 51,1.  $X=35,2 \pm 15,9$ .
- Grupo controle: Composto por 8 indivíduos adultos fluentes, destros, pareados sexo e idade aos indivíduos do grupo amostral, selecionados junto ao universo acadêmico da UNESP, sem relação hierárquica com o pesquisador e/ou orientador.

#### 3.1.1. Ética

Ao serem convidados para participar desta pesquisa, todos os indivíduos foram informados sobre os objetivos e esclarecidos sobre os procedimentos adotados para a anuência e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Com a concordância em participar da pesquisa, foi solicitado, o preenchimento do TCLE específico e nos termos da Resolução CONEP/CNS196/1996, 340/2004 e 347/2005, no qual consta também um formulário de autorização, por parte dos indivíduos, para o armazenamento de amostras de DNA em um banco, em freezer - 80°C, sob

responsabilidade do Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP conforme portaria D.IBB N. 132/2010, DE 21 DE OUTUBRO DE 2010 (ANEXO 1 e 2) Esta pesquisa foi autorizada pelo Conselho de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP (ANEXO 3).

### **3.1.2. Critérios de inclusão**

Para o grupo amostral:

- Apresentarem quadro de gagueira há mais de 36 meses, sem remissão;
- Presença de histórico familiar positivo para o distúrbio, ou seja, apresentar no mínimo outro parente gago de primeiro ou segundo grau.
- Serem destros;
- Serem falantes nativos do português brasileiro;
- Terem idade igual ou superior a 18 anos.

Para o grupo controles:

- Terem sido diagnosticados como fluentes;
- Serem destros;
- Serem falantes nativos do português brasileiro;
- Terem idade igual ou superior a 18 anos.

### **3.1.3. Critérios de exclusão**

Os participantes de ambos os grupos não poderiam apresentar déficit neurológico, psiquiátrico, comunicativo ou cognitivo associado. Também não apresentavam marca-passos cardíacos, clips ferromagnéticos, neuro-estimuladores e/ou implantes ferromagnéticos, que poderiam interferir no exame de neuroimagem funcional.

## **3.2. AVALIAÇÃO FONOAUDIOLÓGICA**

### **3.2.1. Entrevista fonoaudiológica**

Os indivíduos de ambos os grupos realizaram uma entrevista fonoaudiológica a fim de avaliar os critérios de inclusão e exclusão pertinentes aos dois grupos e obter informações que ajudariam no diagnóstico fonoaudiológico.

Foram obtidos dados quanto ao histórico pré, peri e pós-natal; dados de saúde geral e fonoaudiológica dos indivíduos e seus familiares. Para o grupo amostral foram obtidas informações quanto ao surgimento e evolução da gagueira, assim como histórico familiar para o distúrbio.

Foi aplicado o Edinburgh Handedness Inventory (OLDFIELD, 1971) (ANEXO 4), a fim de investigar dados sobre a lateralidade dos participantes. O questionário é constituído de 10 perguntas relacionados com a mão utilizada em determinadas tarefas, as quais foram lidas pelo examinador. Ao final do questionário, verificou-se se o participante era destro, sinistro ou ambidestro. Participaram desse estudo os participantes com resultados maior ou igual a 85% destros.

### **3.2.2. Diagnóstico de gagueira**

O diagnóstico de gagueira foi realizado por meio da metodologia proposta por Andrade (2004b), na qual é realizada uma coleta de uma amostra de fala auto-expressiva. Esta amostra foi obtida a partir de estímulo visual (figura) que foi apresentado a cada participante seguido da seguinte ordem: “Por favor, olhe essa figura e me fale tudo que quiser sobre ela”. O discurso só foi interrompido por perguntas e/ou comentários, nos casos em que houve a necessidade de incentivar a produção do discurso para a obtenção de 200 sílabas expressas (fluentes), necessárias para análise da amostra. Estas amostras foram filmadas (filmadora digital Sony DCR-SR85).

Após a filmagem, as amostras de fala foram analisadas visando o levantamento da tipologia das rupturas (disfluências comuns - hesitações; interjeições; revisões; palavras não terminadas; e repetição de palavras, segmentos ou frases; e disfluências gagas - repetição de sons ou sílabas; prolongamentos; bloqueios; pausas e intrusão), da velocidade de fala (palavras e sílabas por minuto) e da frequência das rupturas (porcentagem de descontinuidade de fala e porcentagem de disfluências gagas).

Para a obtenção da velocidade de fala, o fluxo de palavras por minuto foi obtido por meio da cronometragem do tempo total da amostra, incluindo as pausas, e contagem do total de palavras expressas produzidas e então aplicada a regra de compatibilização por minuto. O mesmo foi realizado com o número de sílabas expressas (200) produzidas para se obter o fluxo de sílabas por minuto.

Os resultados obtidos foram comparados com as variáveis estabelecidas pelo Perfil de Fluência da Fala - Parâmetro comparativo diferenciado por idade para adultos (ANDRADE, 2006).

A gravidade do distúrbio foi verificada por meio do protocolo SSI-3 Stuttering Severity Instrument (RILEY, 1994), o qual avalia a frequência e duração dos eventos de gagueira, acompanhados ou não de concomitantes físicos. A pontuação foi convertida para a faixa etária. Os graus de severidade são: muito leve; leve; moderado; grave e muito grave.

Foi adotado como critério de presença do distúrbio, o mínimo de 3% de disfluências gagas e obtenção de no mínimo 18 pontos no protocolo SSI-3 (grau de severidade = leve).

Após a avaliação fonoaudiológica, os participantes do grupo amostral receberam orientações quanto ao distúrbio. Os sujeitos que desejaram tratamento fonoaudiológico foram encaminhados.

### **3.3. AVALIAÇÃO MOLECULAR**

#### **3.3.1. Coleta de amostras sanguíneas e purificação do DNA genômico**

Dos indivíduos participantes foram coletados 4ml de sangue periférico, armazenado em tubo contendo anticoagulante EDTA a 6% (frasco Vacuette® EDTA 4 ml). Após a coleta, os tubos foram homogeneizados para evitar a formação de coágulos. As amostras foram mantidas sob-refrigeração a 4°C do transporte até o processamento no Laboratório de Genética Molecular do Serviço de Aconselhamento Genético do Instituto de Biociências de Botucatu – Unesp e o DNA genômico foi purificado com o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI – USA).

O protocolo de purificação seguiu as etapas: lise das hemácias; lise dos leucócitos; precipitação das proteínas nucleares e citoplasmáticas; precipitação do DNA genômico

com isopropanol 100%; lavagem do DNA com etanol 70%; secagem a temperatura ambiente e, por fim, hidratação do DNA com 250µl de solução tampão TE de baixa concentração (10mM Tris HCl pH 8.0, 0,1mM EDTA) em banho-maria  $\Delta t_{\text{máximo}} = 60$  minutos, a 65°C.

### 3.3.2. Quantificação e qualidade das amostras de DNA genômico

As amostras de DNA foram diretamente quantificadas e qualificadas através de leitura em espectrofotometria UV - plataforma *ND-1000 Spectrophotometer* da NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific Inc.- Wilmington, Delaware - USA) a partir de 1,0µl de solução estoque.

A eletroforese para a verificação da integridade do DNA extraído foi realizada em gel de agarose a 1,5%, a partir de 2,0µl de DNA (solução estoque) diluído no tampão de corrida com azul de bromofenol, 120 watts,  $\Delta t_{\text{eletroforese}} = 45$  minutos. Como referência foi utilizado um marcador de peso molecular (*ladder*) de 1kb. Após a eletroforese o gel foi corado com GelRed™ (Biotium, Inc. – Hayward, CA – USA), sendo visualizado e fotografado sob luz ultravioleta (UV).

As amostras estoque foram armazenadas em freezer - 80°C até o momento de uso. Posteriormente, alíquotas do estoque foram diluídas em tubos e/ou placas de acordo com as concentrações de trabalho exigidas pela técnica laboratorial aplicada e então armazenadas a 4°C.

### 3.3.3. Sequenciamento do DNA

*O sequenciamento do DNA foi realizado no National Institute on Deafness and Other Communication Disorders (NIDCD), membro do U.S. National Institutes of Health (NIH) pelo Dr. Danilo Moretti-Ferreira.*

#### 3.3.3.1. Desenho dos iniciadores

As informações referentes ao gene e/ou região analisada, bem como a sequência de bases nucleotídicas dos éxons, foram obtidas a partir da base de dados da Universidade da Califórnia, Santa Cruz (UCSC *Genome Browser*) (disponível em

<http://www.genome.ucsc.edu/index.html>). Os iniciadores foram desenhados utilizando programa *online Primer3* v.0.4.0 (disponível em <http://frodo.wi.mit.edu/>) e sintetizados pela Integrated DNA Technologies® (IDT, Inc. Coralville – Iowa – USA) (disponível em <http://www.idtdna.com>). A tabela 2 apresenta os dados referentes ao gene *FOXP2* (isoforma II) quanto ao número de éxons e os iniciadores utilizados nas análises. As seis isoformas diferentes do gene *FOXP2* foram alinhadas, a partir de cada uma das sequências em formato FASTA, pelo programa *online BLAST*® (*Basic Local Alignment Search Tool*) (disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A isoforma II apresentou-se como a mais completa e, portanto a sequência de referência escolhida para as análises. Além disso, pode-se observar que o primeiro exon neste gene não é transcrito e, portanto nenhum iniciador foi desenhado para o seu sequenciamento.

Além disso, os mesmos iniciadores *forward* (F) e *reverse* (R) sintetizados foram utilizados tanto na fase inicial de amplificação dos fragmentos quanto nas reações de sequenciamento.

**Tabela 2.** Informações referentes ao gene *FOXP2* (isoforma II) e os iniciadores utilizados.

N	Éxon	Iniciadores	Sequencia	Tamanho do produto (pb)
127	02	FOXP2_E2F	AGCATCTGGATGAAAGCTGAA	500
128		FOXP2_E2R	CATCCTTCAATCATGTTCCAAA	
129	03	FOXP2_E3F	CATTGAAGCCTTTACTATTAACCA	700
130		FOXP2_E3R	TTGCAAGGAGTTACCTTGAAACTT	
131	04	FOXP2_E4F	TCCCATCTGCCAAATTATTCT	500
132		FOXP2_E4R	TTGTATCTTGATTATCTGCACCAA	
133	05	FOXP2_E5F	ATCTGATGCCTCTGGAAAGC	600
134		FOXP2_E5R	GCACGCTAATAGGTTGTCTTT	
135	06	FOXP2_E6F	AATTCAGAGCTGCCTTGGA	800
136		FOXP2_E6R	AAAGGAGAGCCTGAGAGCCTA	
137	07	FOXP2_E7F	AAAAACCCACTCAGGCAATG	650
138		FOXP2_E7R	AGAAAATAGGTCATGCCACCA	
139	08	FOXP2_E8F	TGGTGCTGATAGTGTAAGTGA	700
140		FOXP2_E8R	TGGGTGACAGAGCAAGACTC	
141	09	FOXP2_E9F	TGACTGCTCTGAGCTGAATTG	600
142		FOXP2_E9R	TTGTTGGAACCCACAAAAATC	
143	10	FOXP2_E10F	TCCCAGTGCACAGAAACATC	550
144		FOXP2_E10R	GACAGTAAAATGCAGGCTGAAA	
145	11	FOXP2_E11F	AAGTTGCATTTCCCTCCAGA	500
146		FOXP2_E11R	GCCGTATTTTCATCACACTCA	
147	12	FOXP2_E12F	TGAGATTGGCTGCTTCCTTT	650
148		FOXP2_E12R	CCCCTATTGCGATTACCAG	
149	13 e 14	FOXP2_E13_14F	CCACTGTCATGCTTTGTGCT	589
150		FOXP2_E13_14R	ATTCCATTCAAGAGGCAGGTT	
151	15	FOXP2_E15F	TGAGGTTTGTAAATCATGCCATA	463
152		FOXP2_E15R	CATTGCCACGAGAATGTTAGC	
153	16	FOXP2_E16F	TTTGTGGCCTTATATACATCCAGT	469
154		FOXP2_E16R	GGGTGTCCTTCTTGCTTCTTC	
155	17	FOXP2_E17F	TTTCCTTATTGGAACCCATTAATA	477
156		FOXP2_E17R	TGAACGTGGTATAATTTAACTCCA	
157	18	FOXP2_E18F	TTGACCTCTCACTGCAAAGT	630
158		FOXP2_E18R	TGCCTGTTGGTACTGAATCC	

### 3.3.3.2. Metodologia e procedimentos

Para a realização do sequenciamento propriamente dito algumas etapas foram realizadas:

### I. Amplificação dos fragmentos de DNA por PCR (Reação em cadeia da polimerase)

As regiões exônicas foram amplificadas por PCR padrão a partir de dois protocolos: enzima *HotStar Taq*<sup>®</sup> (Qiagen<sup>®</sup>) para reações em geral e enzima FailSafe<sup>™</sup> PCR System / FailSafe<sup>™</sup> PCR 2X PreMix G (Epicentre<sup>®</sup> Biotechnologies – Madison, WI) para fragmentos de difícil amplificação (dependente da %CG). A partir de 10 ng/μl de DNA foram realizadas reações de PCR com volume final de 10μl.

As ampliações *in vitro* foram realizadas de acordo com os programas descritos na tabela 3. Os produtos de PCR (1μl cada) foram analisados, a partir de eletrofores em gel de agarose 1%, 100 watts,  $\Delta t_{\text{eletroforese}} = 40$  min, corados com brometo de etídeo e analisado sob luz ultravioleta, a fim de confirmar a amplificação dos fragmentos e a especificidade dos produtos. Além disso, foi utilizado como referência um marcador de peso molecular (*ladder*) de 100pb.

**Tabela 3.** Programas utilizados para as reações de PCR para sequenciamento.

Fases da reação de PCR	Temperatura/Tempo para <i>HotStar Taq</i> <sup>®</sup> Polimerase (Qiagen <sup>®</sup> )	Temperatura/Tempo para <i>FailSafe Taq</i> <sup>™</sup> Polimerase (Epicentre <sup>®</sup> )	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95°C / 15 min	95°C / 1 min	
Desnaturação	95°C / 20 seg	95°C / 20 seg	
Pareamento	56°C / 30 seg	56°C / 30 seg	35X
Extensão	72°C / 2 min	72°C / 2 min	
Extensão final	72°C / 7 min	72°C / 7 min	

### II. Purificação enzimática dos produtos de PCR

Os produtos amplificados foram tratados com o método de purificação através ExoSAP-IT<sup>®</sup> (USB Corporation) uma vez que a Exonuclease I (Exo I) é responsável pela digestão do excesso de iniciadores enquanto que a *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP), por degradar o excesso de nucleotídeos (não incorporados a reação), ambos presentes no produto final da PCR.

Aos produtos de PCR (10μl) foram adicionados 10μl da solução de purificação. As proporções dos reagentes para a reação de purificação é apresentada na tabela 4. A

reação foi incubada a 37°C por 30 minutos para a purificação e, posterior aquecimento a 80°C por 10 minutos para a inativação das enzimas.

**Tabela 4.** Reação de purificação dos produtos de PCR.

Reagentes	Conc. Final	Vol. (µl)
H <sub>2</sub> O ultra pura	NA	7,8
Tampão (10X) <sup>‡</sup>	1X	2,00
Emzima SAP [1U/µl]*		0,15
Emzima Exo I [10U/µl]*		0,05
Volume MIX		10,00
Produto de PCR		10,00
Volume final da reação		20,00

\* ExoSAP-IT<sup>®</sup> (USB Corporation); <sup>‡</sup> (200mM Tris HCl – pH 8,0, 100mM MgCl<sub>2</sub>)

### III. Reação de sequenciamento

Os produtos de PCR purificados foram bidirecionalmente sequenciados (sentidos *forward* e *reverse*) em reações distintas pelo método de Sanger (Sanger et. al., 1977). O equipamento utilizado para o sequenciamento por eletroforese capilar foi o ABI PRISM<sup>®</sup> 3730 XL *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems<sup>®</sup>) com o uso do kit ABI PRISM<sup>®</sup> BigDye<sup>®</sup> Terminator v.3.1 (Applied Biosystems<sup>®</sup>). As tabelas 5 e 6 apresentam respectivamente, o protocolo para as reações de sequenciamento e, o programa utilizado na termociclagem.

**Tabela 5.** Reação de sequenciamento – reagentes utilizados e proporções.

Reagentes	Conc. Final	Vol. (µl)
H <sub>2</sub> O ultra pura	NA	4,8
Tampão (5X)*	1X	2,00
Primer [1,60µM] ( <i>forward</i> ou <i>reverse</i> )		1,00
BigDye <sup>®</sup> Terminator*	1/10X	0,20
Volume MIX		8,00
Produto de PCR purificado		2,00
Volume final da reação		10,00

\* kit ABI PRISM<sup>®</sup> BigDye<sup>®</sup> Terminator v.3.1 (Applied Biosystems<sup>®</sup>)

**Tabela 6.** Programa utilizado para a reação de termociclagem.

Fases da reação de sequenciamento	Temperatura / Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	96°C / 1 min.	
Desnaturação	96°C / 10 seg.	
Pareamento	50°C / 5 seg.	25X
Extensão	60°C / 4 min.	

#### IV. *Precipitação das reações de sequenciamento*

As reações de sequenciamento foram realizadas em placas de 96 micropoços MicroAmp<sup>®</sup> PCR (Applied Biosystems<sup>®</sup>) identificadas com código de barras.

A cada poço contendo 10µl de reação de sequenciamento amplificada foram adicionados e aplicados os seguintes procedimentos:

- a. 2,5µl de EDTA [125mM] e 30,0µl de etanol 100%;
- b. Selagem da placa com adesivo de alumínio e mistura dos reagentes por agitação ( $V = 2000\text{rpm}$ ;  $\Delta t = 20\text{seg.}$ ) em Vortex-Genie<sup>®</sup>2 (Scientific Industries, Inc.);
- c. Incubação à temperatura ambiente e livre de luz,  $\Delta t = 15\text{min.}$ ;
- d. Centrifugação ( $V = 3000\text{rpm}$ ;  $\Delta t = 30\text{min.}$  à temperatura de 10°C);
- e. Retirada do adesivo, remoção do sobrenadante e rápida centrifugação com a placa invertida  $V_{\text{máximo}} = 1000\text{rpm}$  para a retirada dos resíduos;
- f. Adição de 50µl de etanol 70%, selagem da placa com adesivo de alumínio, mistura dos reagentes por agitação ( $V = 2000\text{rpm}$ ;  $\Delta t = 20\text{seg.}$ ) em Vortex-Genie<sup>®</sup>2 (Scientific Industries, Inc.);
- g. Centrifugação ( $V = 3000\text{rpm}$ ;  $\Delta t = 15\text{min.}$  à temperatura de 10°C);
- h. Retirada do adesivo, remoção do sobrenadante e rápida centrifugação com a placa invertida  $V_{\text{máximo}} = 1000\text{rpm}$  para retirada dos resíduos;
- i. Secagem do precipitado na placa à temperatura ambiente e livre de luz  $\Delta t = 15\text{min.}$ ;
- j. Ressuspensão do precipitado com 10µl de Formamida Hi-Di<sup>™</sup> (Applied Biosystems<sup>®</sup>) seguida de agitação ( $V = 1000\text{rpm}$ ;  $\Delta t = 20\text{seg.}$ ) em Vortex-Genie<sup>®</sup>2 (Scientific Industries, Inc.) e rápida centrifugação ( $V = 1000\text{rpm}$ ;  $\Delta t = 20\text{seg}$  a temperatura de 10°C);

Arquivos de entrada (.txt), contendo informações referentes a identificação da placa e da amostra sequenciada, foram utilizados pelo programa *Data Collection* para a identificação da sequência de bases e posteriormente, armazenados em arquivos (.ab1).

#### V. *Análise das sequências de DNA*

Os dados de sequenciamento foram processados pelo programa *DNA Sequencing Analysis* v.5.2 (Applied Biosystems®) com a geração de arquivos (.ab1) utilizados pelo programa SeqMan Pro™ - DNASTAR® Lasergene® Core Suite 8 (DNASTAR®, Inc.) para montagem e análise das sequências.

Para a análise de conservação evolutiva de possíveis códons alterados e dos polimorfismos identificados utilizou-se ferramentas de bioinformática disponíveis nas bases de dados da UCSC *Genome Bioinformatics* (disponível em: <http://genome.ucsc.edu/>) e do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### 3.4. AVALIAÇÃO DE NEUROIMAGEM FUNCIONAL

Os indivíduos dos 2 grupos foram submetidos ao exames de RMf, os quais foram realizados em aparelho de ressonância magnética de 1.5 T (GE Medical Systems, Milwaukee, WI) pelo médico radiologista Dr. Altamir Santos Teixeira na TC TOMOCENTRO BOTUCATU.

O protocolo padrão para a realização dos exames e processamento dos dados seguiram o sugerido pelo fabricante do equipamento ao qual os testes fonoaudiológicos foram adaptados.

O processamento para a obtenção dos mapas de ativação cerebral e da representação gráfica do desempenho do paciente na realização da tarefa estabelecida foi realizado por um médico radiologista, também responsável pela interpretação do estudo funcional e emissão do relatório.

#### 3.4.1. Tarefas de Fala

As tarefas de fala utilizadas durante o exame de RMf foram:

- 1- Nomeação: Foram apresentadas aos participantes, figuras concretas as quais os eles deveriam nomear. Exemplo: Figura de um *barco*.
- 2- Leitura: Foram apresentadas sentenças as quais os participantes deveriam realizar a leitura. Exemplo: *Se estiver calor nós iremos para a praia*.
- 3- Fala semi-espontânea: Um estímulo visual (figura de um menino sentado em frente sua casa) foi apresentado a cada participante seguido da seguinte ordem: “Por favor, olhe essa figura e me fale tudo que quiser sobre ela”. Esta figura foi utilizada no momento da avaliação fonoaudiológica.

Cada estímulo visual foi apresentado ao participante pela fonoaudióloga, também responsável por dar instruções prévias quanto às tarefas de fala que seriam realizadas. O participante foi orientado a não movimentar cabeça e membros durante o exame, para evitar artefatos de movimento.

Foram utilizadas três tarefas de fala diferentes devido à diversidade de tarefas utilizadas nos estudos de neuroimagem funcional. As três tarefas já foram usadas em trabalhos anteriores: Nomeação (LU, et. al, 2010); Leitura (SALMELIN, 2000; DE NIL; KROLL; KAPUR, 2000; DE NIL; KROLL; HOULE, 2001); Fala semi-espontânea (ANDRADE, 2001). Os resultados dos indivíduos do grupo amostral foram comparados com seus controles.

## 4. RESULTADOS

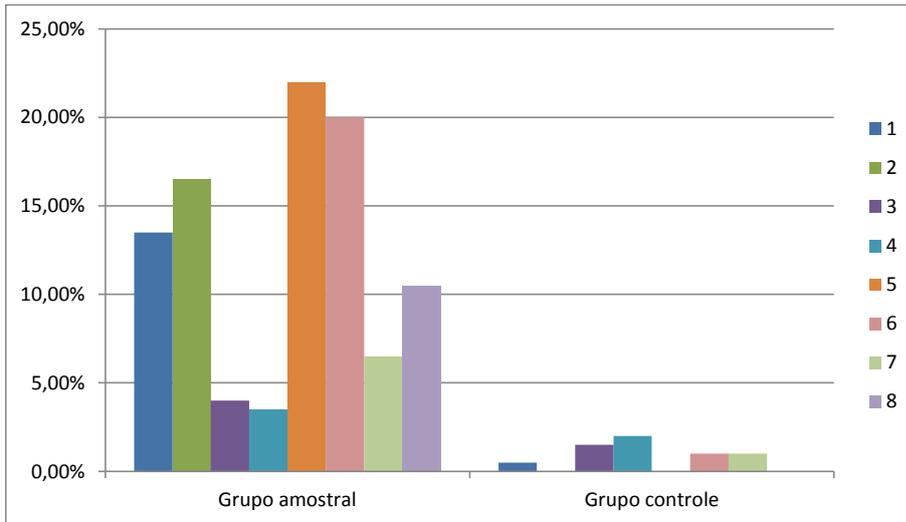
### 4.1. RESULTADOS DA AVALIAÇÃO FONOAUDIOLÓGICA

Os resultados relevantes para o diagnóstico da gagueira encontram-se na tabela 7.

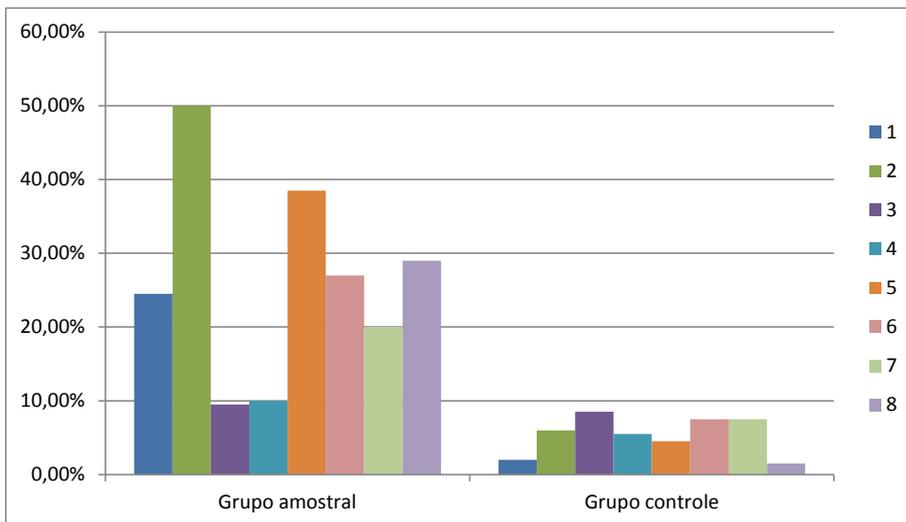
**Tabela 7.** Distribuição de grupo amostral e grupo controle quanto aos resultados da avaliação fonoaudiológica.

Grupo amostral	% Disf. Gagas	SSI	Gravidade	Grupo controle	% Disf. Gagas	SSI
Caso 1	13,50%	26	Moderada	Controle 1	0,5%	0
Caso 2	16,50%	36	Grave	Controle 2	0%	0
Caso 3	4%	18	Leve	Controle 3	1,5%	0
Caso 4	3,5%	18	Leve	Controle 4	2%	0
Caso 5	22%	22	Grave	Controle 5	0%	0
Caso 6	20%	29	Moderada	Controle 6	1%	0
Caso 7	6,5%	19	Leve	Controle 7	1%	0
Caso 8	10,5%	26	Moderada	Controle 8	0%	0

As figuras 1 e 2 ilustram as frequências de rupturas de ambos os grupos. A porcentagem de disfluências gegas é ilustrada na figura 1 e a porcentagem de descontinuidade de fala na figura 2.

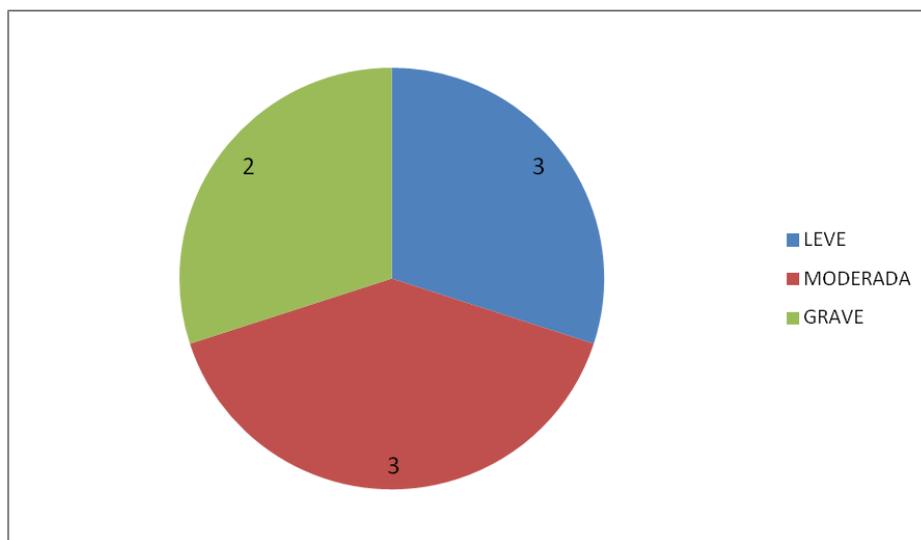


**Figura 1.** Resultados da porcentagem de disfluências gegas do grupo amostral e controle.



**Figura 2.** Resultados da porcentagem descontinuidade de fala do grupo amostral e controle.

Os resultados da gravidade da gagueira estão ilustrados na figura 3.



**Figura 3.** Distribuição dos indivíduos quanto à gravidade da gagueira (n=8)

A frequência de disfluências de cada sujeito do grupo controle foi comparada com os intervalos de confiança das tabelas do Perfil de Fluência da Fala (ANDRADE, 2006). Todos os resultados encontram-se dentro da normalidade para a idade e sexo.

A velocidade de fala foi medida por meio do fluxo de palavras por minuto e do fluxo de sílabas por minuto. Os resultados de acordo com a gravidade da gagueira encontram-se na tabela 8. Os achados foram analisados comparando com os intervalos de confiança das tabelas do Perfil de Fluência da Fala (ANDRADE, 2006).

**Tabela 8.** Velocidade de fala (palavras/minuto e sílabas/minuto)

Grupo amostral	Palavras/minuto	Sílabas/minuto	Gravidade da gagueira
Caso 1	95,07	169,49	Moderada
Caso 2	66,66	151,51	Grave
Caso 3	181,33	333,33	Leve
Caso 4	62,35	112,35	Leve
Caso 5	75,46	122,69	Grave
Caso 6	65,60	124	Moderada
Caso 7	92,03	177	Leve
Caso 8	59	100	Moderada

Todos os participantes do grupo amostral apresentaram velocidade de fala alterada. Sete deles obtiveram valores abaixo do esperado para sua faixa etária e sexo, tanto no de fluxo de palavras por minuto, como de sílabas por minuto. Mostrando que apresentam lentidão para transmitir a informação desejada e também para mover as estruturas da fala. Apenas um deles apresentou velocidade de fala aumentada tanto no fluxo de palavras por minuto como de sílabas por minuto, mostrando que esse indivíduo apresenta rapidez para transmitir a informação desejada e também para mover as estruturas da fala.

Quanto aos valores de fluxo de palavras por minuto do grupo controle, 3 obtiveram valores dentro da normalidade e 5 obtiveram valores abaixo, comparando com o intervalo de confiança das tabelas do Perfil de Fluência da Fala (ANDRADE, 2006). Quanto aos valores de fluxo de sílabas por minuto, 5 sujeitos obtiveram valores dentro da normalidade, enquanto que 3 participantes apresentaram valores abaixo do intervalo de confiança. Apesar desses indivíduos apresentarem alterações de velocidade de fala, esse fator não é determinante para alterar sua fluência de fala.

#### **4.3. RESULTADOS DA AVALIAÇÃO MOLECULAR**

O sequenciamento dos 17 éxons do gene *FOXP2* foi realizado nos 8 indivíduos do grupo amostral e em seus controles. Não foi encontrada variação polimórfica ou de mutação em nenhum dos casos.

Desta forma, não foram realizadas correlações com esta variável biológica.

#### **4.4. RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DE NEUROIMAGEM FUNCIONAL**

Todos os indivíduos realizaram as 3 etapas do exame. Devido a um artefato ocorrido no exame do caso 4, a tarefa de leitura de frases foi excluída no exame deste participante.

Comparando-se os 8 indivíduos do grupo amostral durante a tarefa de nomeação de figuras, pode-se observar que, 7 apresentaram ativação de áreas localizadas no lobo temporal direito, enquanto que apenas 1 apresentou ativação do temporal esquerdo. Quanto à ativação dos hemisférios cerebrais, 5 participantes do grupo amostral

apresentaram mais áreas ativadas no hemisfério direito, enquanto que 3 apresentaram mais áreas ativadas no hemisfério esquerdo (Tabela 9).

**Tabela 9.** Número de áreas ativadas em cada lobo e hemisfério cerebral durante tarefa de nomeação do grupo amostral.

Grupo amostral	FD	FE	TD	TE	OD	OE	HD	HE
Caso 1			4	10			4	10
Caso 2			1				1	0
Caso 3			2			3	2	3
Caso 4	6	6	4		3	3	13	9
Caso 5	1						1	0
Caso 6			4		4		8	0
Caso 7			2			5	2	5
Caso 8	1	1	2		5	2	8	3

**Legenda:** FD – Frontal direito; FE – Frontal esquerdo; TD – Temporal direito; TE – Temporal esquerdo; OD – Occipital direito; OE – Occipital esquerdo; HD -Hemisfério direito; HE - Hemisfério esquerdo.

Durante a tarefa de leitura, 6 dos 7 indivíduos do grupo amostral apresentaram ativação do temporal direito e 5 apresentaram ativação do temporal esquerdo. Cinco indivíduos do apresentaram ativação de áreas dos lobos temporais direito e esquerdo, sendo que, 4 ativaram mais áreas no temporal direito e apenas 1 indivíduo ativou mais áreas do esquerdo. Quatro indivíduos apresentaram mais áreas ativadas no hemisfério direito e 2 no esquerdo. O caso 3 apresentou mesmo número de áreas ativadas no hemisfério direito e esquerdo (tabela 10).

**Tabela 10.** Número de áreas ativadas em cada lobo e hemisfério cerebral durante tarefa de leitura do grupo amostral.

Grupo amostral	FD	FE	TD	TE	OD	OE	HD	HE
Caso 1	3	6	12	1			15	7
Caso 2	4	3	2	4		1	6	8
Caso 3			2	1		1	2	2
Caso 5	5	7	6	2			11	9
Caso 6			2				2	0
Caso 7	1	1	4	3	1	4	6	8
Caso 8					1		1	0

**Legenda:** FD – Frontal direito; FE – Frontal esquerdo; TD – Temporal direito; TE – Temporal esquerdo; OD – Occipital direito; OE – Occipital esquerdo; HD -Hemisfério direito; HE - Hemisfério esquerdo.

Durante a tarefa de fala semi-espontânea, todos os participantes do grupo amostral apresentaram ativação do temporal direito, enquanto que 6 apresentam ativação do esquerdo. Desses 6 indivíduos que apresentaram ativação tanto do temporal direito como do esquerdo, 2 apresentaram mais áreas ativadas do temporal direito, enquanto que 3 apresentaram mais áreas ativadas no temporal esquerdo. O caso 5 ativou o mesmo número de áreas em ambos temporais. Metade (4/8) dos indivíduos do grupo amostral ativou mais áreas localizadas no hemisfério direito e a outra metade ativou mais áreas do hemisfério esquerdo. (tabelas 11).

**Tabela 11.** Número de áreas ativadas em cada lobo e hemisfério cerebral durante tarefa de fala semi-espontânea do grupo amostral

<b>Grupo amostral</b>	<b>FD</b>	<b>FE</b>	<b>TD</b>	<b>TE</b>	<b>OD</b>	<b>OE</b>	<b>HD</b>	<b>HE</b>
Caso 1			2	8	3		5	8
Caso 2	1	1	8	10			9	11
Caso 3	10	10	3		3	2	16	12
Caso 4			1				1	0
Caso 5	3	2	5	5			8	7
Caso 6			1	3			1	3
Caso 7	6	3	3	1	7		16	4
Caso 8		1	4	3	4	10	8	14

**Legenda:** FD – Frontal direito; FE – Frontal esquerdo; TD – Temporal direito; TE – Temporal esquerdo; OD – Occipital direito; OE – Occipital esquerdo; HD -Hemisfério direito; HE - Hemisfério esquerdo.

Durante a tarefa de nomeação, 3 indivíduos do grupo controle apresentaram ativação de áreas localizadas no lobo temporal direito, enquanto que 5 apresentaram ativação de áreas do lobo temporal esquerdo. Quanto à ativação dos hemisférios cerebrais, 5 participantes ativaram mais áreas do hemisfério direito e apenas 1 ativou mais áreas do esquerdo. Os controles 1 e 8 apresentaram o mesmo número de áreas ativadas em ambos hemisférios. (tabela 12).

**Tabela 12.** Número de áreas ativadas em cada lobo e hemisfério cerebral durante tarefa de nomeação do grupo controle.

Grupo controle	FD	FE	TD	TE	OD	OE	HD	HE
Controle 1			1	1			1	1
Controle 2		1		3	1		1	4
Controle 3	2						2	0
Controle 4			5		2	2	7	2
Controle 5	8	3		1		3	8	7
Controle 6					3		3	0
Controle 7	1		7	7	10	10	18	17
Controle 8	1			1			1	1

**Legenda:** FD – Frontal direito; FE – Frontal esquerdo; TD – Temporal direito; TE – Temporal esquerdo; OD – Occipital direito; OE – Occipital esquerdo; HD -Hemisfério direito; HE - Hemisfério esquerdo.

Durante a tarefa de leitura, 4 indivíduos do grupo controle apresentaram ativação do lobo temporal direito, enquanto que a ativação de áreas do lobo temporal esquerdo ocorreu em 6 indivíduos. Os 3 participantes que ativaram o temporal direito e esquerdo, apresentaram mais áreas ativadas no temporal direito. Quanto à ativação dos hemisférios cerebrais, 5 participantes ativaram mais áreas do hemisfério direito e 3 do hemisfério esquerdo. (tabela 13).

**Tabela 13.** Número de áreas ativadas em cada lobo e hemisfério cerebral durante tarefa de leitura do grupo controle..

Grupo controle	FD	FE	TD	TE	OD	OE	HD	HE
Controle 1	6	2	9	5	2		17	7
Controle 2		3		2			0	5
Controle 3	1	1	4	1	3		8	2
Controle 4		1		1			0	2
Controle 5	1						1	0
Controle 6				3			0	3
Controle 7	4	1	4	1	10	5	18	7
Controle 8			4			1	4	1

**Legenda:** FD – Frontal direito; FE – Frontal esquerdo; TD – Temporal direito; TE – Temporal esquerdo; OD – Occipital direito; OE – Occipital esquerdo; HD -Hemisfério direito; HE - Hemisfério esquerdo.

Já durante a tarefa de fala semi-espontânea, 6 indivíduos apresentaram ativação do temporal direito, e o temporal esquerdo também foi ativado em 6 indivíduos. Dos 4 participantes que ativaram ambos os temporais, 1 apresentou mais áreas ativadas no

temporal direito e 3 no esquerdo. Dois indivíduos apresentaram predominância de ativação das áreas localizadas no hemisfério direito, enquanto que 6 ativaram mais áreas do esquerdo.(tabela 14).

**Tabela 14.** Número de áreas ativadas em cada lobo e hemisfério cerebral durante tarefa de fala semi-espontânea do grupo controle.

<b>Grupo controle</b>	<b>FD</b>	<b>FE</b>	<b>TD</b>	<b>TE</b>	<b>OD</b>	<b>OE</b>	<b>HD</b>	<b>HE</b>
Controle 1			6				6	0
Controle 2	1		5	9			5	9
Controle 3	1	1	1	4			2	5
Controle 4				3			0	3
Controle 5		10	2		3	4	5	14
Controle 6	2		4	3		1	6	4
Controle 7				5	1		1	5
Controle 8	3	2	1	3			4	5

**Legenda:** FD – Frontal direito; FE – Frontal esquerdo; TD – Temporal direito; TE – Temporal esquerdo; OD – Occipital direito; OE – Occipital esquerdo; HD -Hemisfério direito; HE - Hemisfério esquerdo.

Comparando os indivíduos do grupo amostral com seus controles em relação ao lobo de maior número de áreas ativadas observamos que:

Durante a tarefa de nomeação, metade (4/8) dos pares de casos e controles tiveram maior número de áreas ativadas em lobos distintos e a outra metade hiperativaram áreas do mesmo lobo. Já na tarefa de leitura, 6/7 dos pares tiveram maior número de áreas ativadas em lobos distintos. Na tarefa de fala semi-espontânea, 7/8 pares tiveram hiperativação de áreas localizadas em lobos distintos (tabela 15). A análise da tarefa de leitura não foi realizada com o par de número 4.

**Tabela 15.** Lobos cerebrais com maior número de áreas ativadas durante cada tarefa de fala entre os indivíduos do grupo amostral e controle. Estão destacados em cinza os pares com hiperativação em lobos cerebrais distintos.

Grupos	Nomeação	Leitura	Fala semi-espontânea
Caso 1	TE	TD	TE
Controle 1	TD TE	TD	TD
Caso 2	TD	FD TE	FD TE
Controle 2	TE	FE	TE
Caso 3	TD	FD	TD
Controle 3	FD	TD	TE
Caso 4	FD FE	X	TD
Controle 4	TD	X	TE
Caso 5	FD	FE	TD OD
Controle 5	FD	FD	FE
Caso 6	TD OD	TD	TE
Controle 6	OD	TE	TD
Caso 7	OE	TD OE	OE
Controle 7	OD OE	OD	TE
Caso 8	OD	OD	OE
Controle 8	FD TE	TD	FD TE

**Legenda:** FD – Frontal direito; FE – Frontal esquerdo; TD – Temporal direito; TE – Temporal esquerdo; OD – Occipital direito; OE – Occipital esquerdo; X- Não analisado.

Comparando os indivíduos gogos com os controles quanto ao hemisfério predominante durante cada tarefa de fala, foi possível observar que, durante a tarefa de nomeação, apenas 3 pares tiveram predominância de áreas ativadas em hemisférios distintos, sendo que desses, 1 apresentou o indivíduo com gagueira com maior ativação do hemisfério direito e 2 com maior ativação do hemisfério esquerdo. Durante a tarefa de leitura apenas 2 pares tiveram maior número de áreas ativadas em hemisférios distintos, 1 com maior ativação no hemisfério direito e outro no esquerdo. Durante a tarefa de fala semi-espontânea, 7 pares tiveram predominância de áreas ativadas em hemisférios distintos, sendo que desses, 4 pares apresentaram gogos com maior ativação no hemisfério direito e 3 apresentaram gogos com maior ativação do hemisfério esquerdo (tabela 16).

**Tabela 16.** Hemisférios cerebrais com maior número de áreas ativadas durante cada tarefa de fala entre os indivíduos do grupo amostral e controle. Estão destacados em cinza os pares com hiperativação em hemisférios distintos.

Grupos	Nomeação	Leitura	Fala semi-espontânea
Caso 1	HE	HD	HE
Controle 1	HD HE	HD	HD
Caso 2	HD	HE	HE
Controle 2	HE	HE	HD
Caso 3	HE	HD HE	HD
Controle 3	HD	HD	HE
Caso 4	HD	X	HD
Controle 4	HD	X	HE
Caso 5	HD	HD	HD
Controle 5	HD	HD	HE
Caso 6	HD	HD	HE
Controle 6	HD	HE	HD
Caso 7	HE	HE	HD
Controle 7	HD	HD	HE
Caso 8	HD	HD	HE
Controle 8	HD HE	HD	HE

**Legenda:** HD: Hemisfério direito HE: Hemisfério esquerdo; X- Não analisado.

Durante a tarefa de nomeação de figuras, 5 indivíduos do grupo amostral tiveram hiperativação do lobo temporal direito e apenas 2 tiveram hipoativação comparando com os seus controles. O caso 5 e seu controle não apresentaram ativação de lobo cerebral. Quanto ao temporal esquerdo, 4 casos tiveram hipoativação comparando com seus controles (tabela 17).

**Tabela 17.** Número de áreas ativadas em cada lobo cerebral indivíduos do grupo amostral durante a tarefa de nomeação de figuras.

Grupos	Frontal direito	Frontal esquerdo	Temporal direito	Temporal esquerdo	Occipital direito	Occipital esquerdo
Caso 1			4	10		
Controle 1			1	1		
Caso 2			1			
Controle 2		1		3	1	
Caso 3			2			3
Controle 3	2					
Caso 4	6	6	4		3	3
Controle 4			5		2	2
Caso 5	1					
Controle 5	8	3		1		3
Caso 6			4		4	
Controle 6					3	
Caso 7			2			5
Controle 7	1		7	7	10	10
Caso 8	1	1	2		5	2
Controle 8	1			1		

Durante a tarefa de leitura, o lobo temporal direito foi hiperativado em 4 indivíduos do grupo amostral e hipoativado em 2 quando comparado com seus controles. O lobo occipital direito foi hipoativado ou desativado quando comparado com seus controles (tabela 18).

**Tabela 18.** Número de áreas ativadas em cada lobo cerebral indivíduos do grupo amostral e controle durante a tarefa de leitura.

Grupos	Frontal direito	Frontal esquerdo	Temporal direito	Temporal esquerdo	Occipital direito	Occipital esquerdo
Caso 1	3	6	12	1		15
Controle 1	6	2	9	5	2	
Caso 2	4	3	2	4		1
Controle 2		3		2		
Caso 3			2	1		1
Controle 3	1	1	4	1	3	
Caso 5	5	7	6	2		
Controle 5	1					
Caso 6			2			
Controle 6				3		
Caso 7	1	1	4	1	10	5
Controle 7	4	1	4	1	10	5
Caso 8					1	
Controle 8			4			1

Durante a tarefa de fala semi-espontânea, o lobo temporal direito foi hiperativado em 6 indivíduos do grupo amostral quando comparado com seus controles e em apenas 2 casos houve hipoativação. O lobo temporal esquerdo foi hipoativado em

3 casos quando comparado com seus controles e em 3 casos houve hiperativação deste lobo (tabela 19).

**Tabela 19.** Número de áreas ativadas em cada lobo cerebral em indivíduos do grupo amostral e controle durante a tarefa de Fala semi-espontânea.

Grupos	Frontal direito	Frontal esquerdo	Temporal direito	Temporal esquerdo	Occipital direito	Occipital esquerdo
Caso 1			2	8	3	
Controle 1			6			
Caso 2	1	1	8	10		
Controle 2	1		5	9		
Caso 3	10	10	3		3	2
Controle 3	1	1	1	4		
Caso 4			1			
Controle 4				3		
Caso 5	3	2	5	5		
Controle 5		10	2		3	4
Caso 6			1	3		
Controle 6	2		4	3		1
Caso 7	6	3	3	1	7	
Controle 7				5	1	
Caso 8		1	4	3	4	10
Controle 8	3	2	1	3		

## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo, 5/8 indivíduos do grupo controle apresentaram disfluências gagas, o que corrobora com outros estudos, em que as disfluências gagas também aparecem na fala de indivíduos fluentes, mas nunca ultrapassam 3%. (figura 2). Nesses estudos a porcentagem de descontinuidade de fala não ultrapassou 10%, assim como os resultados do presente estudo (MANNING; MONTE, 1981; DUCHIN; MYSAK, 1987, MARTINS; ANDRADE, 2008).

A gravidade da gagueira dos participantes deste estudo variou de leve a severa (tabela 7). Os estudos de neuroimagem e gagueira são realizados com participantes que apresentam gagueira de muito leve a severa (SALMELIN et. al., 2000; CHANG et. al., 2009) ou de leve a severa (BRAUN et. al., 1997; FOX et. al., 2000; WATKINS et. al., 2007) segundo o protocolo SSI-3 Stuttering Severity Instrument (RILEY, 1994).

Em um estudo comparando velocidade de fala com a gravidade da gagueira foi observado que existia uma relação inversamente proporcional, ou seja, quanto maior a gravidade da gagueira menor a velocidade de fala, tanto em palavras por minuto como

em sílabas por minuto (ANDRADE; CERVONE; SASSI, 2003). Neste estudo não foi encontrada essa relação (tabela 8).

Quanto à avaliação de neuroimagem, durante a tarefa de nomeação de figuras, dos 7 indivíduos do grupo amostral que ativaram áreas do temporal direito, 6 tiveram o temporal esquerdo sem ativação (tabela 9), o que corrobora com as hipóteses de que a ativação das regiões da linguagem estão deslocadas para o hemisfério direito em gogos desenvolvimentais (CHANG et. al., 2009; LOUCK et. al., 2011). Já os indivíduos do grupo controle, dos 3 que tiveram áreas do temporal direito ativadas, 2 ativaram também o temporal esquerdo (tabela 12).

Em um estudo de neuroimagem e gagueira, foi encontrada maior ativação no lobo occipital durante tarefa de leitura do que durante outras tarefas de fala (INGHAM et. al., 2012). Esse resultado não foi encontrado neste estudo.

Em nosso estudo a ativação do lobo frontal não foi maior em indivíduos gogos quando comparados com os controles, como nos achados de Chang et. al. (2009).

Pôde-se observar que, durante as tarefas de leitura e de fala semi-espontânea, a maioria dos gogos tiveram hiperativação de lóbulos diferentes de seus controles (tabela 15). Esse fato corrobora com os achados de outros estudos de que os gogos apresentam funcionamento cerebral diferente dos fluentes (FOX et. al., 1996; BRAUN et. al., 1997; FOX et. al., 2000; SALMELIN et. al., 2000; INGHAM, et. al., 2003; WATKINS et. al., 2007; CHANG et. al., 2009; LOUCK et. al., 2011)

Durante a tarefa de fala semi-espontânea, 7 indivíduos do grupo amostral e seus controles apresentaram predominância de ativação em hemisférios distintos. Quatro desses participantes apresentaram o hemisfério direito com predominância de ativação (tabela 16). Essa análise corrobora com os estudos em que o hemisfério direito é mais ativo em gogos quando comparados com seus controles (FOX et. al., 1996; BRAUN et. al., 1997; DE NIL. Et. al., 2008; CHANG et. al., 2009; LOUCK et. al., 2011; SATO et. al., 2011)

Independente da tarefa de fala realizada houve hiperativação do lobo temporal direito em pelo menos metade (4/8) dos indivíduos do grupo amostral quando comparados com seus controles (tabelas 17, 18 e 19), o que corrobora com os achados de Chang et. al. (2009).

O LOBO TEMPORAL ESQUERDO FOI HIPOATIVADO EM METADE (4/8) DOS INDIVÍDUOS DO GRUPO AMOSTRAL DURANTE A TAREFA DE NOMEAÇÃO (TABELA 17), O QUE CORROBORA COM OS ESTUDOS QUE AFIRMAM QUE AS ÁREAS RESPONSÁVEIS PELA LINGUAGEM SÃO HIPOATIVADAS EM INDIVÍDUOS COM GAGUEIRA QUANDO COMPARADOS COM OS CONTROLES (FOX ET. AL., 1996; CHANG ET. AL., 2009).

## **6. CONCLUSÃO**

Todos os tópicos da avaliação fonoaudiológica tiveram resultados diferentes entre os gagos e seus controles (porcentagem de disfluências gagas, descontinuidade de fala e velocidade de fala).

A avaliação genética não mostrou variações entre os gagos e seus controles, desta forma, não foram realizadas correlações com esta variável biológica.

Os resultados de neuroimagem funcional mostraram que houve variação entre gagos e controles quanto ao hemisfério e/ou lobo cerebral ativado. A hiperativação do lobo temporal direito e hipoativação do esquerdo, encontrada em indivíduos com GDPF, pode sugerir que as áreas responsáveis pela linguagem são hipoativadas em indivíduos com gagueira quando comparados com os controles, e ainda, que a hiperativação pode significar deslocamento para o hemisfério direito.

Diante dos achados deste estudo foi possível observar que existem variações biológicas em indivíduos com GDPF, comparados com os controles, do ponto de vista fonoaudiológico, e neurológico.

Cabe ressaltar a importância de identificar variações biológicas em indivíduos com GDPF. A identificação de variações biológicas, principalmente genéticas e neurológicas, pode ser determinante para o entendimento da etiologia da patologia, podendo, essas variações, serem relevantes para o diagnóstico e prognóstico dos pacientes.

## 7. BIBLIOGRAFIA

ANDRADE, C.R.F. Estudo diagnóstico de um caso de gagueira desenvolvimental com uso de Pet (Positron Emission Tomography). **Pró-fono**, Barueri, v.13, n.2 p.152-6, Set. 2001.

ANDRADE, C.R.F.; CERVONE, L. M.; SASSI, F. C. Relationship between the stuttering severity index and speech rate. **Medical Journal**, Sao Paulo, v.121, n.2, p.81-84, 2003.

ANDRADE, C.R.F. Fluência (Parte C). In: ANDRADE, C.R.F., BÉFI-LOPES, D.M., FERNANDES, F.D.M.; WERTZNER, H.F. (Org. ). **ABFW - Teste de Linguagem Infantil nas áreas de Fonologia, Vocabulário, Fluência e Pragmática**. 2.ed. Barueri: Pró-Fono, 2004b, p. 51-81.

ANDRADE, C.R.F. Perfil da fluência da fala: parâmetros comparativo diferenciado por idade para crianças, adolescentes, adultos e idosos. Série livros digitais de pesquisa financiados por agências de fomento. 1. ed. Barueri: **Pró-Fono**, 2006.

BRAUN, A. R., et al. Altered patterns of cerebral activity during speech and language production in developmental stuttering. An H2 15O positron emission tomography study. **Brain**, v.120, p.761-84, May. 1997.

BROWN, S. et. al. Stuttered and fluent speech production: an ALE meta-analysis of functional neuroimaging studies. **Hum Brain Mapp**, v.25, n.1, p.105-17. May 2005.

BUCHBINDER, B.R; COSGROVE, G. R. Cortical activation MR studies in brain disorders. **MRI Clin N Am**, v.6, n,1, p.67-93, Feb. 1998.

CHANG, S. E., et. al. Brain activation abnormalities during speech and non-speech in stuttering speakers. **Neuroimage**, v.46, n.1, p.201-12, May 2009.

DE NIL, L. F.; KROLL, R. M.; KAPUR, S. A positron emission tomography study of silent and oral single word reading in stuttering and nonstuttering adults. **J Speech Lang Hear Res.** v.43, n.4. p.1038-53, Aug. 2000.

DE NIL, L. F.; KROLL, R. M.; HOULE, S. Functional neuroimaging of cerebellar activation during single word reading and verb generation in stuttering and nonstuttering adults. **Neuroscience Letters**, v.302, n.2-3 p.77-80, 2001.

DE NIL, L. F., The effects of simulated stuttering and prolonged speech on the neural activation patterns of stuttering and nonstuttering adults. **Brain and Language**, v. 107, n. 2, p.114-123, 2008.

DUCHIN, S.W.; MYSAK, E.D. Disfluency and rate characteristics of young adult, middle-age, and older males. **J. Commun Disord.**, v. 20, n. 3, p.245-57, Jun. 1987.

FOX, P. T. et. al. A PET study of the neural systems of stuttering. **Nature**, v.382, n.6587, p.158-61, Jul. 1996.

FOX, P. T. et al. Brain correlates of stuttering and syllable production. A PET performance-correlation analysis. **Brain**, v.123, n.10, p. 1985-2004, Oct. 2000.

INGHAM, R.J. et al. Functional-lesion investigation of developmental stuttering with positron emission tomography. **J Speech Hear Res**, v.39, n.6, p.1208–27, Dec. 1996.

INGHAM, R. J. et. al. Towards a functional neural systems model of developmental stuttering. **J Fluency Disord**, v. 28, n. 4, p. 297-317, 2003.

INGHAM, R.J. et al. Brain activity in adults who stutter: similarities across speaking tasks and correlations with stuttering frequency and speaking rate. **Brain Lang**, v.122, n.1, p. 11-24, Jul. 2012.

LOUCKS, T. et. al. Functional brain activation differences in stuttering identified with a rapid fMRI sequence. **J Fluency Disord.**, v.36, n.4, p.302–7. Dec. 2011.

LU, C. et. al. The neural substrates for atypical planning and execution of word production in stuttering. **Exp Neurol.** v.221, n.1, p.146-56, 2010.

MANNING, W. H., MONTE, K. L. Fluency breaks in older speakers: Implications for a model of stuttering throughout the life cycle. **J Fluency Disord.** v. 6, p.35-48. 1981

MARTIN, M.G.M. **Ressonância magnética funcional em indivíduos normais:** base de dados do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 2007. 250f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5151/tde-25062009-103809/pt-br.php>>.

MARTINS, V. O, ANDRADE, C. R. F. Perfil evolutivo da fluência da fala de falantes do português brasileiro. **Pró-Fono**, v. 20, n. 1, p. 7-12. 2008.

OGAWA, S., LEE, T. M, KAY, A. R., TANK, D. W. Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.87, n.24, p.9868-72. 1990.

OLDFIELD, R. C. The assessment and analysis of handedness: The Edinburgh inventory, **Neuropsychologia**, v. 9, n. 1, p. 97-113, Mar, 1971.

ORTON, S. Studies in stuttering. **Archives of Neurology and Psychiatry**, v.18, p.671-2, 1927.

ORTON, S.; TRAVIS, L. E. Studies in stuttering: IV. Studies of action currents in stutterers. **Arch. Neur. Psych.**, v.21, p.61-8, 1929.

RILEY, G.D. **Stuttering Severity Instrument for Children and Adults (SSI-3).** Austin: Pro-Ed. 1994.

SALMELIN, et al. Single word reading in developmental stutterers and fluent speakers. **Brain**, v.123, p.1184-202, Jul. 2000.

SATO, Y, et. al. Functional lateralization of speech processing in adults and children who stutter. **Frontiers in Psychology**, v. 2, p.1-10. Apr. 2011.

WATKINS, K.E, et. al. Structural and functional abnormalities of the motor system in developmental stuttering. **Brain**, v.131, p.50-9, Jan. 2007.

ZACKIEWICZ, D.V. Avaliação quantitativa e qualitativa das disfluências em indivíduos gagos e fluentes. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo. 1999.

## 8. ANEXOS

### 8.1. ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO  
PROJETO DE PESQUISA:  
“VERIFICAÇÃO DE DIFERENÇAS BIOLÓGICAS ENTRE GAGUEIRA FAMILIAL E GAGUEIRA ISOLADA”

Nós estamos convidando você a participar do projeto de pesquisa intitulado “Verificação de diferenças biológicas entre a gagueira familiar e a gagueira isolada” do Serviço de Aconselhamento Genético (SAG) – UNESP - Botucatu cujo responsável é a fonoaudióloga Breila Vilela de Oliveira, aluna de pós-graduação (mestrado) sob orientação do Prof. Dr. Danilo Moretti-Ferreira.

Gostaríamos que você soubesse que:

- Participar deste projeto é uma opção sua, podendo decidir participar ou não;
- A qualquer momento você terá a liberdade de buscar junto ao responsável pelo projeto, esclarecimentos de qualquer natureza, inclusive os relativos à metodologia de trabalho.
- Sua participação nesta pesquisa é total e completamente isenta de qualquer ônus financeiro. Caso você venha a ter qualquer despesa decorrente de sua participação nesta pesquisa, será imediatamente ressarcido, mediante a devolução dos valores despendidos.
- Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.
- Você receberá uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
- O presente trabalho tem por objetivos:

Diagnosticar indivíduos gagos e caracterizá-los por meio de avaliações realizadas por fonoaudiólogo no Serviço de Aconselhamento Genético (SAG) – UNESP – Botucatu.

A partir de um indivíduo diagnosticado como gago serão realizadas três metodologias de estudos diferentes:

#### 1. Fonoaudiologia

- Filmagem de uma amostra de fala;
- Análise da amostra de fala e diagnóstico fonoaudiológico quanto à fluência de fala.

#### 2. Genética

- Coleta de uma amostra de 3 ml de sangue (1 colher de sopa) do portador de gagueira no qual será realizado um estudo buscando fatores genéticos causadores da gagueira;
  - A coleta de sangue pode causar algum desconforto físico e existe um risco de ocorrer uma mancha roxa (hematoma) na região da coleta;
  - Análise molecular de genes suspeitos de estarem envolvidos na etiologia ( causa) da gagueira.
- O material biológico (DNA) excedente será armazenado em nossos bancos de estoque, que tem seu regimento em aprovação pelo CEP – FMB - UNESP e poderá ser usado em futuras pesquisas aprovadas pelos CEPs, sempre com seu consentimento prévio.

#### 3. Neurologia

- Realização de um exame de Neuroimagem Funcional (Ressonância Magnética Funcional) no portador de gagueira para que seja realizado um estudo buscando fatores neurológicos causadores da gagueira.
  - A Ressonância Magnética Funcional é um exame neurológico não invasivo durante o qual você deverá realizar algumas tarefas de fala solicitadas por um fonoaudiólogo.
  - Durante o exame você poderá sentir um leve aquecimento em alguns pontos de seu corpo.
- Com esta pesquisa, esperamos ampliar o conhecimento sobre a origem da gagueira. Se você decidir participar gostaríamos de informar-lhe que:
- a) Os resultados deste estudo talvez não sejam de benefício imediato para você ou sua família.
  - b) Vocês estarão colaborando para aumentar os nossos conhecimentos sobre a origem da Gagueira.
  - c) Os resultados poderão demorar meses para ficarem prontos.
  - d) Assim que existam resultados, estes serão apresentados a vocês pelos responsáveis.

e) Os resultados deverão ser publicados em revistas científicas que circulam entre os profissionais da saúde que tenham interesse nesta área.

f) Sempre que ocorrerem publicações científicas a sua identidade será mantida em absoluto sigilo.

g) Somente pesquisadores envolvidos com o projeto terão acesso aos dados completos, não sendo permitido o acesso aos dados por terceiros.

l) Os pesquisadores se responsabilizam por reparar danos eventuais associados e/ou decorrentes da pesquisa, sejam eles imediatos ou tardios, inclusive no que diz respeito às indenizações.

Eu, \_\_\_\_\_ portador do R.G. nº \_\_\_\_\_ concordo em participar do projeto de pesquisa “Verificação de diferenças biológicas entre a gagueira familiar e a gagueira isolada”. Declaro haver recebido as devidas explicações sobre o referido projeto, estar ciente sobre os itens acima mencionados e minha participação é voluntária por opção própria.

Local e Data: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

\_\_\_\_\_  
Breila Vilela de Oliveira  
Responsável pela Pesquisa

Responsável pela pesquisa: Breila Vilela de Oliveira

Fone: (14) 3815-3131

Endereço: Rubião Junior S/N – UNESP – Campus de Botucatu - Depto. de Genética – Serviço de Aconselhamento Genético Botucatu/SP – CEP:18.618-000

[breila@ibb.unesp.br](mailto:breila@ibb.unesp.br)

Eu, \_\_\_\_\_ portador do R.G. nº \_\_\_\_\_,

- Autorizo  
 Não autorizo

que minha amostra de DNA fique depositada no Banco de DNA do Serviço de Aconselhamento Genético da UNESP de Botucatu.

“Qualquer dúvida adicional, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, através do fone: (14) 3811-6143.”

## 8.2. ANEXO 2

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### PROJETO DE PESQUISA:

#### “VERIFICAÇÃO DE DIFERENÇAS BIOLÓGICAS ENTRE GAGUEIRA FAMILIAL E GAGUEIRA ISOLADA” GRUPO CONTROLE

Você, por não ser gago, está sendo convidado a compor o grupo controle do projeto intitulado “**Verificação de diferenças biológicas entre a gagueira familiar e a gagueira isolada**” do Serviço de Aconselhamento Genético (SAG) – UNESP - Botucatu cujo responsável é a fonoaudióloga Breila Vilela de Oliveira, aluna de pós-graduação (mestrado) sob orientação do Prof. Dr. Danilo Moretti-Ferreira. O presente trabalho tem por **objetivo** diagnosticar indivíduos gagos e caracterizá-los por meio de avaliações realizadas por um fonoaudiólogo. A partir de um indivíduo considerado gago, comparamos com um grupo controle de não gagos (fluentes). Esperamos com este estudo ampliar o conhecimento sobre a origem da gagueira.

Gostaríamos que você soubesse que:

- Participar deste projeto é uma opção sua, podendo decidir participar ou não;
- A qualquer momento você terá a liberdade de buscar junto ao responsável pelo projeto, esclarecimentos de qualquer natureza, inclusive os relativos à metodologia de trabalho.
- Sua participação nesta pesquisa é total e completamente isenta de qualquer ônus financeiro. Caso você venha a ter qualquer despesa decorrente de sua participação nesta pesquisa, será imediatamente ressarcido, mediante a devolução dos valores despendidos.
- Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.
- Você receberá uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
- Se você decidir participar gostaríamos de informar-lhe que:
  - a) Serão realizadas três metodologias de estudos diferentes:
    1. Fonoaudiologia
      - Filmagem de uma amostra de fala;
      - Análise da amostra de fala e diagnóstico fonoaudiológico quanto à fluência de fala, para confirmarmos que você não é gago.
      - Caso seja diagnosticado como gago, você será orientado e encaminhado para tratamento, se desejar.
    2. Genética
      - Coleta de uma amostra de 3 ml de sangue (1 colher de sopa)
      - A coleta de sangue pode causar algum desconforto físico e existe um risco de ocorrer uma mancha roxa (hematoma) na região da coleta;
      - O material biológico (DNA) excedente será armazenado em nossos bancos de estoque, que tem seu regimento em aprovação pelo CEP – FMB - UNESP e poderá ser usado em futuras pesquisas aprovadas pelos CEPs, sempre com seu consentimento prévio.
    3. Neurologia
      - Realização de um exame de Neuroimagem Funcional (Ressonância Magnética Funcional).
      - A Ressonância Magnética Funcional é um exame neurológico não invasivo durante o qual você deverá realizar algumas tarefas de fala solicitadas por um fonoaudiólogo.
      - Durante o exame você poderá sentir um leve aquecimento em alguns pontos de seu corpo.
  - b) Os resultados deste estudo talvez não sejam de benefício imediato para você.
  - c) Você estará colaborando para aumentar os nossos conhecimentos sobre a origem da Gagueira.
  - d) Os resultados poderão demorar meses para ficarem prontos.
  - e) Os resultados deverão ser publicados em revistas científicas que circulem entre os profissionais da saúde que tenham interesse nesta área.
  - f) Sempre que ocorrerem publicações científicas a sua identidade será mantida em absoluto sigilo.
  - g) Somente pesquisadores envolvidos com o projeto terão acesso aos dados completos, não sendo permitido o acesso aos dados por terceiros.
  - h) Os pesquisadores se responsabilizam por reparar danos eventuais associados e/ou decorrentes da pesquisa, sejam eles imediatos ou tardios, inclusive no que diz respeito às indenizações.

Eu, \_\_\_\_\_ portador do R.G. nº \_\_\_\_\_ concordo em participar do projeto de pesquisa “Verificação de diferenças biológicas entre a gagueira familiar e a gagueira isolada”. Declaro haver recebido as devidas explicações sobre o referido projeto, estar ciente sobre os itens acima mencionados e minha participação é voluntária por opção própria.

Local e Data: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

\_\_\_\_\_  
Breila Vilela de Oliveira  
Responsável pela Pesquisa

**Responsável pela pesquisa: Breila Vilela de Oliveira**

Fone: (14) 3815-3131

Endereço: Rubião Junior S/N – UNESP – Campus de Botucatu - Depto. de Genética – Serviço de Aconselhamento Genético Botucatu/SP – CEP:18.618-000

[breila@ibb.unesp.br](mailto:breila@ibb.unesp.br)

Eu, \_\_\_\_\_ portador do R.G.  
nº \_\_\_\_\_,

- Autorizo  
 Não autorizo

que minha amostra de DNA fique depositada no Banco de DNA do Serviço de Aconselhamento Genético da UNESP de Botucatu.

“Qualquer dúvida adicional, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, através do fone: (14) 3811-6143.”

## 8.3. ANEXO 3

	<b>Universidade Estadual Paulista Faculdade de Medicina de Botucatu</b>	
Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143 e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br		Registrado no Ministério da Saúde em 30 de abril de 1997
Botucatu, 01 de agosto de 2011.		Of. 320/11-CEP
Ilustríssimo Senhor Prof. Dr. Danilo Moretti-Ferreira Departamento de Genética do Instituto de Biociências de Botucatu		
Prezado Prof. Danilo,		
De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa - (Protocolo CEP 3944-2011) " <b>Verificação de diferenças Biológicas entre a gagueira familiar e a gagueira isolada</b> ", a ser conduzido por Breila Vilela de Oliveira, orientada por Vossa Senhoria, com a colaboração dos Profs. Dr.s Altamir Santos Teixeira e Regina Helena Garcia Martins, recebeu do relator, parecer favorável, aprovado em reunião do CEP de 01 de Agosto de 2.011.		
Situação do Projeto: <b>APROVADO</b> . Ao final da execução do Projeto, apresentar ao CEP " <b>Relatório Final de Atividades</b> ".		
Atenciosamente,		
		
Alberto Santos Capelluppi Secretário do CEP.		

#### 8.4. ANEXO 4

##### Edinburgh Handedness Inventory

Surname \_\_\_\_\_ Given Name \_\_\_\_\_

Date of Birth \_\_\_\_\_ Sex \_\_\_\_\_

Please indicate your preferences in the use of hands in the following activities by *putting + in the appropriate column*. Where the preference is so strong that you would never try to use the other hand unless absolutely forced to, *put ++*. If any case you are really indifferent put + in both columns.

Some of the activities require both hands. In these cases the part of the task, or object, for which hand preference is wanted is indicated in brackets.

Please try to answer all the questions, and only leave a blank if you have no experience at all of the object or task.

	Left	Right
1. Writing		
2. Drawing		
3. Throwing		
4. Scissors		
5. Toothbrush		
6. Knife (without fork)		
7. Spoon		
8. Broom (upper hand)		
9. Striking Match (match)		
10. Opening box (lid)		