

Carlos Eduardo F. Domingues

**Estudos moleculares das regiões  
cromossômicas 18p e 18q proximal em  
portadores de gagueira persistente familiar**

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia da Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,  
Campus de Botucatu, para obtenção  
do título de Mestre em Ciências  
Biológicas, área de concentração:  
Genética

Orientador: Prof. Dr. Danilo Moretti-Ferreira

Botucatu

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
*BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus*

Domingues, Carlos Eduardo F.

Estudos moleculares das regiões cromossômicas 18p e 18q proximal em portadores de gagueira persistente familiar / Carlos Eduardo F. Domingues. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2009.

Orientador: Danilo Moretti-Ferreira

Assunto CAPES: 20200005

1. Genética humana 2. Distúrbios da fala - Aspectos genéticos 2. Gagueira

CDD 575

CDD 616.8554

Palavras-chave: Análise de associação; Cromossomo 18; Disfluência; Gagueira persistente familiar; Microssatélites

À **Deus**, pelo amor incondicional, por ser a origem e o fim de tudo, e por estar sempre pronto para nos ouvir, perdoar e acolher.

Aos meus pais, **Antonio e Maria**, pelos exemplos de amor, dedicação, perseverança, justiça e honestidade, que têm sempre me ajudado a superar as dificuldades e buscar a paz e a tranquilidade interior.

À minha querida irmã, **Ana Paula**, por ser minha companheira e pelo exemplo de alegria, amor e carinho.

À **Patricia Sanches**, pelo amor, carinho, compreensão, fidelidade e companheirismo. Agradeço a suas palavras de incentivo, apoio e toda a ajuda incondicional, dando-me forças para a conclusão deste trabalho.

***Às famílias com portadores de gagueira que colaboram com este estudo.***

*... dedico este trabalho.*

## ***Agradecimentos***

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP – Campus Botucatu e a todo corpo docente e funcionários, pelo aprendizado.

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

Ao Serviço de Aconselhamento Genético

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida (2006/05522-1) e pelo Auxílio Financeiro (2007/02561-9).

Ao meu orientador Prof. Dr. Danilo Moretti-Ferreira, pelos ensinamentos e amizade. Por ter sempre depositado sua confiança em mim, pela forma hábil de contornar problemas no transcórre dos trabalhos e viabilizar a conclusão deste estudo.

À Profa. Dra. Renata Lucia Leite Ferreira de Lima, da Universidade Federal da Bahia pelos conselhos, ensinamentos, incentivos, ajuda e amizade.

À Profa. Dra. Cristiane Moço Canhetti de Oliveira, do Departamento de Fonoaudiologia da Unesp de Marília, pela triagem das famílias, pelo auxílio nas visitas e pelo apoio.

À Profa. Dra. Claudia Regina Furquim de Andrade e equipe, do Departamento de Fisioterapia, Fonoaudiologia e Terapia Ocupacional da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela triagem das famílias e pelo auxílio nesse trabalho.

Ao Prof. Dr. Henrique Krieger e ao Dr. Ricardo de Godói Mattos Ferreira, do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela cooperação na avaliação dos resultados.

Ao Prof. Dr. Celso Luis Marino, do Departamento de Genética do Instituto de Biociências – Unesp – Botucatu, por ter disponibilizado o uso do seqüenciador para a realização das análises.

À Dra. Virgínia Elias Coscrato e ao doutorando Júlio César Santos Otto, pelo auxílio, grande apoio e otimismo.

Ao Msc. Gustavo Henrique Vieira, meu grande amigo e companheiro, pela ajuda e apoio neste trabalho.

Aos meus amigos Bruno Gamba e ao Marcos Leite Santoro, pela força que me deram e por sempre estarem disponíveis em ajudar.

À Dra. Deise Helena Souza e a Rosana Aparecida Bicudo da Silva que me apoiaram e incentivaram nos momentos mais delicados.

Aos funcionários da pós-graduação.

Ao meu amigo Henrique Krambeck Rofatto, pela amizade, conselhos. Por estar sempre disponível em me acolher em São Paulo nos momentos que mais precisei.

Aos meus amigos Uilian, Marina, Celso, Thiago, Lucas, pelos conselhos e apoio.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente na conclusão desse trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	3
LISTA DE TABELAS .....	4
RESUMO .....	5
SUMMARY .....	7
1. INTRODUÇÃO .....	9
1.1. Definições de gagueira .....	9
1.2. Classificação da gagueira .....	11
1.3. Diagnóstico da gagueira .....	13
1.4. Prevalência .....	13
1.5. Etiologia da gagueira – fatores genéticos e ambientais .....	14
1.5.1. Fatores Ambientais .....	15
1.5.2. Fatores Genéticos .....	15
1.6. Aspectos moleculares, fisiológicos e anatômicos da gagueira .....	17
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS .....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	24
3.1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	24
3.2. Casuística .....	24
3.2.1. Critérios fonoaudiológicos de inclusão .....	25
3.2.2. Critérios fonoaudiológicos de exclusão .....	25
3.2.3. Diagnóstico de gagueira e seleção das famílias .....	25
3.2.4. Histórico Clínico .....	26
3.2.5. Confiabilidade da avaliação da fluência .....	27
3.3. Obtenção das amostras biológicas .....	28
3.4. Obtenção do DNA genômico .....	28
3.5. Análise Molecular .....	29
3.5.1. Locus e iniciadores microssatélites .....	29
3.5.1.1. Região 18p .....	30
3.5.1.2. Região 18q proximal .....	30
3.5.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	33
3.5.3. Genotipagem dos microssatélites .....	35
3.6. Procedimentos analíticos .....	36
3.6.1. Estimativas de frequências alélicas e genótípicas .....	36
3.6.2. Análise de segregação complexa .....	36
3.6.3. Análise dos genótipos .....	37
3.6.4. Estudos de associação .....	37
4. RESULTADOS .....	39

4.1. Grupo amostral .....	39
4.2. Análise molecular .....	48
4.3. Análise dos dados .....	67
4.3.1. Frequencias alélicas .....	67
4.3.2. Diversidade gênica .....	67
4.3.3. Análise de Associação .....	68
4.3.4. Análise dos genótipos .....	69
4.3.5. Análise de segregação complexa .....	69
5. DISCUSSÃO .....	83
6. CONCLUSÃO .....	85
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	86
ANEXO A: .....	101
ANEXO B: .....	109

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração do cromossomo 18.....	31
Figura 2. Ilustração dos marcadores microssatélites.....	35
Figura 3. Heredogramas .....	40
Figura 4. Heredogramas / alelos.....	49
Figura 5. Ilustração dos dados – programa FBAT / modelos.....	78
Figura 6. Ilustração dos dados – programa FBAT / frequência dos haplótipos.....	78
Figura 7. Ilustração dos dados de análise de segregação.....	82



## LISTA DE TABELAS

Tabela 01 Resultado dos estudos moleculares realizados.....	20
Tabela 02 Ficha descritiva dos marcadores microsatélites.....	32
Tabela 03 Programa modelo para amplificação.....	34
Tabela 04 Temperatura de anelamento dos marcadores microsatélites.....	34
Tabela 05. Caracterização do grupo amostral.....	47
Tabela 06. Distribuição do número de amostras e porcentagem de erro.....	71
Tabela 07 Frequências dos marcadores microsatélites.....	72
Tabela 08 Índice de homozigose e heterozigose dos marcadores microsatélites..	73
Tabela 09 Frequência dos haplótipos do grupo 01.....	74
Tabela 10 Frequência dos haplótipos do grupo 02.....	76
Tabela 11 Associação alélica.....	79
Tabela 12 Associação genotípica.....	80
Tabela 13 Análise de segregação.....	81

## RESUMO

A gagueira é um distúrbio da comunicação, mais especificamente da fluência, onde há interrupções e alterações na velocidade do fluxo da fala. Acomete de 3 a 4% dos indivíduos do sexo masculino e de 1 a 2% do sexo feminino, em algum momento de suas vidas. A frequência pode variar de acordo com a idade: entre crianças em idade pré-escolar de 2,4% a 5% e em idade escolar 1%. Em adultos, estima-se que de 1 a 2% sofram com este distúrbio. Em todas as idades, a gagueira parece ser mais comum no sexo masculino do que no feminino, sendo de 4 a 5 M : 1 F em adultos. Em estudos de subgrupos de gagueira persistente familiar, a proporção entre os indivíduos foi de apenas 1,5 M : 1 F. A triagem genômica em famílias de gogos provenientes da América do Norte e da Europa demonstrou a existência de um locus de predisposição a gagueira familiar no cromossomo 18 envolvendo a região 18p e um segundo locus na região 18q proximal, sugerindo que exista um locus de predisposição a gagueira familiar no cromossomo 18 e que genes adicionais possam existir, além dos fatores ambientais. O objetivo deste trabalho foi a análise de associação nas regiões cromossômicas 18p e 18q proximal através de marcadores microssatélites (2 cM) em 31 famílias brasileiras com gagueira persistente, com mais de um indivíduo gago em idade acima de 6 anos. Utilizou-se para a classificação da gagueira, o SSI aplicado por profissionais especializados nesta disfluência. Foram incluídos todos os indivíduos disponíveis do núcleo familiar, independente do sexo, etnia, escolaridade e nível social. Todos os participantes tiveram amostras de seu DNA coletados a partir de amostras de sangue periférico. Foram selecionados 14 marcadores microssatélites do cromossomo 18, genotipados após PCR em seqüenciador

automático. Na análise dos dados foram utilizados programas SIMWALK 2, FBAT e POINTER. A análise de associação entre os 13 marcadores microssatélites (um excluído por não ser informativo) e a gagueira, demonstrou não-associação deste fenótipo com o cromossomo 18 na população brasileira estudada.

**Palavras chaves:** gagueira persistente familiar, microssatélites, análise de associação, cromossomo 18, disfluência

## SUMMARY

Stuttering is a communication disorder, or more precisely, a fluency disorder that causes speech interruptions and changes in speech flow rate. It affects 3-4% of males and 1-2% of females at some point in their lives. Its frequency may vary with age – it has been reported to be 2.4-5% among children of pre-school age and 1% at school age. In adults, it ranges from 1 to 2%. At all ages, stuttering seems to be more frequent in males than in females, being 4-5M:1F among adults. Studies in subsets of familial persistent stuttering showed a sex ratio of only 1.5M:1F. A genome scan in stuttering families from North America and Europe demonstrated the presence of a predisposing locus for family stuttering on chromosome 18 involving the 18p region and a second locus on proximal 18q (Shugart et al.,2004), suggesting that chromosome 18 may harbor a predisposing locus for this disorder, and that additional genes may exist besides environmental factors. The purpose of this study was to perform the association analysis of chromosomal regions 18p and proximal 18q using microsatellite markers (2 cM) in 31 Brazilian families with at least two stuttering members aged more than 6 years. Stuttering was classified by specialized professionals using SSI. All family members available, regardless of gender, ethnicity, educational or social level were assessed provided that they were older than 6 years. DNA samples from peripheral blood of all participants were collected. Fourteen chromosome 18 microsatellites were genotyped after PCR by automated sequencing. Data were analyzed with software SIMWALK 2, FBAT and POINTER. Association analysis revealed no association of stuttering with 13 microsatellites (one was excluded for being noninformative)

demonstrating no association between this phenotype and chromosome 18 in the study population.

Key words: familial persistent stuttering; microsatellites, association analysis, chromosome 18, disfluências

# 1.INTRODUÇÃO

## 1.1. Definições de gagueira

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a gagueira é “um distúrbio no ritmo da fala no qual o indivíduo sabe precisamente o que quer dizer, mas ao mesmo tempo é incapaz de dizê-lo devido à repetição involuntária, ao prolongamento ou à cessação do som”.

Desta forma, a gagueira está incluída dentro do grupo dos distúrbios da comunicação, mais especificamente da fluência, onde há interrupções e alterações na velocidade do fluxo da fala. Indivíduos gagos se deparam com inúmeros problemas de relacionamento no âmbito familiar e social desde a infância, a partir do instante em que a dificuldade de comunicação é notada pelos familiares que, geralmente, os corrigem, revelando o desconforto que sentem dessa forma de comunicação (Canhetti-Oliveira, 2004).

A gagueira é uma desordem da comunicação oral, complexa e geralmente se inicia na infância (Andrade et al., 2001), sendo freqüentemente, experimentada pelo indivíduo como uma perda de controle da própria fala (Cooper, 1993; Perkins, Kent & Curlee, 1991).

A fluência é um aspecto de produção de fala a que se refere à continuidade, suavidade, velocidade e/ou esforço, com as quais as unidades da linguagem fonológica, lexical, morfológica e/ou sintática são expressas (ASHA, 1999).

Segundo Brandi (1990) a fluência é caracterizada pela seqüência (organização temporal dos fonemas numa realidade lingüística), pela duração (tempo que dura a articulação do elemento fonético), pela velocidade (rapidez com que os elementos fonéticos são articulados) e pelo ritmo (forma da velocidade da fala). Esses quatro parâmetros, descritos como disfluências, são freqüentemente alterados.

Todos os falantes apresentam momentos de disfluência na fala, freqüentemente caracterizadas como típicas (Duchin & Mysak, 1987; Perkins, 1990; Van Riper &

Emerick, 1990; Yairi & Ambrose, 1992a; Yairi et al., 1993; Throneburg et al., 1994; Bloodstein, 1995; Cordes & Ingham, 1995; Leeper & Culatta, 1995; Degiovani et al., 1999; Zackiewicz, 1999). Estas disfluências são tidas como incertezas lingüísticas relacionadas à formulação das frases ou pronúncia das palavras (Perkins, 1990).

Entretanto, existem as disfluências atípicas, relacionadas ao comportamento dos indivíduos gagos (Riley, 1972; Bloodstein & Grossman, 1981; Schwartz & Conture, 1988; Peters & Guitar, 1991; Yairi & Ambrose, 1992a; Yairi et al., 1993; Throneburg et al., 1994; Bloodstein, 1995; Leeper & Culatta, 1995; Degiovani et al., 1999; Zackiewicz, 1999). Certos comportamentos podem definir a gagueira: repetição ao nível do fonema, da sílaba ou do sintagma; alongamento de sons; bloqueios na fonação; posições articulatórias fixas; pausas silenciosas; frases incompletas; inserção de sons estranhos à fala; mudanças súbitas na tonalidade e na intensidade da voz; falha no ritmo; falta de sincronização entre a respiração e a fonação; introdução sistemática de pequenas frases ou interjeições; esforço motor durante a fala. Observa-se também neste distúrbio a presença de comportamentos associados, chamados de comportamentos “secundários”, “compensatórios” ou “acessórios”. Tais comportamentos incluem categorias como comportamento de evitação (não falar quando deseja fazê-lo, utilizar sinônimos para palavras temidas, parafrasear a emissão pretendida), artifícios de atraso (utilizar palavras sem significado ou palavras de preenchimento ou esperar para tentar falar), iniciadores (piscar os olhos, inspirar fundo antes de iniciar a fala, antecipar um momento de fala para iniciar a emissão da palavra temida), reações de disfarce (cobrir a boca simulando uma tosse para esconder o fato de estar gaguejando), reações de interrupção (sacudir a cabeça ou fazer caretas para sair de um bloqueio), movimentos de busca (usar hesitações ou vogal inapropriada ou alterar a velocidade de sons e sílabas repetidas), entre outros (Andrade et al., 2001).

Nas últimas décadas, a gagueira tem sido relacionada a uma excessiva elevação da tensão na musculatura vocal, oral ou respiratória. Desta forma, manifestando-se

quando estão presentes níveis muito altos de atividade dos músculos responsáveis pelos movimentos específicos da fala. A atividade muscular extrínseca à fala é, da mesma forma que os comportamentos observáveis e a antecipação da gagueira, uma reação parcialmente aprendida, exacerbada pelo medo e desenvolvida, na maioria dos casos, na infância. Esta atividade é incorporada aos padrões semiautomáticos de controle motor da fala, que é resultado de seqüências programadas de movimentos de fala. Assim, na gagueira, certo número de reações secundárias, comportamentais e emocionais, devem ser consideradas, sendo que muitas destas reações podem ocorrer em resposta às sensações de extrema atividade muscular externa, que pode precipitar os comportamentos observáveis da gagueira, não apenas em virtude da antecipação ou luta, mas também pelo medo, excitação, pressão ambiental, fala rápida e até mesmo por certas variações linguísticas (Starkweather, 1995).

## **1.2. Classificação da gagueira**

Diversos estudos buscaram traçar um perfil característico da gagueira, o qual permitisse diferenciá-la em suas diversas formas. Um dos desafios era diferenciar crianças, que começavam a gaguejar e que apresentavam um alto risco de se tornarem gegas persistentes, daquelas propensas a terem uma recuperação espontânea.

Trabalhos anteriores sugeriram alguns sinais que levariam a gagueira persistente, mas nenhum deles havia feito até então um estudo longitudinal. Yairi & Ambrose (1992a) realizaram um estudo preliminar com o objetivo de acompanhar o desenvolvimento da fala em crianças. Durante vários anos e por meio de observações periódicas, registraram e testaram as variações na sintomatologia da gagueira com a finalidade de encontrar indicadores que diferenciassem precocemente a gagueira persistente daquela recuperada espontaneamente. Foram encontrados indicativos de



que as diferenças entre o grupo de gogos persistentes e gogos recuperados era mais evidente a partir do 20º mês após o início da disfluência.

Yairi et al., (1996) em um novo estudo longitudinal, apoiado em dados do trabalho anterior, analisaram crianças com sinais de gagueira de acordo com os seguintes critérios: a) abaixo de seis anos de idade; b) considerados pelos pais como gogos; c) considerados por dois investigadores como gago; d) tempo de duração das disfluências menor que 12 meses; e) gravidade da gagueira classificada pelos pais com no mínimo 2 em 8 pontos ( 0 = normal; 1 = limítrofe;....6 = grave; 7 = muito grave); f) taxa de gravidade maior ou igual a 2 designada pelos investigadores; g) exibir pelo menos 3% de disfluências atípicas (ou gagas); h) não apresentar nenhum distúrbio neurológico, nem outras anormalidades.

Desta forma, obteve-se a classificação dos indivíduos gogos em três grupos:

1) *Gogos Persistentes*: apresentam gagueira por 36 meses ou mais após o início do distúrbio;

2) *Gogos de Recuperação Tardia*: recuperação entre 18 e 36 meses após início do distúrbio;

3) *Gogos de Recuperação Precoce*: recuperação com 18 meses ou menos após o início do distúrbio.

Hoje está claro que fatores genéticos são essenciais no desenvolvimento de muitos casos de gagueira (Alm et al., 2006). Existem indicações de que crianças com gagueira recuperada e com gagueira persistente apresentam bases genéticas parcialmente distintas (Ambrose et al., 1997). Desta forma, faz-se necessário nos estudos genéticos considerar qual o tipo de gagueira existente (Yairi & Ambrose, 2005).

### 1.3. Diagnóstico da gagueira

Várias abordagens são utilizadas para diagnosticar o distúrbio de fluência. Critérios diagnósticos para a gagueira (ou tartamudez) segundo o *Diagnosis and Statistical Manual of Mental Disorder* (DSM-IV) (1994) da *American Psychological Association* (APA) definem-se como:

- a) Perturbação na fluência e padrão de tempo normal da fala (inapropriado para a idade do indivíduo);
- b) A perturbação na fluência interfere no rendimento escolar e profissional ou na comunicação social;
- c) Em presença de um déficit motor da fala, déficit sensorial, as dificuldades na fala excedem aquelas habitualmente associadas com estes problemas.

### 1.4. Prevalência

A gagueira pode ocorrer em pessoas de todas as etnias, nacionalidades e classes sociais, afeta 5% das crianças com uma prevalência média de 1% da população. (Craig et al., 2002). Usualmente, é aceito que a incidência total da gagueira esteja entre 3 e 4% de indivíduos do sexo masculino e entre 1 a 2% do sexo feminino em algum momento de suas vidas (Andrews & Harris, 1964; Kidd & Records, 1978; Andrews et al., 1983). A frequência varia de acordo com a idade, sendo maior na infância – 2,4% em crianças com idade pré-escolar e 1% nas crianças em idade escolar – e reduzido para menos de 1% na fase adulta (Bloodstein, 1995). Por volta de 80% das crianças afetadas apresentam uma recuperação natural de 1 a 4 anos do início das disfluências (Andrews & Harris, 1964; Yairi & Ambrose, 1999). Os indivíduos do sexo feminino apresentam uma taxa de recuperação espontânea maior que os indivíduos do sexo masculino, contribuindo assim para a inclinação de 4 M : 1 F em crianças com idade mais avançada e adultos (Bloodstein, 1995; Buchel e Sommer, 2004; Felsenfeld, 2002; Yairi & Ambrose, 1999).

Desta maneira, praticamente em todas as faixas etárias, a gagueira parece ser mais comum no sexo masculino que no feminino, sendo sua razão de 1 M : 1 F em crianças de 2 a 3 anos (Yairi, 1983; Ambrose et al., 1997), 2,1 M : 1 F em crianças de 2 a 6 anos de idade (Yairi & Ambrose, 1992a) e 4 a 5 M: 1 F em adultos (Bloodstein, 1995; Felsenfeld et al., 2000). Em um estudo com amostras de gogos persistentes entre 10 a 86 anos, Drayna et al. (1999) encontraram uma razão sexual de 3,8 M : 1 F. Entretanto, quando a prevalência sexual foi analisada no subgrupo da gagueira persistente familiar a proporção entre os indivíduos foi de apenas 1,5 M : 1 F, enquanto no subgrupo de gagueira persistente não-familiar, a prevalência foi significativamente maior no sexo masculino 7,07 M : 1 F.

### **1.5. Etiologia da gagueira – fatores genéticos e ambientais**

A gagueira não pode ser considerada como sendo uma entidade nosológica única, uma vez que apresenta característica multidimensional e multifatorial (Canhetti-Oliveira, 2004).

Em alguns estudos, o desenvolvimento da gagueira em crianças, revela uma predisposição desta em gaguejar. No entanto, segundo Logan (1999), o fator genético pode não ser suficiente para o desenvolvimento do quadro, uma vez que o meio ambiente é também, um fator importante a ser levado em consideração. Nesta situação, a criança ao experimentar um impacto emocional negativo em relação à sua fala, toma consciência de suas dificuldades ao ponto de incorporar o autoconceito de gago.

Ambrose et al. (1997), descreveram alguns fatores ambientais que podem interagir com fatores genéticos e que abrangem diferenças culturais relacionadas à cobrança para ser falante fluente e a vergonha em manifestar a gagueira. Portanto, para esses autores, deve haver uma conjunção de fatores que contribuem para a gênese da gagueira, considerando-a como um distúrbio multidimensional e multifatorial.

Informações genéticas sobre a gagueira são fundamentais para auxiliar no diagnóstico, prognóstico, tratamento e no aconselhamento clínico dos pacientes. O clínico pode ser alertado para o fato de que uma criança tenderá a gaguejar quando a família desta apresentar uma forte tendência (Yairi & Ambrose, 2005), na medida em que são verificados casos de recorrências na família e, portanto, um fator genético fortemente relacionado.

### **1.5.1. Fatores Ambientais**

Os fatores ambientais que podem predispor a gagueira, sugeridos na literatura, estão relacionados com o histórico pré-natal, médico, de desenvolvimento, de fala e linguagem (Cox et al., 1984). Outros fatores ambientais tais como “imitar” e a ordem de nascimento (Van Riper, 1972), não têm sido suficientes para justificar a transmissão da gagueira.

### **1.5.2 Fatores Genéticos**

A etiologia da gagueira ainda é desconhecida, no entanto há um consenso quanto ao fato de que pequenas e sutis alterações de função e de estruturas cerebrais possam estar relacionadas às bases genéticas em indivíduos com gagueira persistente (Yairi & Ambrose, 1992b; 1999).

Dentre os principais argumentos que fundamentam os fatores genéticos da gagueira, são citados: 1) a gagueira aparecia em agregados familiares e que o padrão desta agregação fugia do simples aprendizado por “imitação” de um genitor gago (Kidd et al., 1978); 2) gêmeos monozigóticos são mais concordantes que gêmeos dizigóticos para esta afecção (Howie, 1981); 3) a gagueira é mais provável de se desenvolver em indivíduos consanguíneos do que em casos em que os indivíduos (probandos) não tem essa relação (Andrews et al., 1991; Felsenfeld & Plomin, 1997; Felsenfeld et al., 2000); 4) a semelhança dos traços fenotípicos característicos, desenvolvidos entre os

indivíduos gagos, por exemplo, repetições e prolongamentos de sons e sílabas iniciais das palavras sem estarem ligadas a diferenças de linguagem e cultura (Bloodstein, 1995; Wingate, 1964).

Em estudos de análise de segregação em famílias com multigerações, Viswanath et al. (2004) concluíram que um locus de domínio autossômico possivelmente poderia explicar a ocorrência de gagueira nessas famílias, resultados esses, já descritos por Yairi & Ambrose, (1992; 1999).

A busca por gene(s) que influencia(m) na gagueira tem desafiado o mapeamento genético em modelos mendelianos (Botstein & Risch, 2003). Há vários fatores que desafiam e dificultam a confirmação dos resultados desses estudos, como: a etiologia e a heterogeneidade genética, modelos genéticos complexos com muitos efeitos variáveis de locus, interações gene/gene e interações gene/ambiente.

O complexo número de informações sobre os componentes genéticos da gagueira justificam a utilização de métodos estatísticos nesta área. A determinação pelo método de análise de ligação é a primeira etapa para a identificação de regiões cromossômicas nas quais poderão ser identificado(s) o(s) gene(s) da gagueira e que ainda se apresentam obscuras quanto aos aspectos genéticos (Wittke-Thompson, 2007).

O exato modelo de transmissão da herança genética, ainda não está bem definido e, além disso, há a possibilidade de ser diferente entre as diferentes populações (Alm et al., 2006). Há indícios de que exista um gene principal, responsável pelo aumento do risco de ocorrência da gagueira, quando combinado com outros genes (Yairi & Ambrose, 2005). Estudos de Viswanath et al. (2004), baseados em análise de segregação em 56 famílias com gagueira persistente, revelaram resultados característicos da existência de um gene principal com transmissão mendeliana. De acordo com esse modelo, a penetrância desse gene dependeria do sexo e da ocorrência ou não parentes gagos na família. Assim, em famílias em que o indivíduo gago não apresentava parentes gagos, havia uma penetrância do gene de

37% em homens e de 7% em mulheres, no entanto essa porcentagem era aumentada quando comparado com a presença de parentes gogos, 67% e 19%, respectivamente.

Embora a gagueira há muito tempo venha sendo estudada, faz-se necessário um melhor entendimento de suas causas, especialmente no âmbito da genética, constituindo, portanto, um importante e fértil campo de pesquisa.

### **1.6. Aspectos moleculares, fisiológicos e anatômicos da gagueira**

Indícios de regiões cromossômicas relacionadas com a gagueira são apresentados na literatura, porém nada de concreto ainda pode ser afirmado sobre a existência de um ou vários genes. A provável existência de uma região codificante do DNA poderia estar envolvida na transmissão de informações durante o processo de lateralização do hemisfério, ou codificar uma proteína da laringe, anormal nos gogos, e impedir assim a coordenação adequada da comunicação com os centros da fala no cérebro (Cox, 1988). Acredita-se também, que outros fatores relacionados geneticamente, como a taxa de cálcio, prolactina e estrogênio na corrente sanguínea, variação nos níveis de ansiedade, lesões neurológicas e o número de receptores D2 (dopamina) no núcleo estriado, poderiam estar associados ao processo de gagueira (Alm et al., 2006).

Diversos estudos têm investigado, por meio de imagens de ressonância magnética nuclear, regiões do sistema nervoso central responsáveis por alterações da fluência. Foundas et al. (2001), em estudos com indivíduos adultos com gagueira persistente, revelaram significativas evidências quanto a anormalidades anatômicas nas áreas perisilvianas da fala e da linguagem e, possivelmente relacionadas ao desenvolvimento da gagueira.

A lateralidade cerebral atípica pode estar envolvida com a manifestação da gagueira. Investigações do lobo pré-frontal (hemisfério direito maior) e do lobo occipital (hemisfério esquerdo maior) revelaram que essas assimetrias atípicas estão relacionadas com o desenvolvimento da gagueira (Foundas et al., 2003).

A existência de um hemisfério dominante anormal tem sido atribuído à gagueira, bem como às deficiências no processo auditivo. Desta forma, indivíduos canhotos e pessoas que gaguejam por possivelmente terem um hemisfério dominante anormal, foram submetidas a testes auditivos com o objetivo de examinar o sistema neural auditivo. Foundas et al.(2004), verificaram que homens gagos canhotos e mulheres gagas destros apresentavam processos auditivos atípicos e distintos, e conseqüentemente relacionados à gagueira.

Os primeiros estudos moleculares enfocando a gagueira familiar foram realizados por Cox & Yairi (2000) nos quais utilizaram estudos de ligação em uma população de gagos, geneticamente isolada (Huteritas). Os resultados apresentaram um desequilíbrio de ligação nos cromossomos 1,13 e 16 onde obtiveram escores de ligação não paramétricos (NPL) de 1,1; 1,38 e 0,58, respectivamente.

Shugart et al. (2004), realizaram estudo de ligação em 68 famílias de gagos da América do Norte e da Europa. Suas análises revelaram uma significância estatística em marcadores do cromossomo 18, demonstrando na análise não-paramétrica um escore >5 em 18p e de >2.5 em 18p e 18q proximal. Este estudo sugere a existência de locus de predisposição a gagueira familiar no cromossomo 18 e que genes adicionais possam existir, além dos fatores ambientais, sugerindo assim que a gagueira apresente heterogeneidade genética em diferentes populações, uma vez que Cox & Yairi (2000) não encontraram ligação no cromossomo 18.

Um estudo realizado por Riaz et al. (2005), utilizando triagem genômica em 56 famílias paquistanesas consangüíneas, evidenciou ligação nos cromossomos 1, 5, 7 e 12. Marcadores adicionais foram colocados no cromossomo 12 e após a análise estatística não-paramétrica, foi sugerida a ligação com a gagueira familiar em um locus da região 12q, reforçando a idéia de heterogeneidade genética em diferentes populações, pois assim como a população estudada por Cox & Yairi (2000), a população de paquistaneses também era um isolado genético consanguíneo.

Suresh et al. (2006), realizando uma varredura genômica com SNP's

(polimorfismo de nucleotídeo único) e análise de ligação em 100 famílias constituídas por americanos (descendentes de europeus), suecos e israelenses, observaram indicativos de ligação no cromossomo 9 (LOD = 2,3 – 60 cM) no grupo de indivíduos gados recuperados e persistentes, e no cromossomo 15 (LOD = 1,95 – 23 cM) apenas no grupo dos indivíduos gados persistentes. Também, nestas análises foram encontrados indicativos de ligação sexo-específico no cromossomo 7 (LOD = 2,99 – 153 cM) no grupo de homens e no cromossomo 21 (LOD = 4,5 – 34 cM) no grupo de mulheres. Análises secundárias, neste mesmo estudo, revelaram um aumento nas evidências de ligação no cromossomo 12 condicionado às evidências de ligação no cromossomo 7, resultados estes já demonstrados, anteriormente, em famílias paquistanesas.

Estudos realizados por Pan et al. (2009) na população chinesa (*Han chinese*) procuraram verificar as correlações existentes de cinco SNP's (polimorfismo de nucleotídeo único) em indivíduos gados, com os genes DAT (transportador de dopamina) e o DRD2 (receptor de dopamina) localizados, respectivamente, nas regiões cromossômicas 5p15.3 e 11q23. Somente um dos cinco SNP's estudados (C1072T) no gene DRD2, com o alelo C, estava associado com o aumento de susceptibilidade para a gagueira na população chinesa, enquanto que o alelo T forneceria proteção para o início da gagueira.

Assim, o exato modelo de transmissão da herança genética ainda não está claramente definido e, além disso, há possibilidade de ser diferente entre as populações (Alm et al., 2006). A tabela 1 apresenta um resumo dos estudos moleculares já publicados.



**Tabela 1:** Resultado dos estudos moleculares já realizados, verificados na literatura.

Região cromossômica	Método	População n de famílias	Referência
1	Análise de ligação NPL = 1,1	Huteritas *n	Cox e Yairi (2000)
1	Triagem genômica	Paquistaneses n = 56	Riaz et al., (2005)
5	Triagem genômica	Paquistaneses n = 56	Riaz et al., (2005)
7	Triagem genômica	Paquistaneses n = 56	Riaz et al., (2005)
7	Análise de ligação (grupo de homens) LOD = 2,99 - 153cM	Americanos (origem europeia), suecos e israelenses n = 100	Suresh et al., (2006)
9	Análise de ligação (gagos recuperados e persistentes) LOD = 2.3 - 60cM	Americanos (origem europeia), suecos e israelenses n = 100	Suresh et al., (2006)
12q	Triagem genômica	Paquistaneses n = 56	Riaz et al., (2005)
13	Análise de ligação NPL = 1,38	Huteritas *n	Cox e Yairi (2000)
15	Análise de ligação (gagos persistentes) LOD = 1,95 - 23cM	Americanos (origem europeia), suecos e israelenses n = 100	Suresh et al., (2006)

\*n: número de indivíduos não informado.

**Tabela 1:** Resultado dos estudos moleculares já realizados, verificados na literatura.  
(continuação)

Região cromossômica	Método	População n de famílias	Referência
16	Análise de ligação NPL = 0,58	Huteritas *n	Cox e Yairi (2000)
18p	<b>Análise de ligação NPL &gt; 5</b>	<b>América do Norte e Europa n = 68</b>	<b>Shugart et al., (2004)</b>
18q proximal	<b>Análise de ligação NPL &gt; 2,5</b>	<b>América do Norte e Europa n = 68</b>	<b>Shugart et al., (2004)</b>
21	Análise de ligação (grupo de mulheres) LOD = 4,5 - 34cM	Americanos (origem europeia), suecos e israelenses n = 100	Suresh et al., (2006)

\*n: número de indivíduos não informado.

Trabalhos preliminares realizados por nosso grupo (Costa et al., 2005) na região 18p, em que foram estudados 11 marcadores polimórficos, com distância média de 5 cM, ao longo da região 18p11.32 – 18p11.21, demonstraram associação positiva dessa região à gagueira persistente familiar em 15 núcleos familiares brasileiros.

## 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Encontrar fatores preditivos que diferenciem a gagueira persistente daquela em que a recuperação ainda é possível e desta forma facilitar a tomada de decisão quanto à conduta terapêutica, faz-se necessário.

Entender os componentes genéticos da gagueira e suas possíveis interações com o ambiente pode beneficiar os indivíduos gagos quanto à prevenção e ao tratamento. A identificação de possíveis genes causadores deste distúrbio permitirá direcionar o tratamento para aqueles propensos a se tornarem gagos crônicos, uma vez diagnosticados precocemente através de testes moleculares. Da mesma forma, será possível também a identificação daqueles cuja gagueira é passível de recuperação espontânea. Assim, evita-se que a criança seja submetida a tensões emocionais geradas pela condição de gago, além de terapias desnecessárias que oneram o sistema de saúde como um todo.

Não é prático, possível ou necessário colocar toda criança com gagueira em terapia. Aquelas com propensão a continuar a gaguejar, devem sofrer uma intervenção precoce, enquanto outras, com pouco ou nenhum fator de risco, devem receber orientações fonoaudiológicas sem uma intervenção direta, no entanto, precisam ser acompanhadas e reavaliadas periodicamente a fim de monitorar a evolução do quadro e garantir que disfluências comuns não evoluirão para uma gagueira crônica.

Nosso estudo apresenta como objetivos primários:

- Estudar fatores genéticos em diferentes famílias brasileiras, a partir de um indivíduo considerado gago persistente e com pelo menos mais um membro afetado do núcleo familiar, em busca de evidências de segregação da característica.
- Aprofundar as análises do braço curto do cromossomo 18 iniciado por Costa et al.,(2005) por meio de um mapeamento gênico mais fino

dessa região com marcadores microssatélites, submetendo-os a estudos de associação e de segregação.

- Analisar a região proximal do braço longo do cromossomo 18 também como possível região candidata à gagueira familiar.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Este projeto contou com a participação de três instituições colaboradoras, responsáveis pela captação de famílias com gagueira persistente familiar, o Centro de Estudos da Educação e da Saúde (CEES – Unesp - Marília), o curso de Fonoaudiologia CEPRE/IEL/FCM – Unicamp – Campinas e o Departamento de Fisioterapia, Fonoaudiologia e Terapia Ocupacional (FOFITO – FMUSP – São Paulo), coordenados pelo Serviço de Aconselhamento Genético – Unesp – Botucatu.

Para a participação neste estudo todos os responsáveis presentes na consulta fonoaudiológica foram informados sobre os objetivos da pesquisa e esclarecidos sobre os procedimentos que seriam adotados para a anuência e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Ao concordarem em participar da pesquisa, era solicitado, em cada instituição envolvida no projeto, 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 freezer - 80°C sob responsabilidade do Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP (Anexo B). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Unesp de Botucatu – SP, através do parecer OF. 311/2007-CEP e pelos CEPs dos centros de triagens (Anexo A)

#### **3.2. Casuística**

Para a realização deste estudo o grupo amostral envolveu 31 famílias com gagueira persistente totalizando 185 indivíduos, selecionados independentemente do número de membros da família, sem distinção de sexo, etnia, escolaridade e nível sócio-econômico-cultural. O Centro de Estudos da Educação e da Saúde (CEES –

Unesp - Marília) colaborou com a seleção de 23 famílias oriundas do Noroeste do Estado de São Paulo, o Departamento de Fisioterapia, Fonoaudiologia e Terapia Ocupacional (FOFITO – FMUSP – São Paulo) selecionou 7 famílias com gagueira persistente originárias das regiões metropolitanas de São Paulo e o curso de Fonoaudiologia CEPRE/IEL/FCM – Unicamp – Campinas, 1 família proveniente da região metropolitana da cidade de Campinas

### **3.2.1. Critérios fonoaudiológicos de inclusão**

Os requisitos de inclusão dos probandos são:

- Ser falante nativo do português brasileiro;
- Ter idade acima de seis anos;
- Apresentar histórico familiar positivo para a gagueira, ou seja, apresentar no mínimo outro parente gago;
- Ser diagnosticado como gago persistente.

### **3.2.2. Critérios fonoaudiológicos de exclusão**

Os critérios de exclusão para o grupo de probandos são:

- Apresentar qualquer distúrbio neurológico genético ou não, nos familiares, tais como distonia, doenças extras piramidais, deficiência mental, epilepsia, transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH); sintomas ou condições psiquiátricas;
- Outras condições pertinentes que possam gerar erros no diagnóstico.

### **3.2.3. Diagnóstico de gagueira e seleção das famílias**

O diagnóstico de gagueira do participante foi estabelecido a partir da metodologia de coleta da amostra de fala proposta por Andrade (2000) – fala auto-

expressiva obtida num mínimo de 200 sílabas expressas (fluentes), eliciada por estímulo visual de figura (adaptada às diferentes faixas etárias).

A partir da análise da amostra de fala foram considerados participantes do estudo aqueles que apresentaram no mínimo 3% de rupturas gagas (Yairi et al., 1992b) e receberam 11 pontos ou mais (gravidade = leve) no *Stuttering Severity Instrument – 3* (SSI-3) (Riley, 1994).

#### **3.2.4. Histórico Clínico**

O histórico clínico foi obtido com os pais das crianças e adolescentes ou com os próprios probandos (maiores de 18 anos), dirigida às questões de identificação pessoal e ao histórico de morbididades fonoaudiológicas com o objetivo de detectar aspectos que poderiam interferir no resultado da avaliação como, por exemplo, possíveis déficits neurológico, auditivo, cognitivo e/ou visual e queixa de outros distúrbios da comunicação.

Dados específicos sobre os distúrbios da fluência também foram pesquisados, tais como o início, época do aparecimento e tempo de cronicidade das disfluências, fatores estressantes físicos e/ou emocionais que ocorreram próximos ao surgimento das disfluências, entre outros.

As informações sobre os antecedentes familiares, para a construção do heredograma, foram coletadas ao final da história clínica. Os familiares adultos de primeiro grau ou os próprios probandos, quando adultos foram questionados sobre o padrão de fluência de seus parentes e a existência de alguém na família com gagueira ou que havia gaguejado na infância. Para auxiliar os probandos em suas respostas, a fonoaudióloga apresentou uma definição padrão de gagueira seguido de exemplos que podiam ilustrá-las. Exemplos de repetições de sons ou de sílabas, repetições de palavras monossilábicas, prolongamentos de sons, bloqueios e intrusões foram oferecidos.

Com o intuito de obter informações precisas, os familiares foram incentivados a checar e a confirmar com seus pais ou com outros parentes, informações e histórias

de gagueira. Quando possível, mais que um adulto foi questionado a respeito da gagueira de seus familiares. O diagnóstico foi baseado em três fontes de informações: relatos dos próprios probandos, relatos dos parentes e, sempre que possível observação direta durante a entrevista e ao longo da avaliação de fala. Os dados dos heredogramas foram confirmados e suas informações, utilizadas para determinar a prevalência familiar de gagueira nos parentes de primeiro, segundo e/ou terceiro graus e a razão sexual da gagueira.

Posteriormente, os demais parentes foram contatados pelo probando (quando adulto), por um familiar de primeiro grau ou pelos pesquisadores para esclarecimento inicial sobre a pesquisa e a necessidade de coleta de amostras de fala e material biológico.

Após a avaliação do probando e do parente afetado, os pais, os próprios indivíduos (quando adultos) ou a família receberam a devolutiva dos resultados da avaliação. Informações sobre a gagueira foram oferecidas por meio de orientações e instruções com o auxílio de um informe especialmente elaborado para esta finalidade. Os casos que necessitaram de terapia foram mantidos nas clínicas citadas, para a intervenção fonoaudiológica.

### **3.2.5. Confiabilidade da avaliação da fluência**

Um estudo genético preciso depende de um diagnóstico correto, portanto, para garantir a confiabilidade da avaliação da fluência nas famílias candidatas, foram solicitados pareceres de dois profissionais com experiência no diagnóstico e na intervenção fonoaudiológica dos distúrbios da fluência. As análises das disfluências foram realizadas a partir do registro audiovisual da fala dos candidatos à pesquisa (probando e seus familiares)



### 3.3. Obtenção das amostras biológicas

De cada indivíduo que participou deste estudo foram coletados 4 ml de sangue periférico o qual foi 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 (4 °C) para o transporte, até o processamento no Laboratório de Genética Molecular do Serviço de Aconselhamento Genético do Instituto de Biociências de Botucatu – Unesp.

### 3.4. Obtenção do DNA genômico

O DNA foi extraído, de uma alíquota (1 ml) do tubo contendo 4 ml de sangue periférico com EDTA, com o kit comercial de extração Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). Este protocolo segue os seguintes passos: lise das hemácias; lise dos leucócitos; precipitação salina das proteínas nucleares e citoplasmáticas seguido da precipitação do DNA genômico com isopropanol a 100%; o DNA foi lavado com etanol a 70%; depois de seco a temperatura ambiente, o *pellet* formado (complexo insolúvel precipitado e concentrado por centrifugação) foi solubilizado em tampão TE (Tris-HCl / EDTA) e incubado por 30 minutos a temperatura de 65 °C.

As amostras de DNA foram diretamente quantificadas através de leitura em *ND-100 Spectrophotometer* da NanoDrop®. Nesta etapa foi utilizado o volume de 1 µl de solução estoque de DNA, o que permitiu otimizar o consumo das amostras de DNA, sem perder a precisão. Em geral, todas as amostras de DNA apresentaram qualidade satisfatória permitindo assim a estocagem em freezer - 80°C. Posteriormente, todas as amostras foram descongeladas, re-quantificadas e pequenas alíquotas foram diluídas em água Milli-Q a uma concentração final de 20ng/µl, obtendo-se um padrão de concentração das amostras a serem utilizadas nas análises moleculares.

### 3.5. Análise Molecular

Esta fase do projeto foi realizada no Laboratório de Genética Molecular do Serviço de Aconselhamento Genético. A genotipagem de marcadores polimórficos microssatélites em duas regiões do genoma: 18p e 18q proximal foram realizadas através de PCR e genotipagem automática em seqüenciador por eletroforese capilar.

#### 3.5.1. Locus e iniciadores microssatélites

Para a realização deste trabalho foram selecionados 14 marcadores microssatélites a partir do banco de dados de marcadores do *Marshfield Genetic Maps* e do *Ensembl Genome*. Os critérios de seleção utilizados basearam-se nos dados publicados nestes bancos e foram: taxa de heterozigose, distância média de 2 cM entre um marcador e outro e preferencialmente microssatélites com motivo de repetição acima de dois nucleotídeos. Entre os 14 microssatélites selecionados, nove são dinucleotídeos, um é trinucleotídeo e quatro são tetranucleotídeos. As informações referentes à posição (cM), seqüências de bases, variação do tamanho do produto esperado, tipo de microssatélite, número possível de repetições, região cromossômica (banda) e taxa de heterozigose dos 14 microssatélites selecionados são apresentadas na tabela 2.

Com o objetivo de realizar um mapeamento gênico mais fino da região 18p e consolidar ou não a associação positiva com a gagueira familiar, realizou-se a análise ao redor dos marcadores D18S78 (Shugart et al., 2004) e D18S1370 e GATA178F11 (Costa et al., 2005), que já apresentaram associação positiva para a doença. Na figura 1, estão representados esquematicamente a posição dos marcadores microssatélites utilizados.

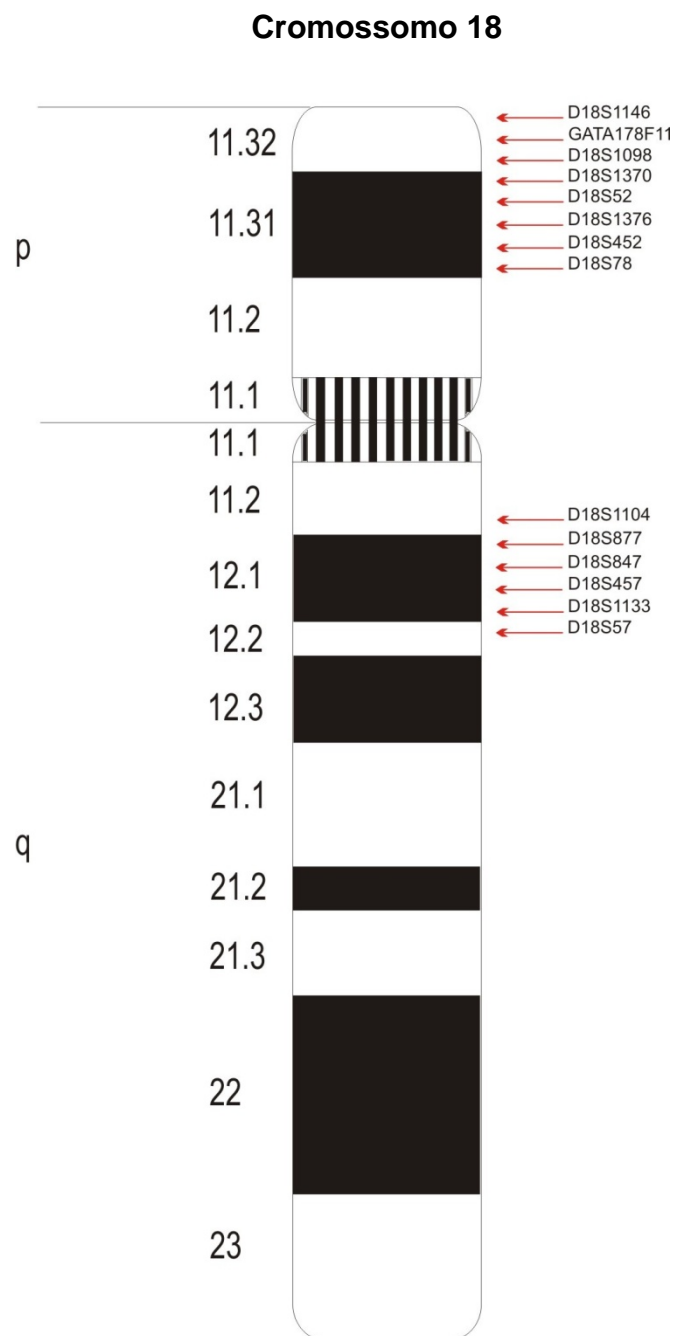
Na região 18q proximal, a análise foi realizada ao longo das regiões 18q11.2 e 18q12.1 que nos estudos de Shugart et al., (2004) apresentaram associação positiva com a gagueira.

#### **3.5.1.1. Região 18p**

A região 18p foi analisada com sete marcadores microssatélites polimórficos (D18S1146, GATA178F11, D18S1098, D18S1370, D18S52, D18S452, D18S1376, D18S78) que apresentam uma distância média de 2 cM.

#### **3.5.1.2. Região 18q proximal**

A região 18q proximal foi analisada com seis marcadores microssatélites (D18S1104, D18S877, D18S847, D18S348, D18S1133, D18S57) que apresentam uma distância média de 2 cM.



**Figura 1:** Esquema do cromossomo 18 indicando a posição de análise dos microssatélites. Modificado de *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2005)*.

**Tabela 2:** Ficha descritiva dos 14 iniciadores microssatélites.

N	Marcador	Posição (cM)	Seqüência dos iniciadores (5'→3')		Variação no tamanho do produto gerado (pb)	Tipo de microssatélite	N possível de repetições do microssatélite	Banda	Taxa de Heterozigose
			Reverse (left)	Forward (right)					
01	D18S1146	2,1	AGCTATATACAAGATACANGTGTGT	AAAAGTTTTATGCCTTCAGG	234-244	2	10	18p11.32	0,51
02	GATA178F11	2,8	TTAAGAATGAAATGATCTAATTCCG	TCACAAGAAAGGGATGGTGA	190-218	4	28	18p11.32	0,82
03	D18S1098	5,6	AAGGTTATTTTGCCCACTCTGTA	AGGACTCCAGGTGTGTGC	150-178	2	28	18p11.32	0,56
04	D18S1370	6,9	GGTGACAGAGCAAGACCTTG	GCCTCTTGTCATCCCAAGTA	131-146	3	15	18p11.31	0,82
05	D18S52	9,3	TTNCAACATAGTTTATACGCG	GGCCCAGTTCATTTTCTAGC	116-132	2	16	18p11.31	0,76
06	D18S1376	16,5	TGGAACCACTTCATTCTTGG	ATTTCAAGCCCCAGATAGGC	192-208	4	16	18p11.31	0,60
07	D18S452	18,7	ATAAAAGTTGCTTCCTGGGG	TCTCCTAAATAACCGCTGGC	123-141	2	18	18p11.31	0,84
08	D18S78	19,6	TTGAGGCTGCAGTGAGCTAT	ATGTTGTGTTTTCACAGCAG	151-161	2	10	18p11.31	0,43
09	D18S1104	49,6	GACATCACGCCACTCAC	TTATTCTAGATACTCTTAGGTCCCC	136-160	2	24	18q11.2	0,87
10	D18S877	54,4	GATGATAGAGATGGCACATGA	TCTTCATACATGCTTTATCATGC	117-137	4	20	18q12.1	0,70
11	D18S847	56,7	TTAAATTTGACTCTGAGAGTTCTCC	CAGATGGCCTGTAGTGGAAC	212-244	4	32	18q12.1	0,76
12	D18S457	58,5	GTAATTTATTTGGTGGTGGG	GATCTCAGTGTAACCTCAGGGA	99-111	2	12	18q12.1	0,42
13	D18S1133	61,7	CCCCACTATAACCAGGAGAT	CCAGTTGCTCCAACAAAAA	185-199	2	14	18q12.1	0,83
14	D18S57	62,8	TTCAGGGTCTTTTGAAGAGG	AGAAGGCATTAAATTTTGCA	88-110	2	22	18q12.2	0,87

### 3.5.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A técnica de PCR permite que regiões selecionadas sejam amplificadas milhões de vezes. Neste ensaio foram utilizados iniciadores específicos que flanqueiam os marcadores polimórficos. As ampliações *in vitro* foram realizadas no termociclador *Eppendorf Mastercycler ep gradient S* seguindo o programa descrito por Douglas et al. (2003), conforme tabela 3.

As temperaturas de anelamento ( $T_m$ , do inglês *melting temperature*) para cada iniciador basearam-se na sugestão do fabricante e em testes preliminares com reações em temperatura de anelamento gradiente, essas temperaturas estão apresentadas na tabela 4. A averiguação da amplificação dos fragmentos bem como sua qualidade foi verificada em duas etapas: primeira, gel de agarose 2%, onde foi utilizado um marcador de peso molecular (*ladder*) de 100 pares de base (pb) como referência, na condição de corrida de 100 Volts por 30 minutos, contendo 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de brometo de etídeo. Os produtos de PCR no gel foram visualizados em transluminador sob luz UV e fotografados em foto-documentador modelo Eagle-Eye<sup>®</sup> (Stratagene); uma vez verificado, em agarose, a amplificação dos fragmentos, a segunda etapa, verificação da qualidade, foi realizada por eletroforese de capilar no seqüenciador ABI Prism 3100 (*Applied Biosystems*).

Nesta segunda etapa, a concentração dos produtos de PCR foi otimizada para que o sinal emitido pelas fluorescências não ultrapassasse a escala do equipamento; dependendo do marcador foram realizadas diluições em água Milli-Q autoclavada nas proporções de 1:50, 1:100 e 1:150. Outros ajustes na determinação da concentração de  $\text{MgCl}_2$ , visaram minimizar a presença de picos recorrentes (*stutter*), caracterizados pela presença de uma unidade de repetição mais curta em relação ao alelo principal, e de temperatura, principalmente na fase de extensão final, a fim de reduzir a presença de picos +A/-A, forçando a adenilação de todos os produtos de PCR.

Cada reação de PCR empregou-se aproximadamente: 20 ng do DNA genômico por reação. O reagente da PCR foi preparado contendo 10 pmoles de cada primer

diluídos em tampão 5x (Tris-HCl 50,25mmol/l, pH 8,8; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M; MgCl<sub>2</sub> 2mmol/l; BSA 127,5µg/ml); 200µmol/l dos nucleotídeos dATP, dCTP, dTTP; 150µmol/l do dGTP; 50µmol/l do 7-deaza-2'dGTP, dimetilsulfoxido à 10% e 2,5U de Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen) no volume final de 10µl.

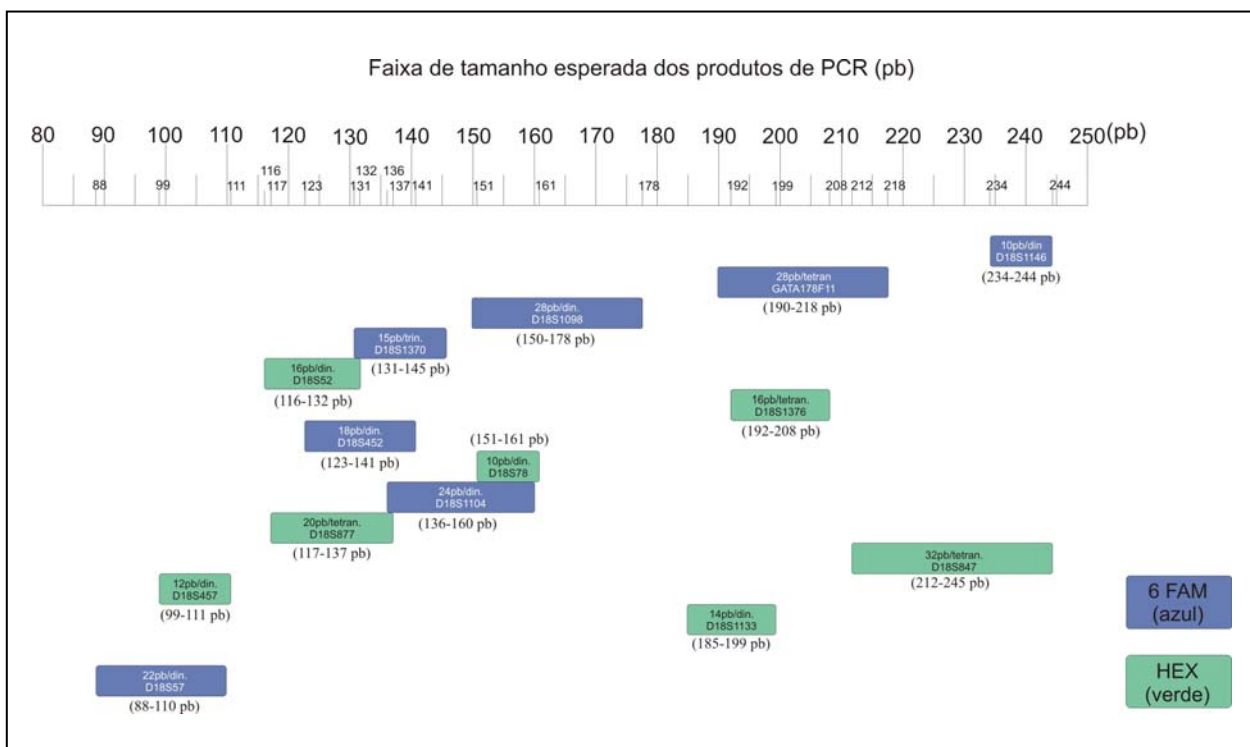
Todos os iniciadores *forward* foram marcados na extremidade 5' com um dos fluoróforo 6-FAM ou HEX. Os produtos de PCR foram sempre protegidos da luz, para evitar a degradação do fluoróforo a fim de garantir um sinal de qualidade. De maneira esquemática, a figura 2 mostra a faixa de tamanho dos *amplicons* prevista e as cores dos marcadores fluorescentes usados.

**Tabela 3:** Programa modelo para a amplificação dos fragmentos.

Etapas	Desnaturaçã inicial	Desnaturaçã	Pareamento	Extensão	Extensão final
Temperatura	94 °C	94 °C	T <sub>m</sub>	72 °C	72 °C
Tempo	5 min	45 seg	45 seg	45 seg	50 min
Ciclos	35				

**Tabela 4:** Marcadores microssatélites e suas respectivas temperaturas de anelamento.

Marcador microssatélite	Temperatura de anelamento (T <sub>m</sub> )
D18S1146	52 °C
GATA178F11	52 °C
D18S1098	53 °C
D18S1370	52 °C
D18S52	51 °C
D18S1376	52 °C
D18S452	52 °C
D18S78	51 °C
D18S1104	51 °C
D18S877	50 °C
D18S847	51 °C
D18S457	50 °C
D18S1133	53 °C
D18S57	52 °C



**Figura 2:** Esquema de faixa de tamanho dos *amplicons* prevista e a cor do fluoróforo em cada marcador microsatélite. Cada retângulo apresenta esquematicamente o nome do iniciador, o número de repetições possíveis e o motivo de repetição: di, tri ou tetranucleotídeo.

### 3.5.3. Genotipagem dos microsatélites

A genotipagem dos microsatélites amplificados, seja durante a fase de otimização, seja durante a genotipagem do conjunto de amostras, baseou-se na realização de PCR, com iniciadores marcados com fluorescência, de acordo com a metodologia sugerida por Kondo et al. (2000) e análise através de eletroforese capilar no sequenciador automático - Sequenciador ABI Prism 3100 – 16 capilares (*Applied Biosystem*).

Para genotipagem, (com volume final de reação de 10 µl) foram adicionados 1 µl de produto de PCR, 0,5µl de *GeneScan™ – 500 ROX™ Size Standard* e 8,5µl de Formamida Hi-Di™. Em seguida essa reação foi centrifugada e submetida à desnaturação por 5 minutos a 95 °C e acondicionada em gelo até o momento das análises.



Após eletroforese os arquivos com informações de cada uma das amostras foram analisados utilizando os programas GeneScan<sup>®</sup>, e GeneMapper<sup>®</sup> v.4.0 (*Applied Biosystems*).

### **3.6. Procedimentos analíticos**

#### **3.6.1. Estimativas de frequências alélicas e genotípicas**

As frequências alélicas e genotípicas dos microssatélites foram estimadas pelo programa FBAT (*Family Based Association Test*) (Laird, N. et al, 2000) que calcula as frequências levando em conta a agregação familiar.

#### **3.6.2. Análise de segregação complexa**

A análise complexa de segregação complexa permite identificar qual o melhor modelo genético que explica a agregação familiar observada para um dado fenótipo. Assim, procura-se saber se o mesmo ocorre devido a um ou mais genes principais ou a inter-relação gene-ambiente.

Uma vez havendo evidências genéticas, a partir deste tipo de análise, pode-se partir em busca de genes relacionados à manifestação fenotípica. A análise de segregação tem se mostrado de grande interesse no estudo de várias características influenciadas por um gene principal ou por um pequeno número de genes (Feitosa & Krieger, 2002).

O modelo de análise de segregação utilizado no presente estudo, proposto por Lalouel et al. (1983), assume de forma independente e aditiva todos os efeitos, genéticos e ambientais, em particular as relações de parentesco familiar, na contribuição para os fenótipos em estudo.

Desta forma, as análises foram conduzidas com a utilização do programa POINTER, baseado no modelo unificado de Lalouel et al. (1983), que incorpora as frequências de transmissão de Elston & Stewart (1971) ao modelo misto de Morton &

MacLean (1974) e tem como objetivo averiguar a possível existência de um gene, passível de condicionar o fenótipo em estudo.

### **3.6.3. Análise dos genótipos**

A verificação da segregação ao longo das genealogias foi realizada a partir dos genótipos obtidos de 14 marcadores microssatélites estudados, os quais foram submetidos ao programa SIMWALK 2 (Sobel & Lange, 1996; Sobel, Sengul, Weekes, 2001; Sobel, et al., 2002). Baseando-se no algoritmo MCMC, este teste verifica a integridades dos dados e das informações obtidas sobre os indivíduos, pré-requisito para a posterior execução dos programas de análise de associação, uma vez que a presença de inconsistências quanto à correta segregação inviabilizaria a próxima etapa.

### **3.6.4. Estudos de associação**

Os estudos de associação visam identificar um marcador que tenha relação com o fenótipo da população em estudo. A análise de associação pauta-se na confirmação da suspeita de participação de um determinado alelo na manifestação de certa característica ou de um alelo existente em um locus próximo ao locus responsável pela característica (Feitosa e Krieger, 2002).

As análises foram realizadas utilizando-se o programa FBAT (Teste Baseado em Associação Familiar) (Rabinowitz & Laird, 2000; Laird et al., 2000), construído originalmente a partir do método de TDT (Teste de Desequilíbrio de Transmissão) (Spielman et al., 1993), no qual os alelos transmitidos aos indivíduos afetados são comparados com a distribuição esperada dos alelos entre os indivíduos. Este teste de associação, ao contrário de outros, leva em conta em suas análises, a agregação familiar dos indivíduos e a distribuição do fenótipo dentro das famílias. O teste está

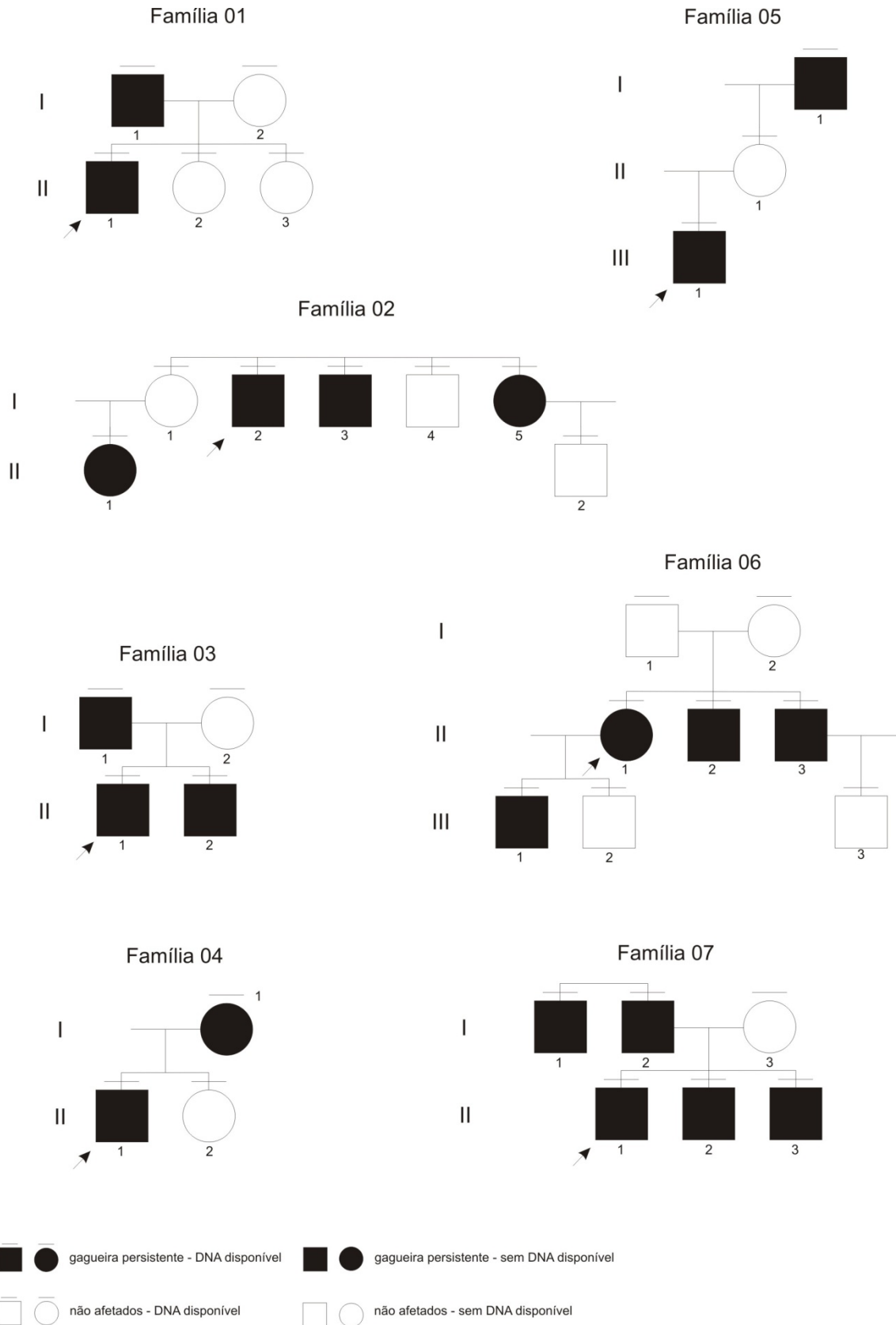
estruturado em dois estágios: primeiro, definição do teste estatístico que reflita a associação entre as particularidades do locus e os marcadores ali presentes; segundo, cálculo da distribuição dos dados genotípicos dos marcadores submetidos a hipótese nula ( $H_0$  = não há transmissão preferencial,  $P > 0,005$ ) a partir do tratamento randomizado dos dados genotípicos do descendentes (Laird, 2007).

## 4. RESULTADOS

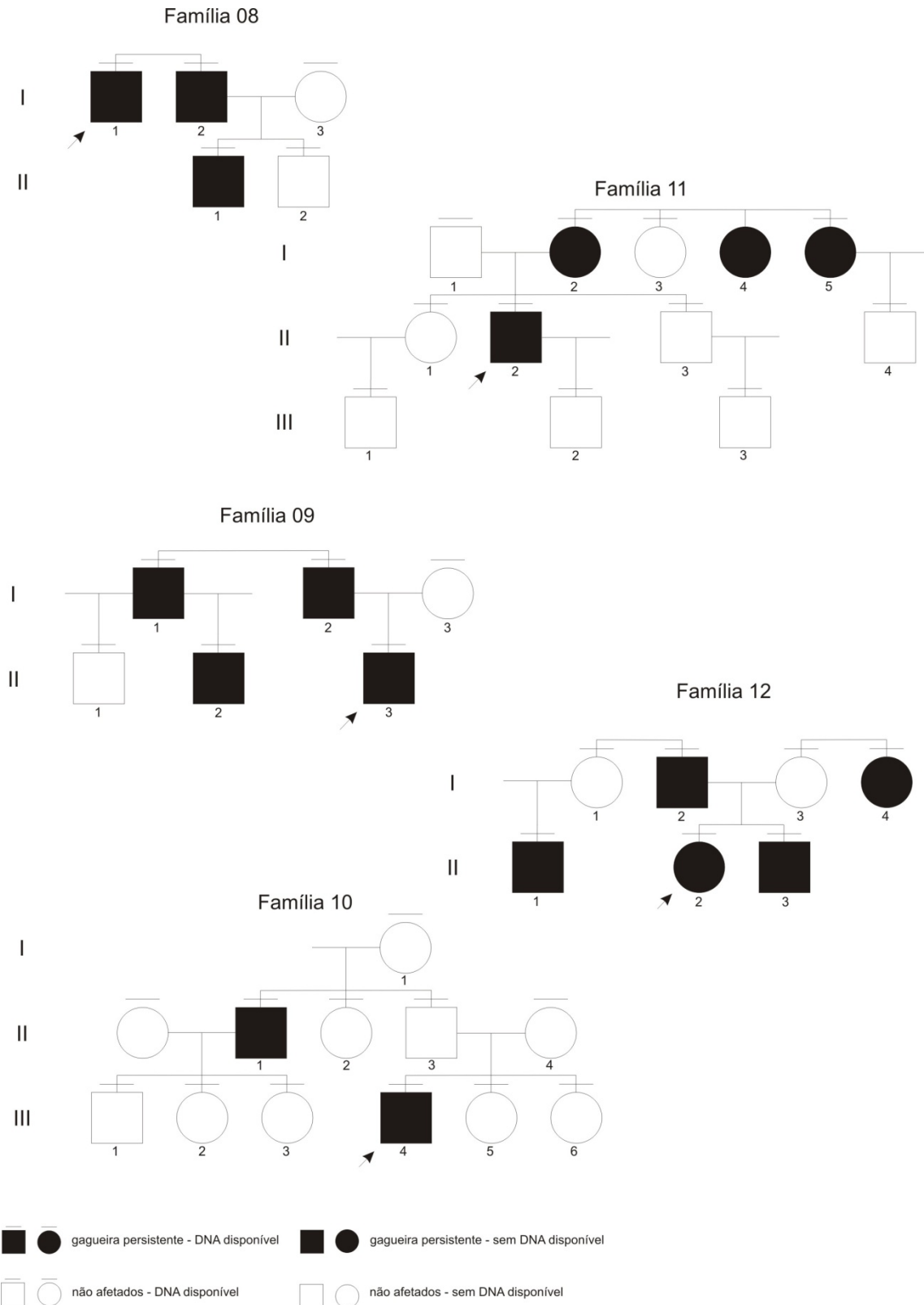
### 4.1. Grupo amostral

Neste estudo foram incluídas 31 famílias com gagueira persistente familiar, cujos heredogramas estão apresentados na figura 3. Partindo do núcleo familiar, foram feitas consultas com o objetivo de verificar o número de membros da família, bem como daqueles indivíduos que estavam dispostos a participar do estudo. A construção dos heredogramas apresentados envolveu todos os membros da família, independente do tipo de contribuição com a pesquisa. Aos que não desejaram participar ou que não estavam disponíveis no momento, apenas informações baseadas no relato de parentes foram coletados. Os demais familiares que desejaram participar, além de amostras de fala, também foi inclusa a coleta de material biológico para a posterior análise molecular. Para efeito da análise molecular, apenas as pessoas que contribuíram com material biológico e amostras de fala, foram considerados.

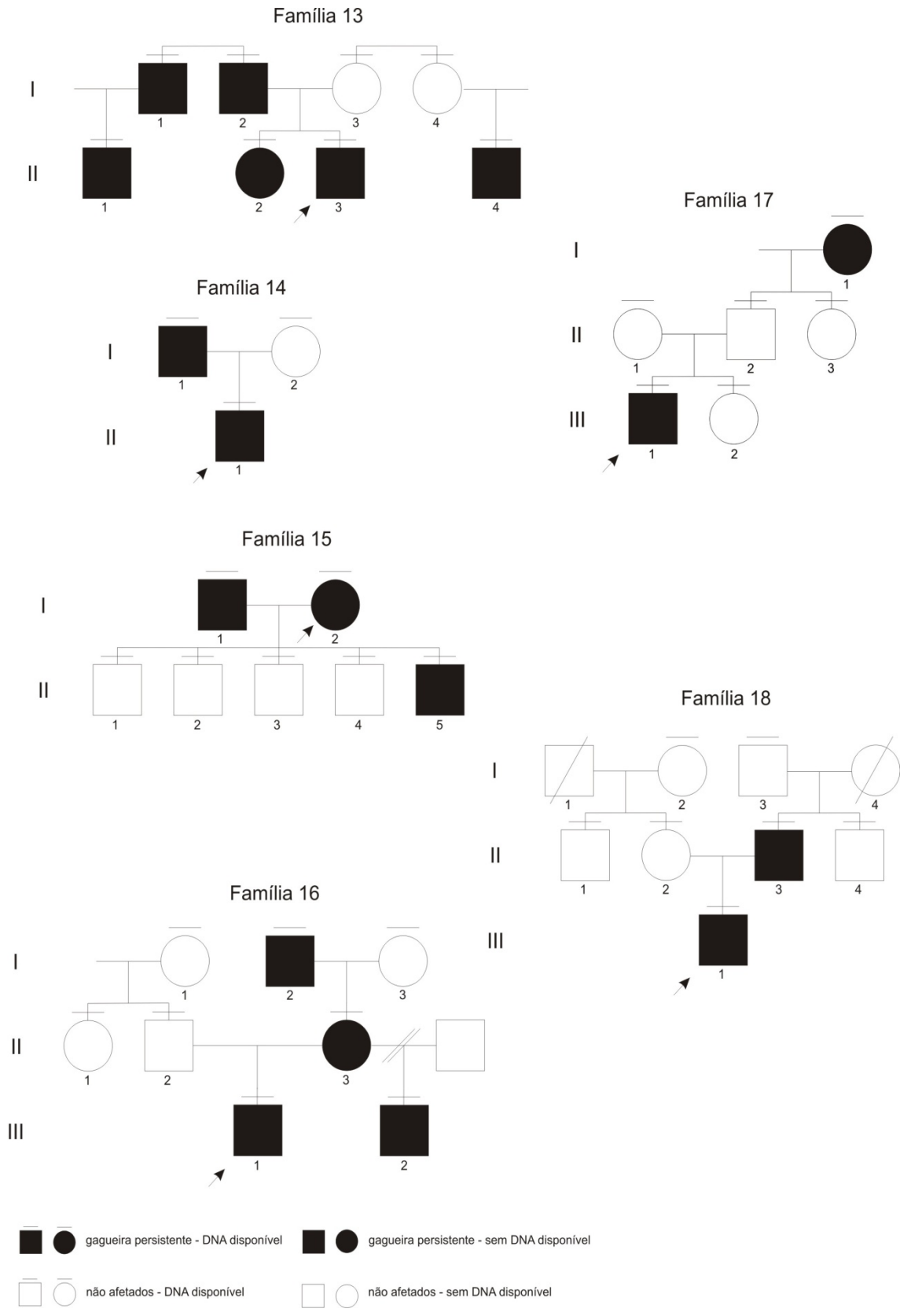
Os 185 indivíduos estudados estão distribuídos em 108 (58,37%) do sexo masculino e 77 (41,63%) do feminino. Deste grupo amostral, 75 (40,54%) indivíduos foram diagnosticados como gogos, 96 (51,89%) como fluentes e 14 (7,57%) indivíduos, consanguíneos ao probando, como gogos recuperados os quais foram agrupados posteriormente, ao grupo de indivíduos gogos. Em relação à prevalência sexual à gagueira persistente familiar, observamos uma relação de 3,68 M: 1 F (70 M : 19 F). Os dados referentes à distribuição dos indivíduos estudados quanto à origem, ao sexo e ao diagnóstico fonoaudiológico são apresentados na tabela 5.



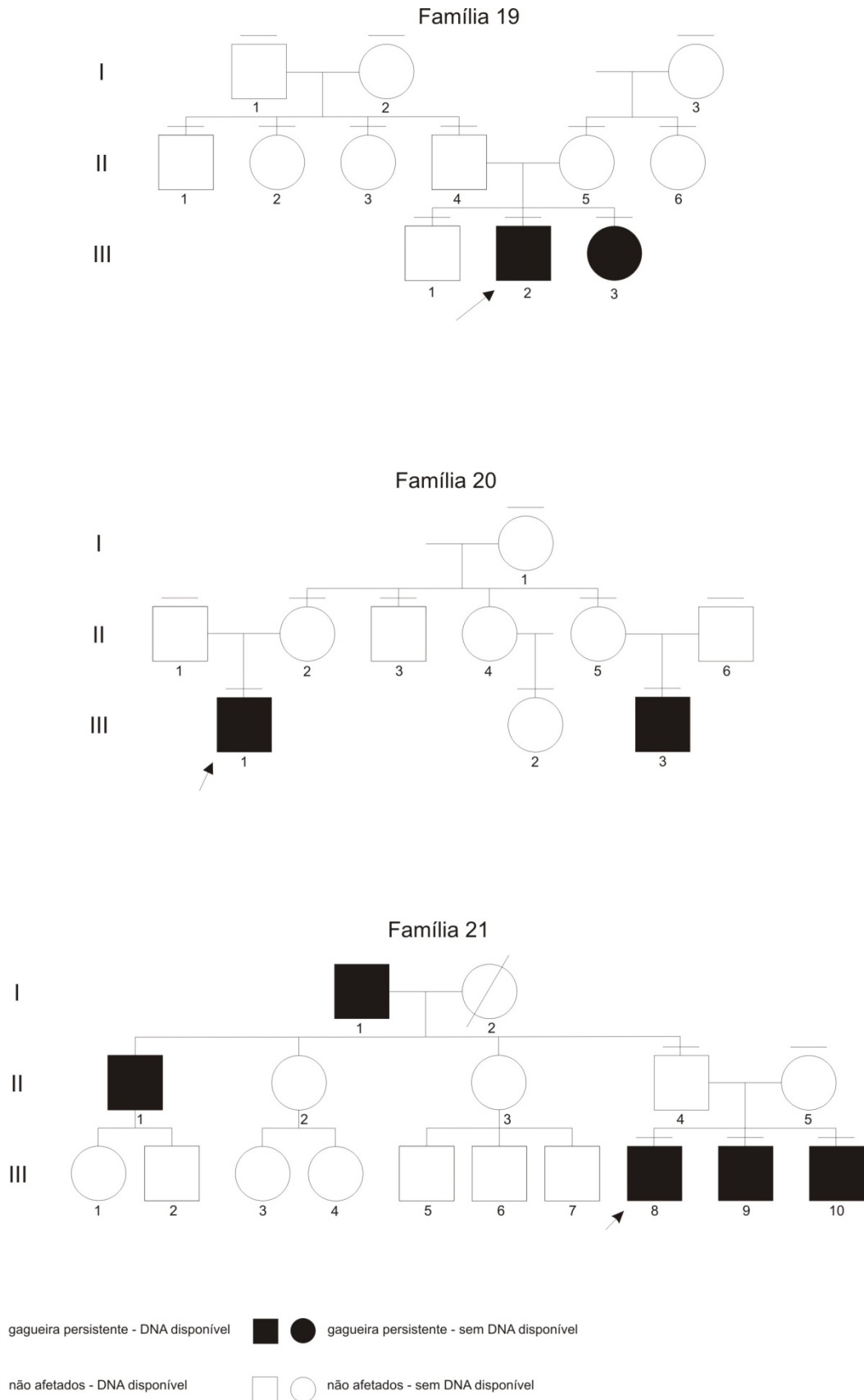
**Figura 3:** Heredogramas das 31 famílias.



**Figura 3:** Heredogramas das 31 famílias (continuação).

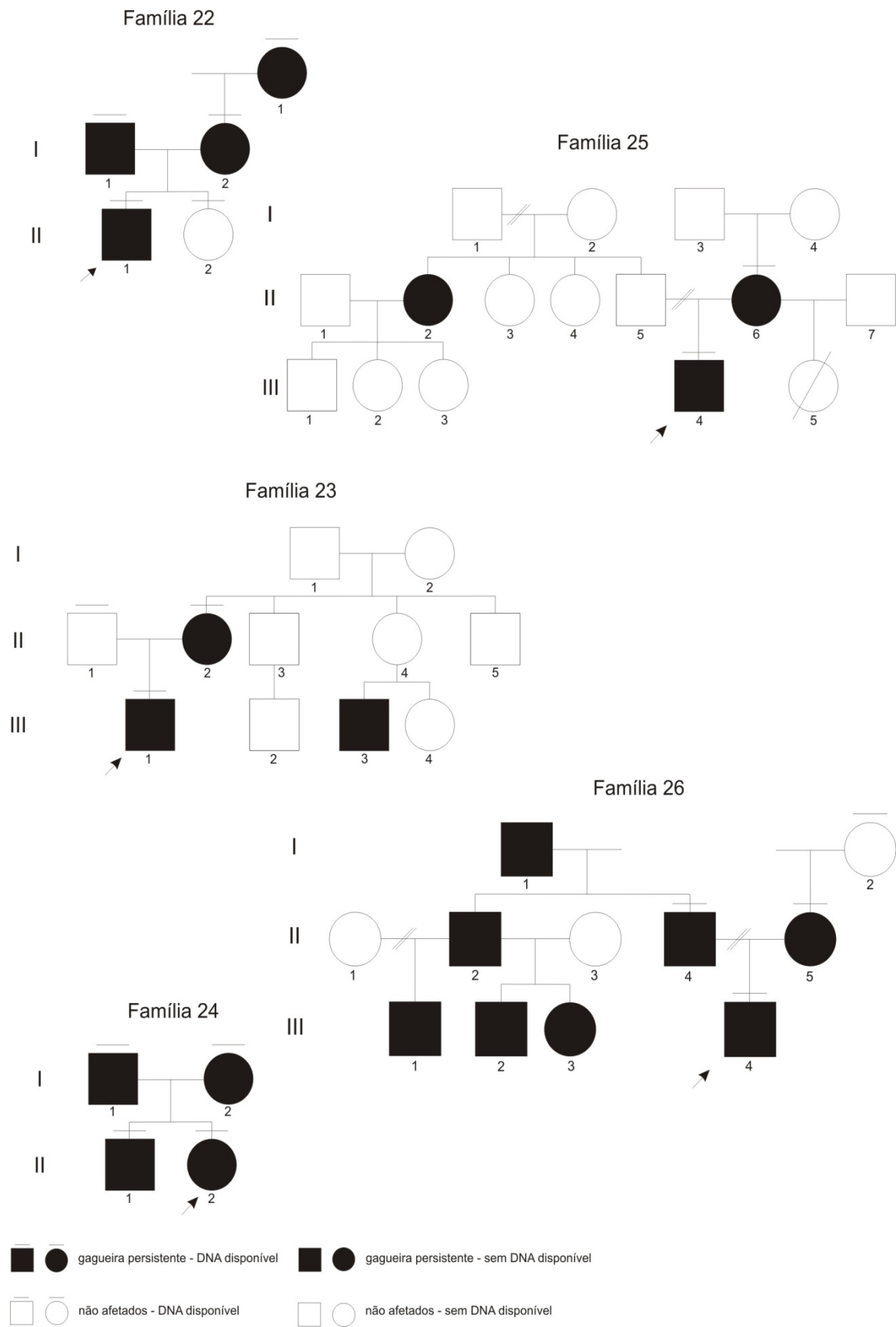


**Figura 3:** Heredogramas das 31 famílias (continuação).



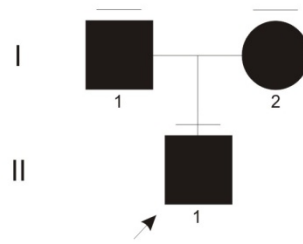
**Figura 3:** Heredogramas das 31 famílias (continuação).



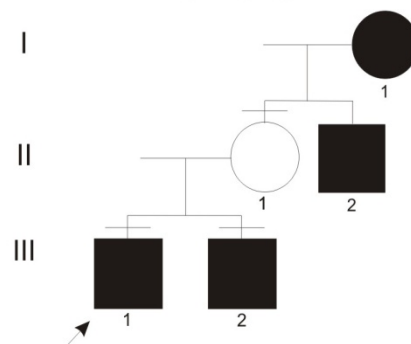


**Figura 3:** Heredogramas das 31 famílias (continuação).

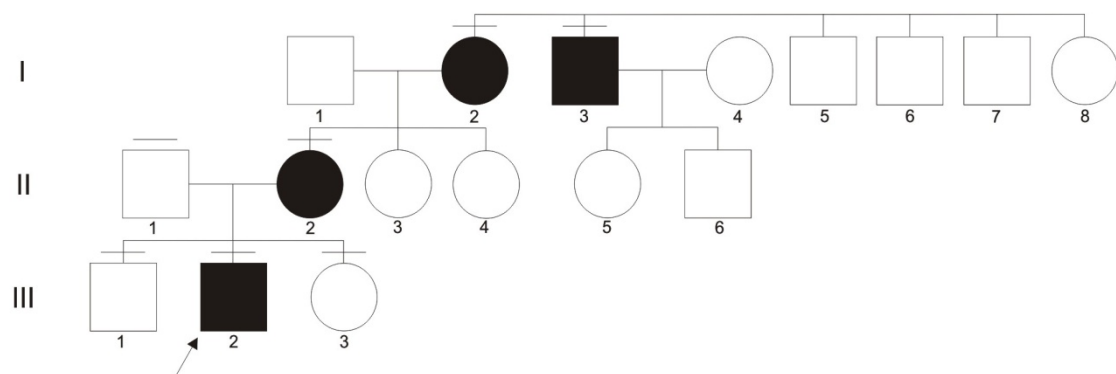
Família 27



Família 28

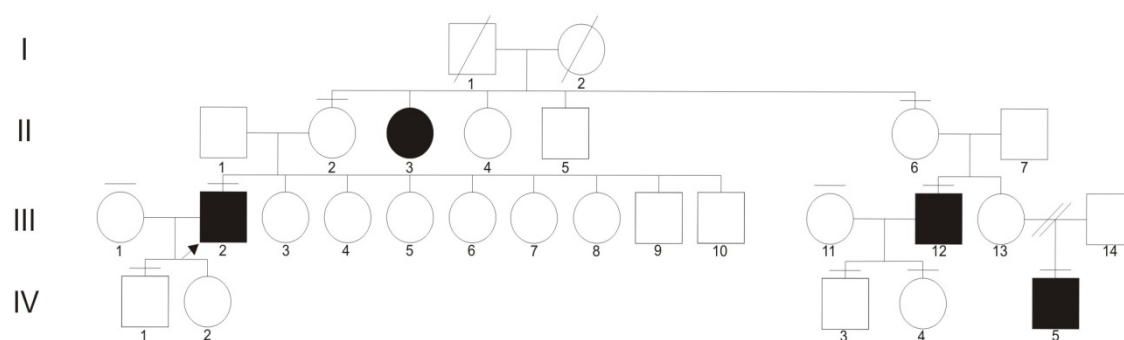


Família 29

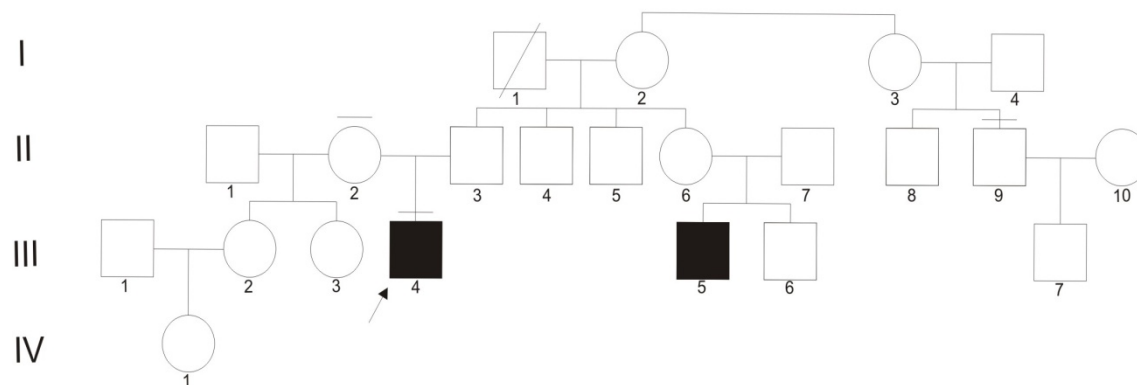


**Figura 3:** Heredogramas das 31 famílias (continuação)

Família 30



Família 31



**Figura 3:** Heredogramas das 31 famílias (continuação).

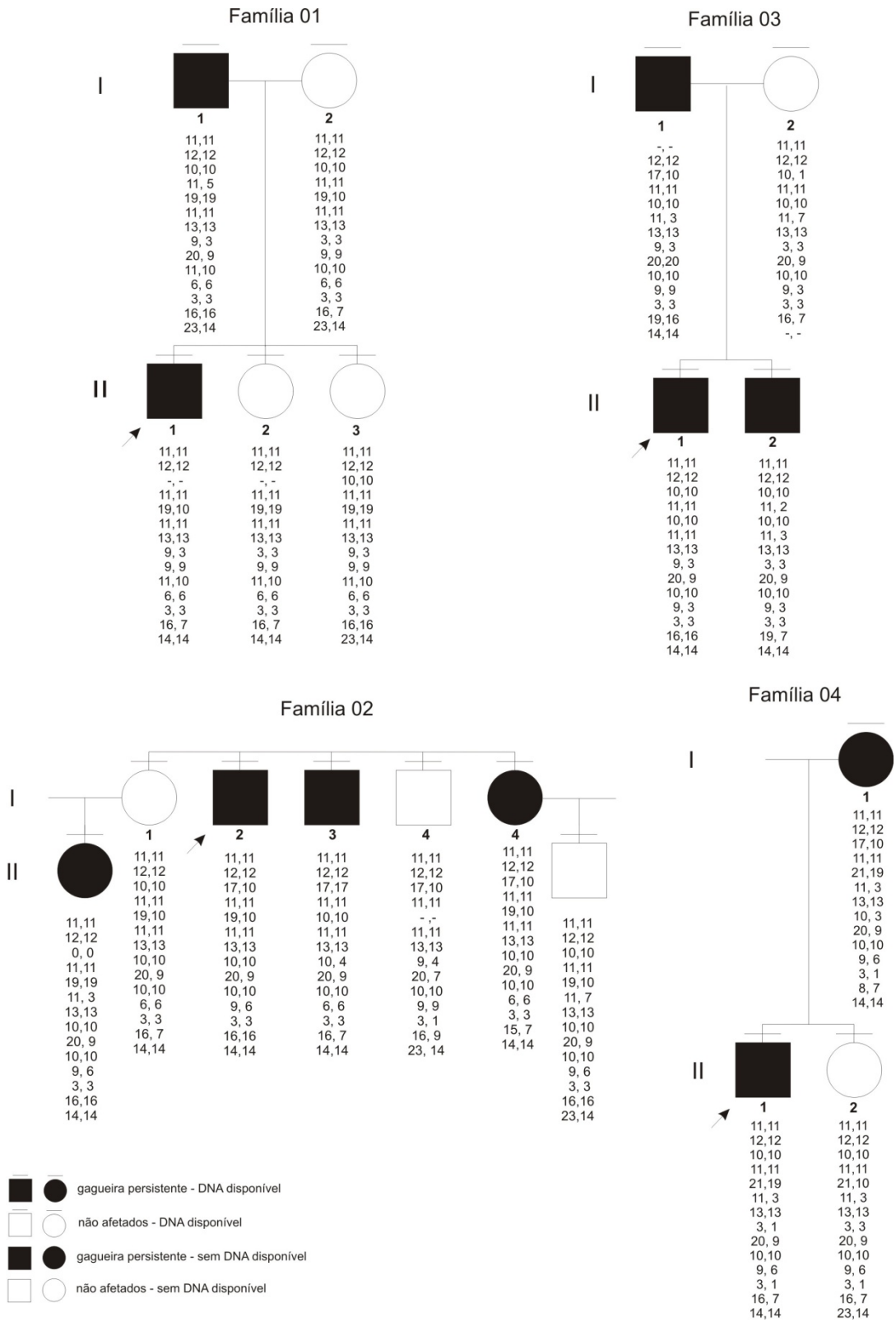
**Tabela 5:** Caracterização do grupo amostral.

Origem	Número de Famílias	Número de Indivíduos	Distribuição por sexo		Diagnóstico fonoaudiológico					
			Masculino	Feminino	Gagos		Fluentes		Gagos Recuperados	
					Masculino	Feminino	Masculino	Feminino	Masculino	Feminino
Noroeste do Estado de São Paulo	23	157	91	66	45	9	36	53	10	4
Região Metropolitana da Cidade de São Paulo e Campinas	8	28	17	11	15	6	2	5	0	0

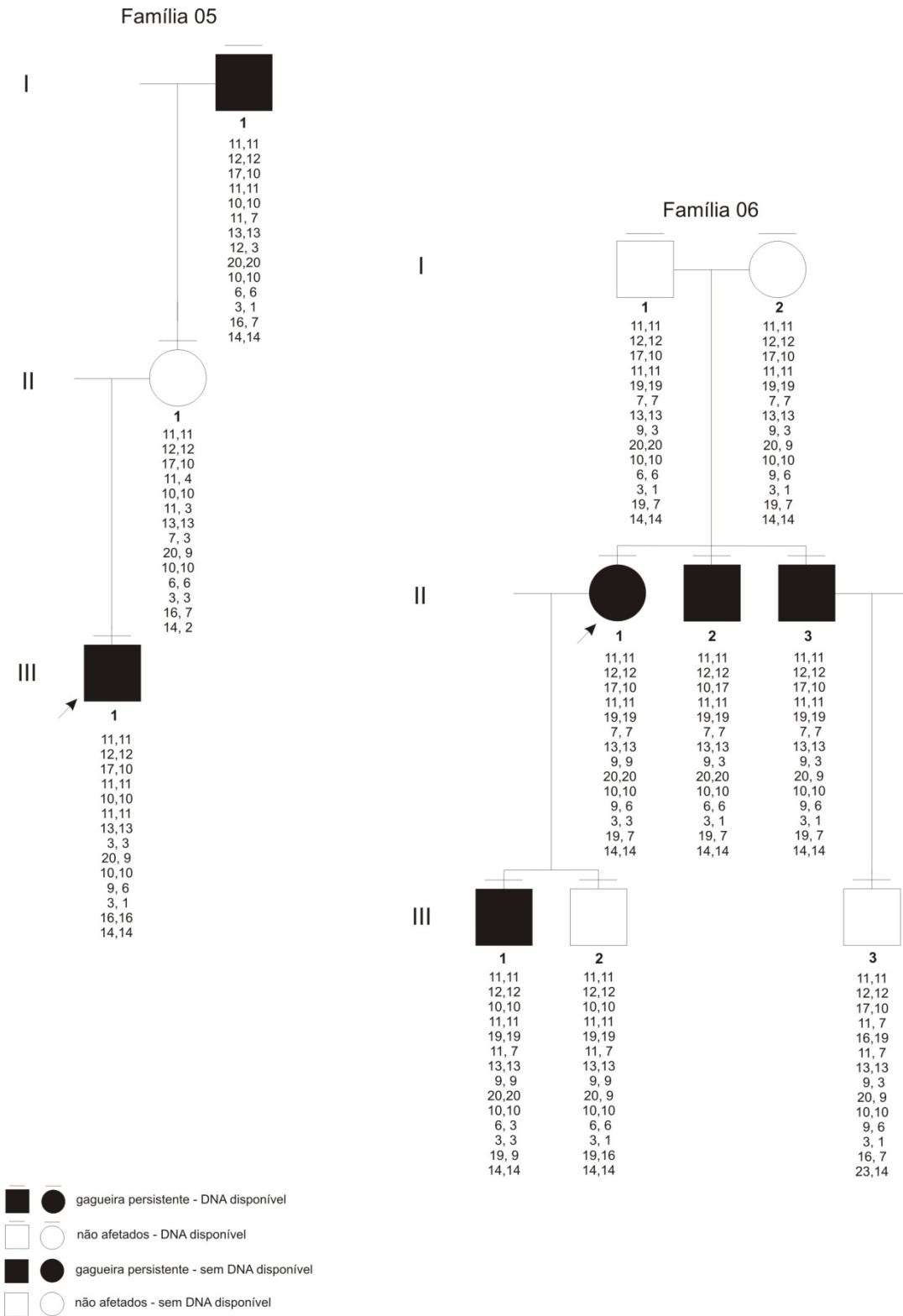
## 4.2. Análise molecular

Para a análise dos dados obtidos a partir da corrida eletroforética em capilar, no sequenciador automático, foi utilizado o programa GeneScan® Analysis (Applied Biosystems, EUA). Para realizar a análise das amostras, os picos dos fragmentos do marcador *GeneScan™ – 500 ROX™ Size Standard* foram utilizados como parâmetros para cada leitura. Uma vez configurado os parâmetros de análise, o programa exibia o padrão de leitura, os dados dos fragmentos em pares de base (pb), bem como em forma de eletroferograma. Os genótipos homocigoto e heterocigoto foram deduzidos a partir das análises dos fragmentos (pb) e dos eletroferogramas.

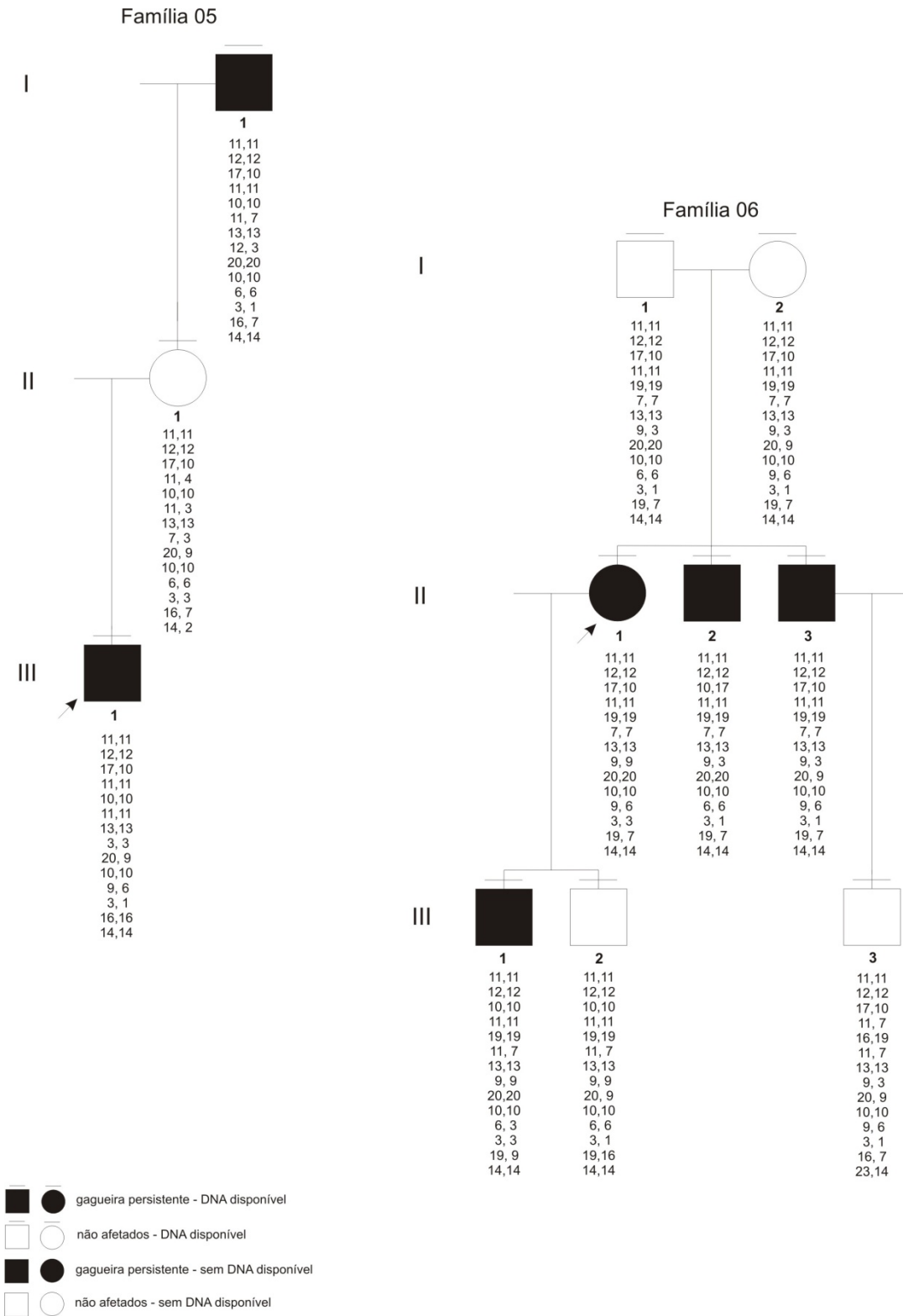
A distribuição alélica nas famílias está representada nos heredogramas na figura 4. Os alelos são apresentados de cima para baixo na seguinte ordem: D18S1146, GATA178F11, D18S1098, D18S1370, D18S52, D18S452, D18S1376, D18S78, D18S1104, D18S877, D18S847, D18S348, D18S1133, D18S57. Em alguns heredogramas e marcadores houveram falhas, simbolizados por traço (-,-).



**Figura 4:** Heredogramas das 31 famílias com os respectivos alelos para os 14 marcadores.

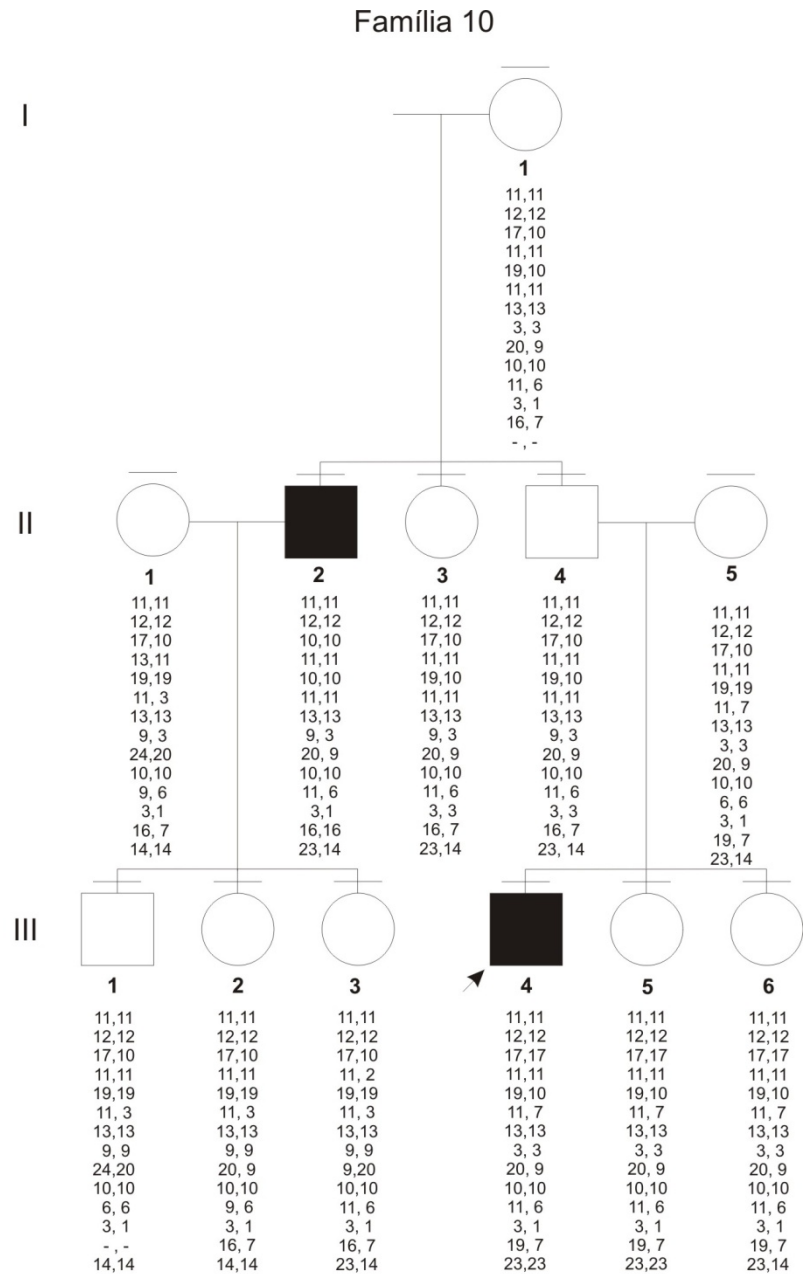


**Figura 4:** Heredogramas das 31 famílias com os respectivos alelos para os 14 marcadores.(continuação)

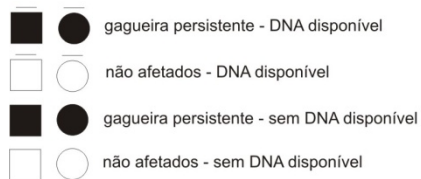
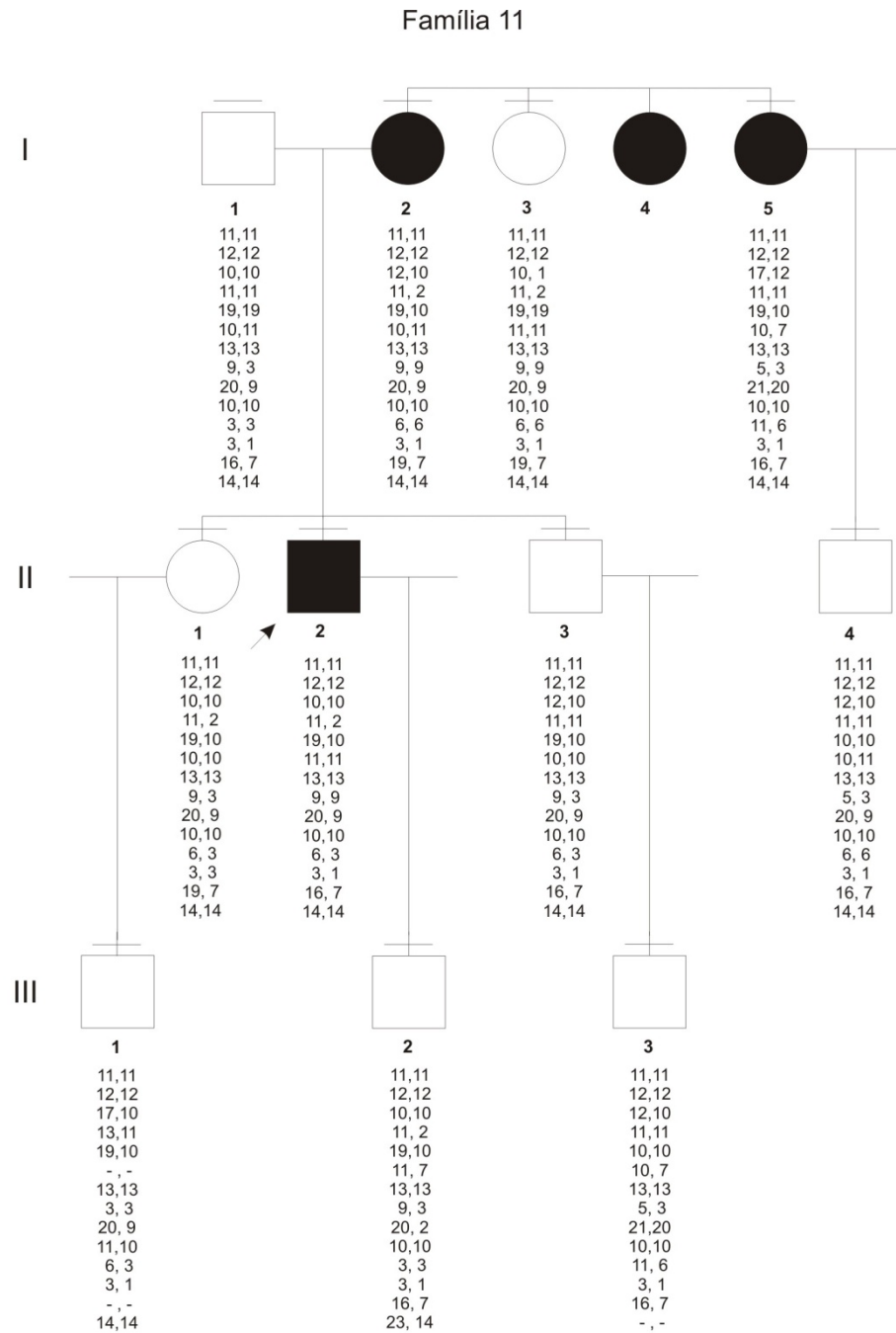


**Figura 4:** Heredogramas das 31 famílias com os respectivos alelos para os 14 marcadores.(continuação)

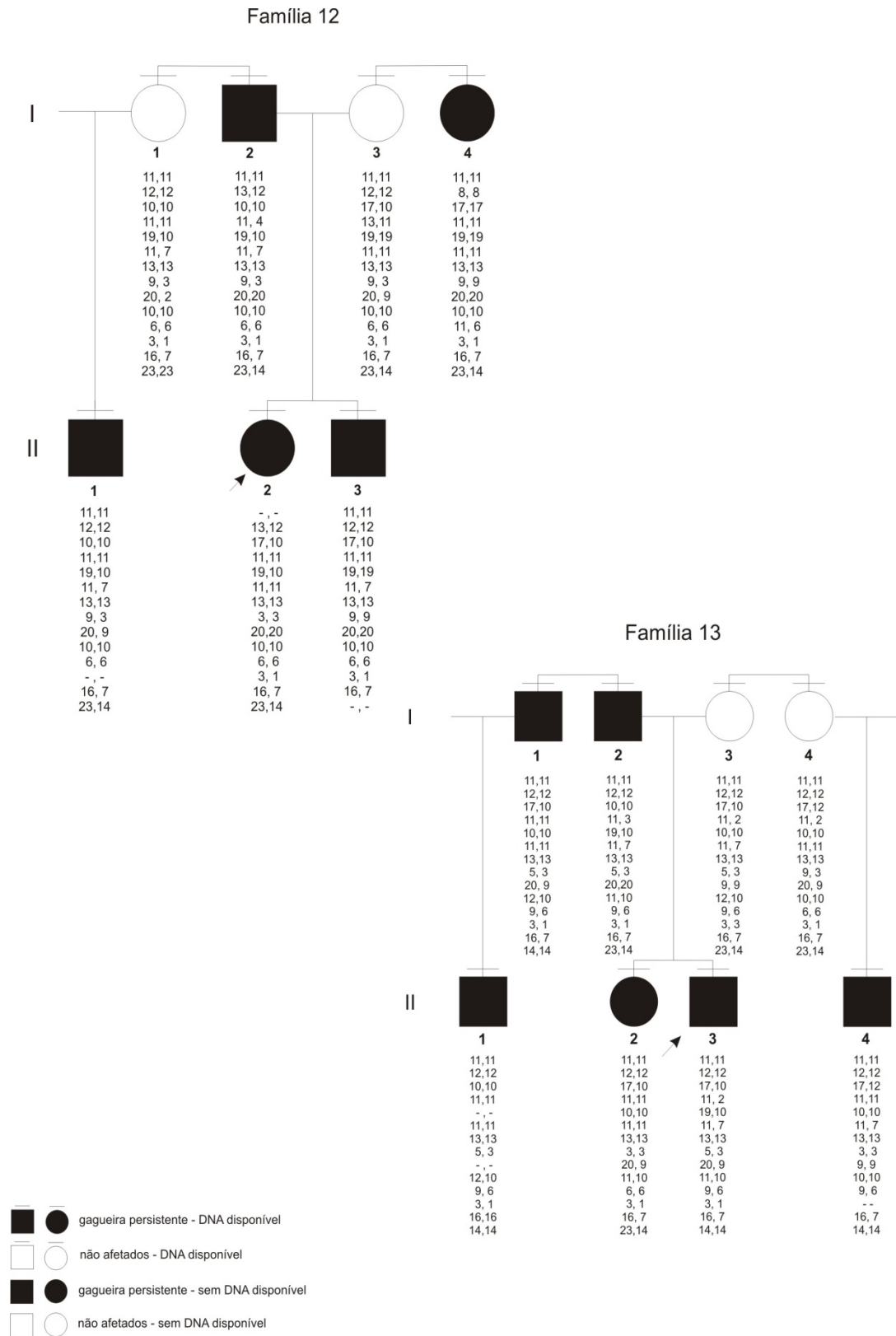




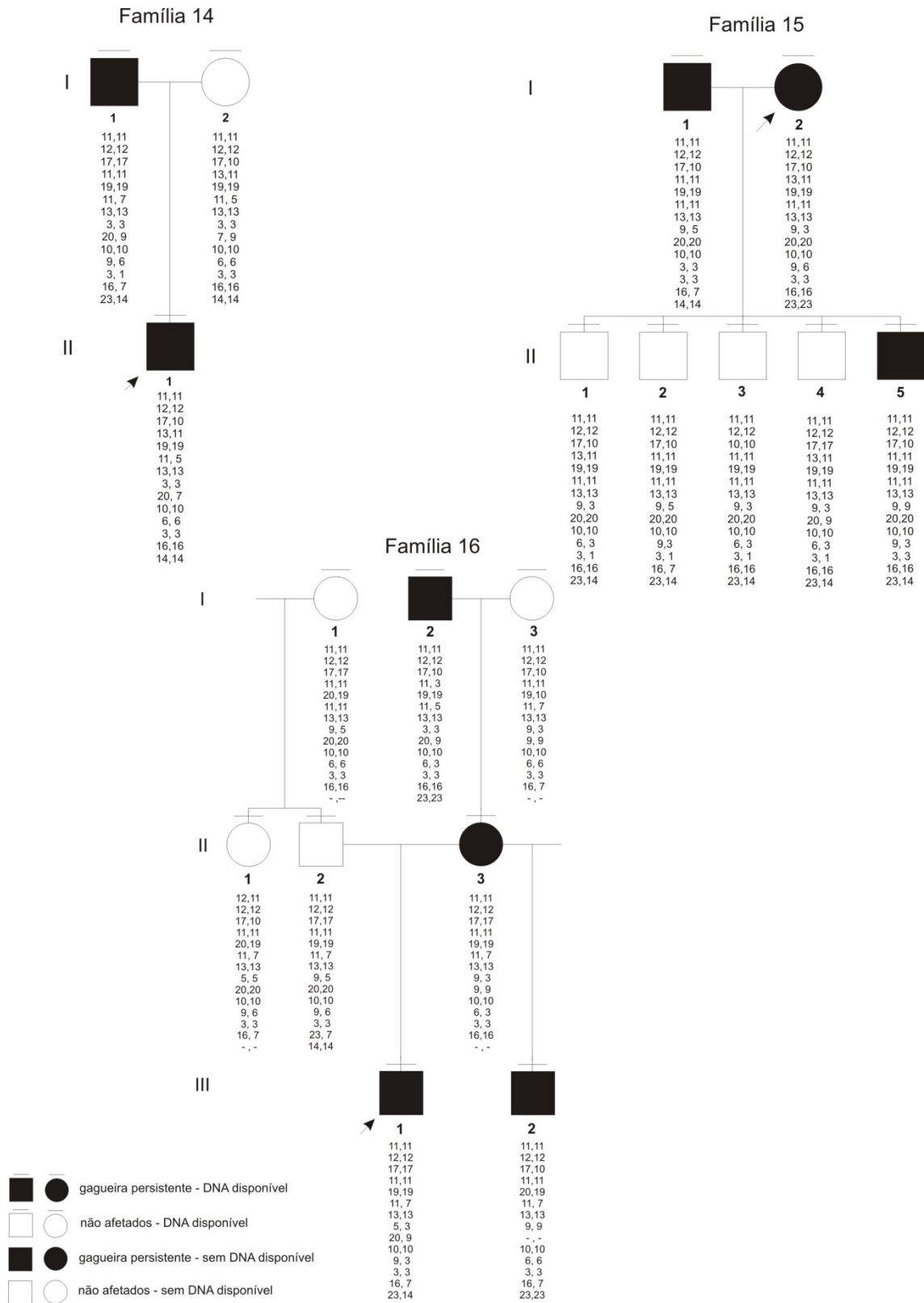
**Figura 4:** Heredogramas das 31 famílias com os respectivos alelos para os 14 marcadores.(continuação)



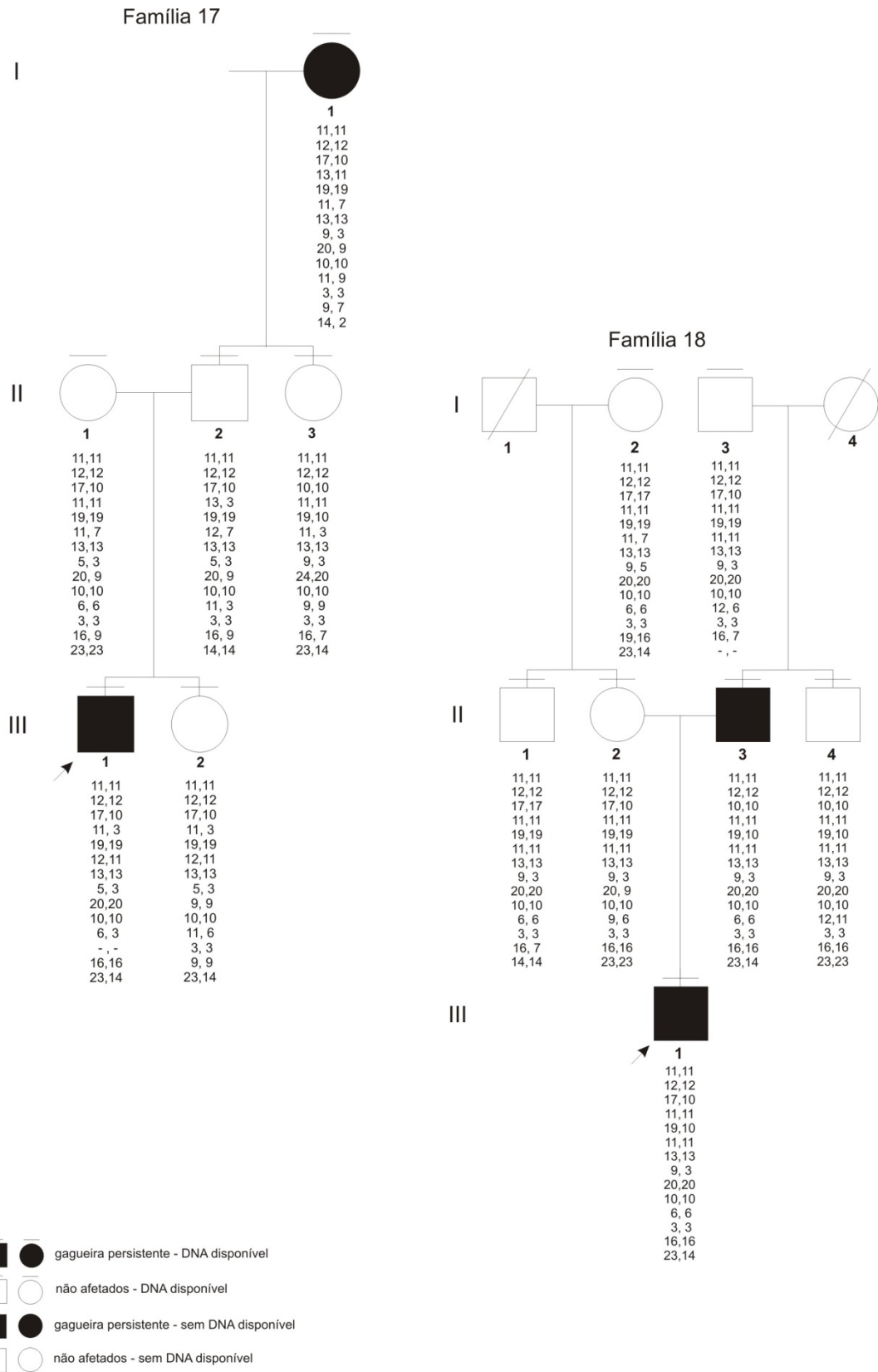
**Figura 4:** Heredogramas das 31 famílias com os respectivos alelos para os 14 marcadores.(continuação)



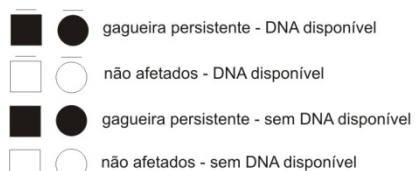
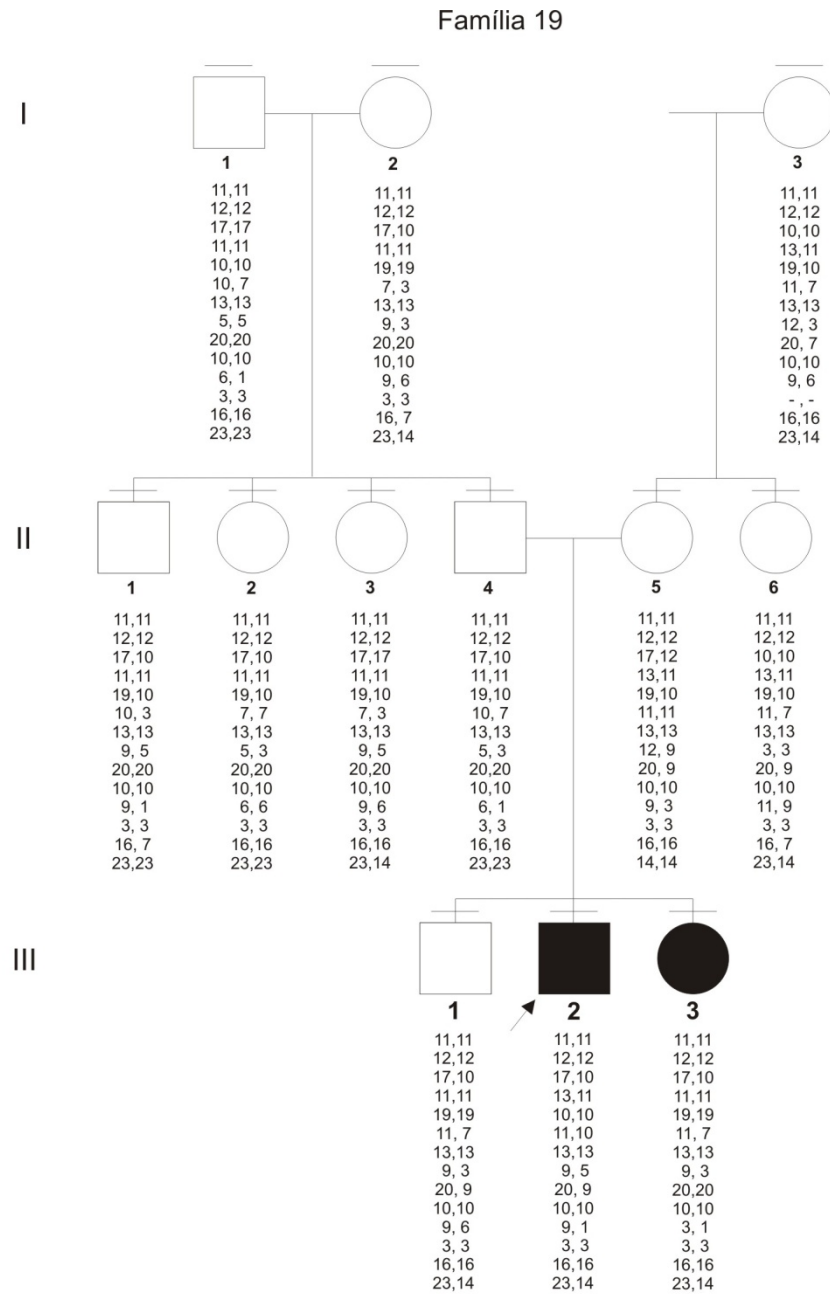
**Figura 4:** Heredogramas das 31 famílias com os respectivos alelos para os 14 marcadores.(continuação)



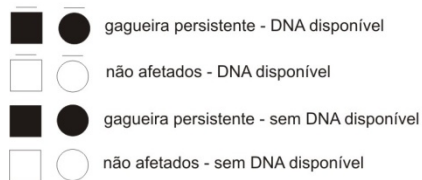
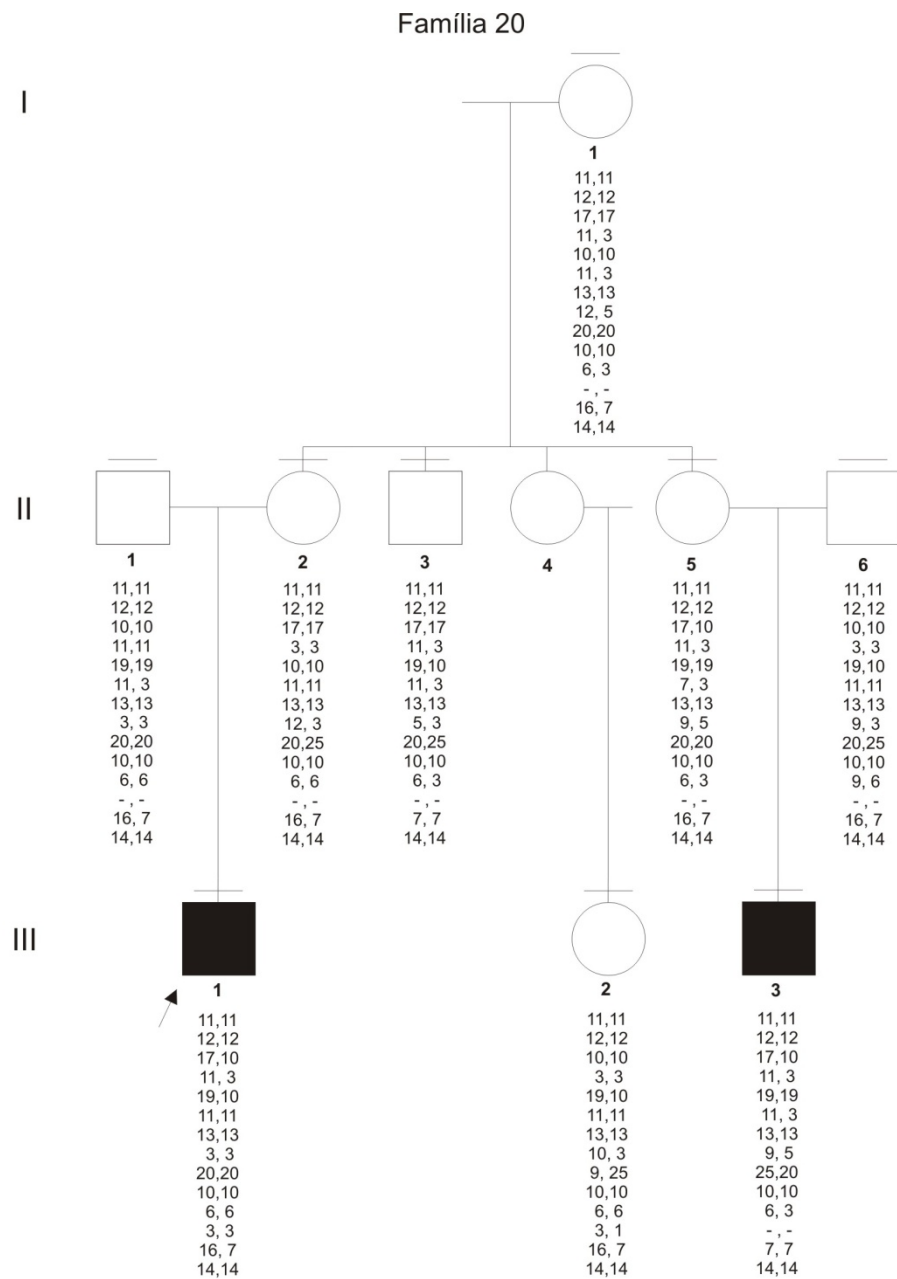
**Figura 4:** Heredogramas das 31 famílias com os respectivos alelos para os 14 marcadores.(continuação)



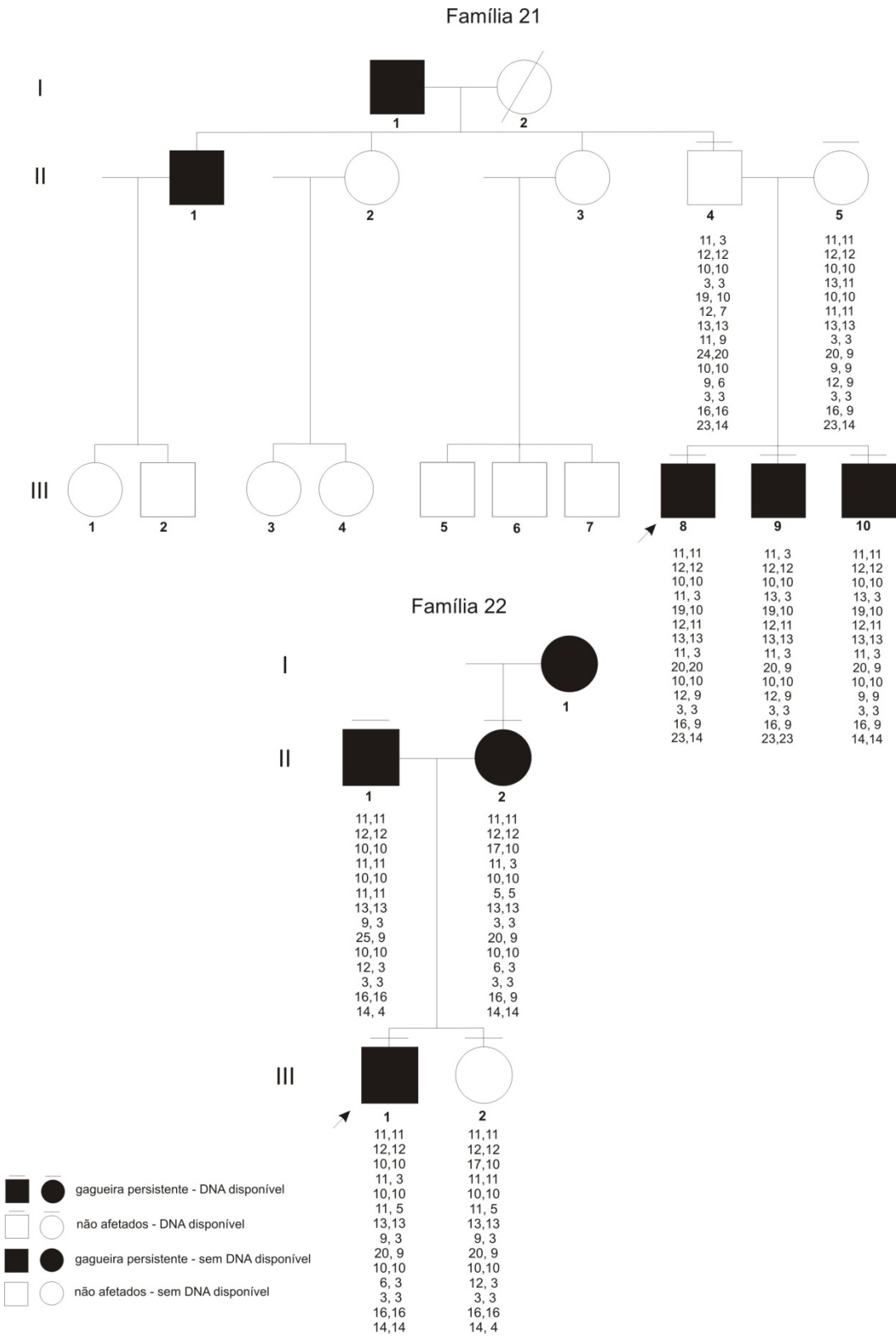
**Figura 4:** Heredogramas das 31 famílias com os respectivos alelos para os 14 marcadores.(continuação)



**Figura 4:** Heredogramas das 31 famílias com os respectivos alelos para os 14 marcadores.(continuação)

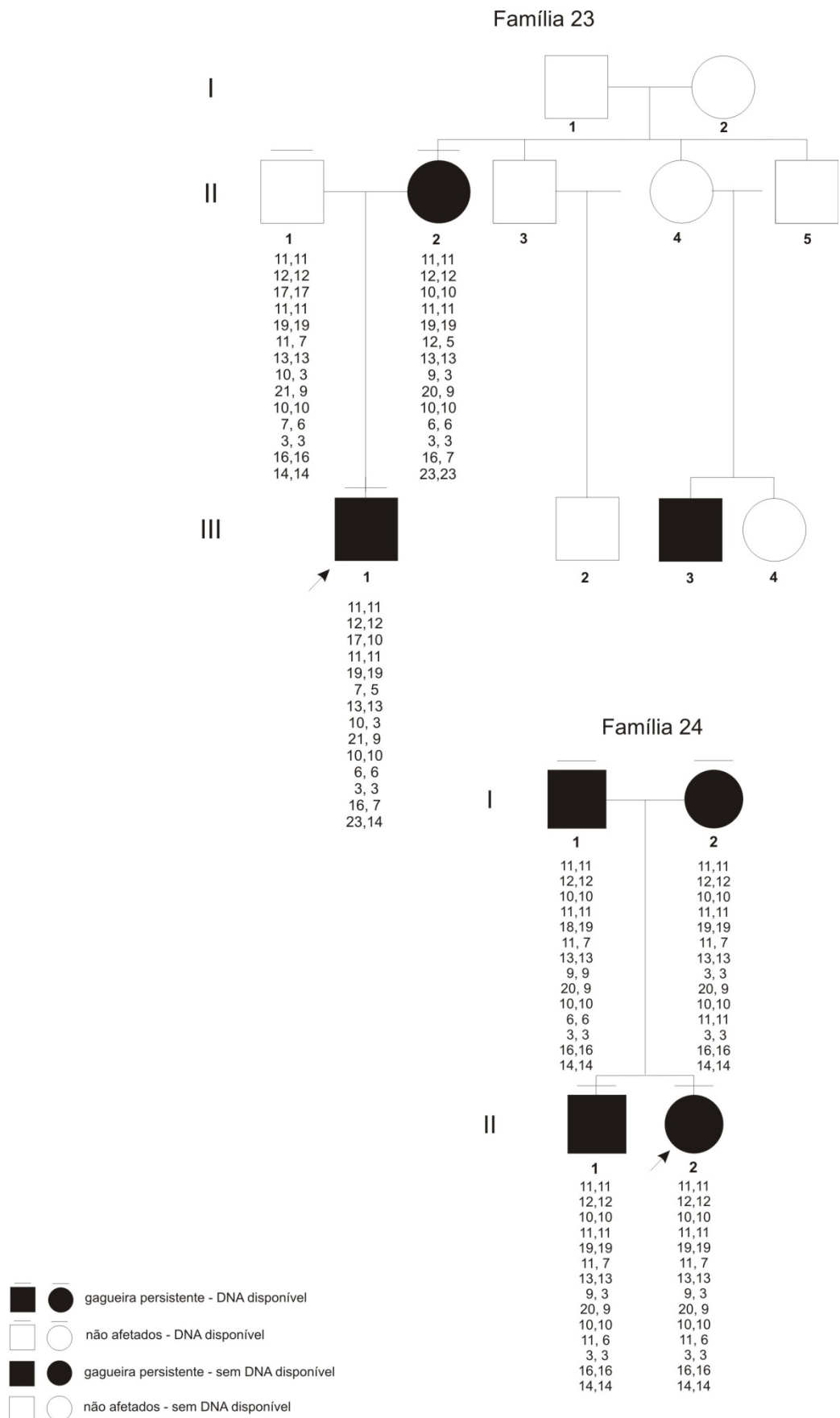


**Figura 4:** Heredogramas das 31 famílias com os respectivos alelos para os 14 marcadores.(continuação)

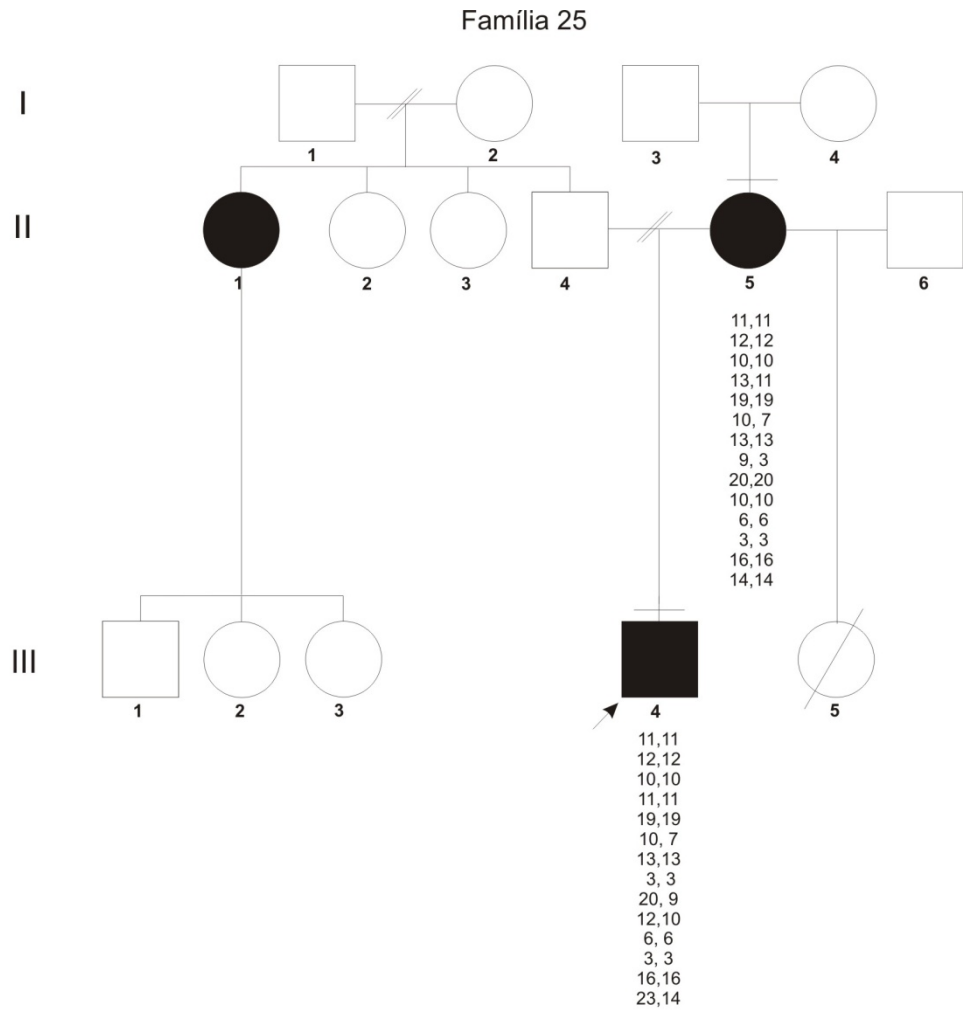


**Figura 4:** Heredogramas das 31 famílias com os respectivos alelos para os 14 marcadores.(continuação)



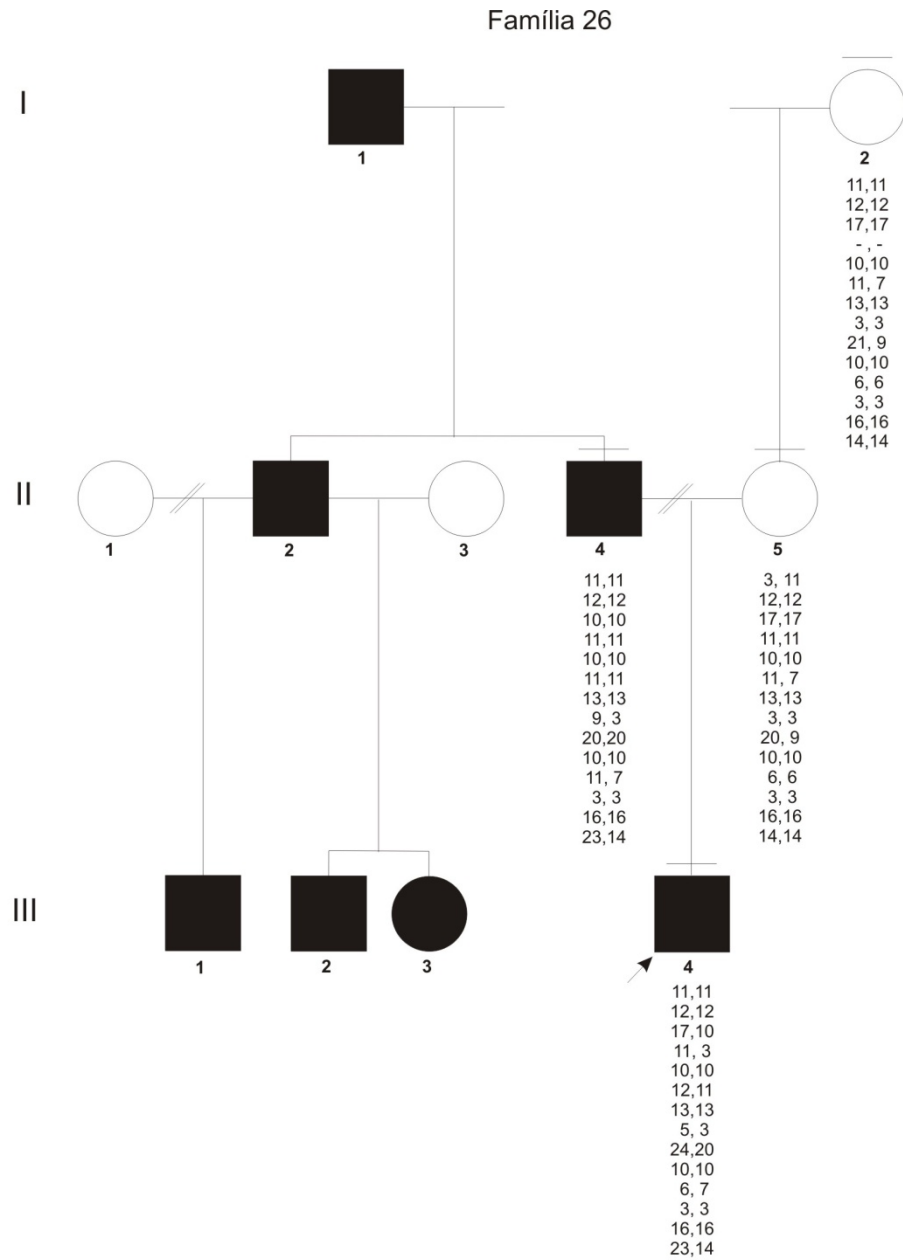


**Figura 4:** Heredogramas das 31 famílias com os respectivos alelos para os 14 marcadores.(continuação)



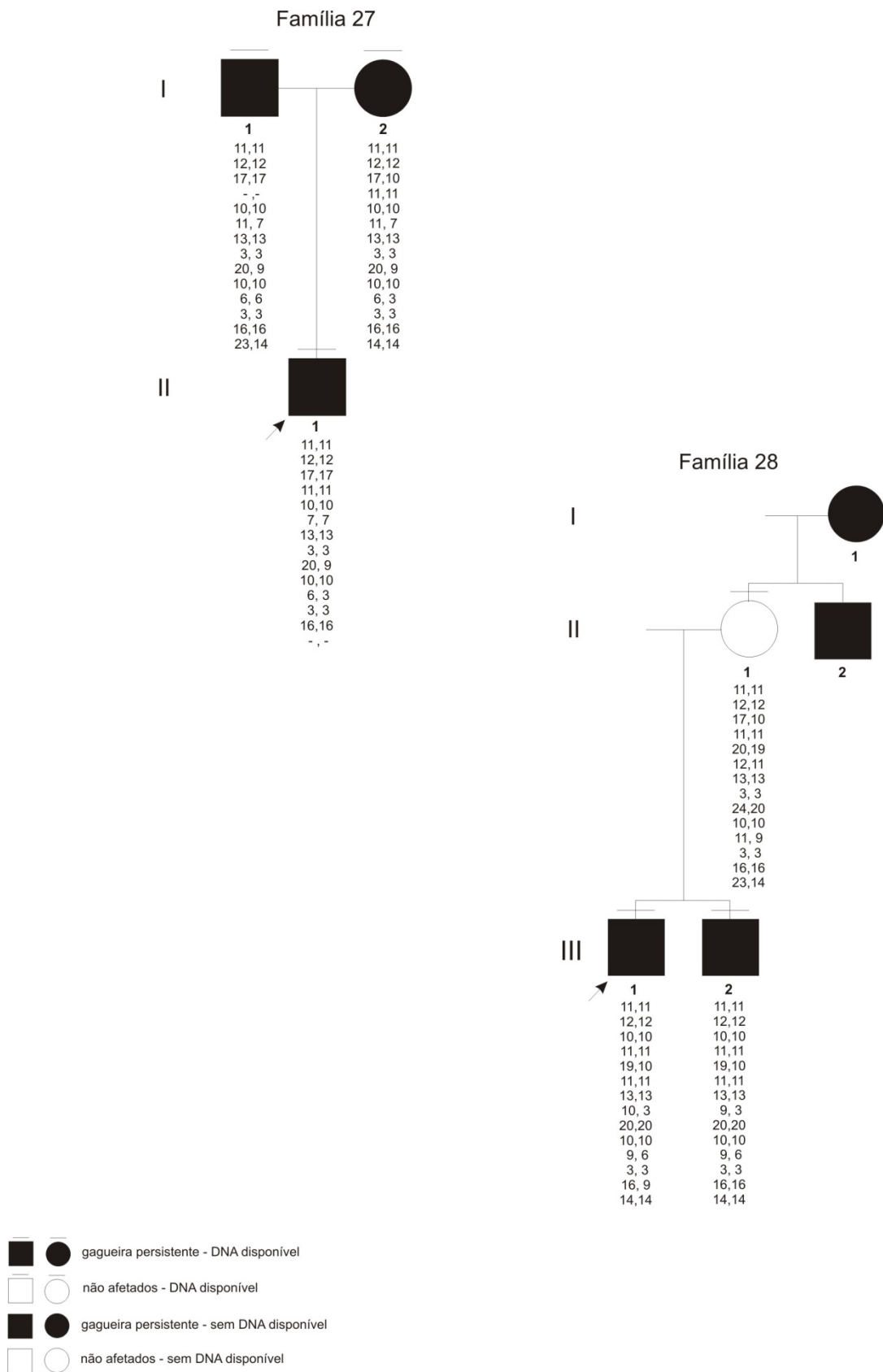
- ● gagueira persistente - DNA disponível
- ○ não afetados - DNA disponível
- ● gagueira persistente - sem DNA disponível
- ○ não afetados - sem DNA disponível

**Figura 4:** Heredogramas das 31 famílias com os respectivos alelos para os 14 marcadores.(continuação)

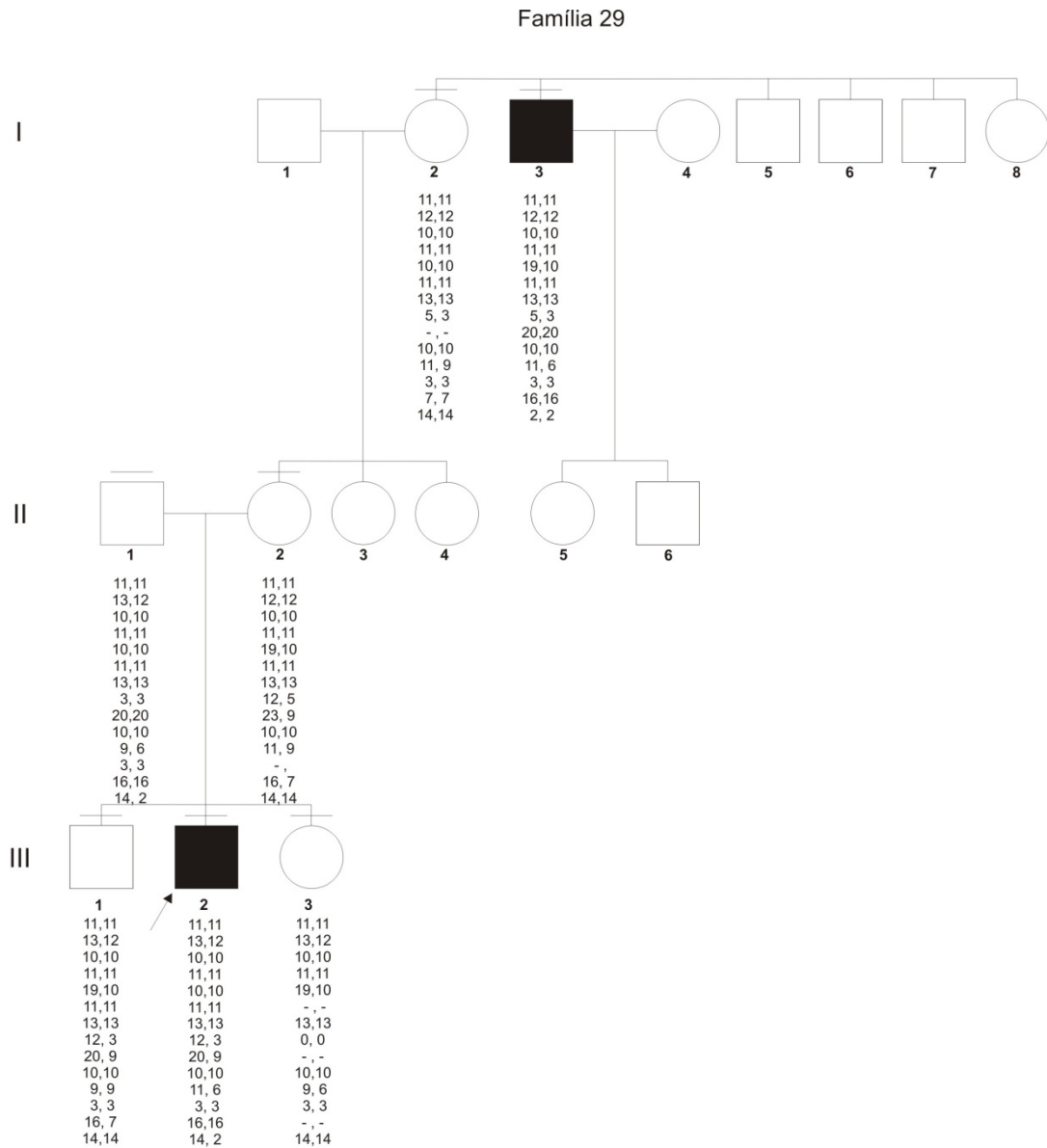


- ● gagueira persistente - DNA disponível
- ○ não afetados - DNA disponível
- ● gagueira persistente - sem DNA disponível
- ○ não afetados - sem DNA disponível

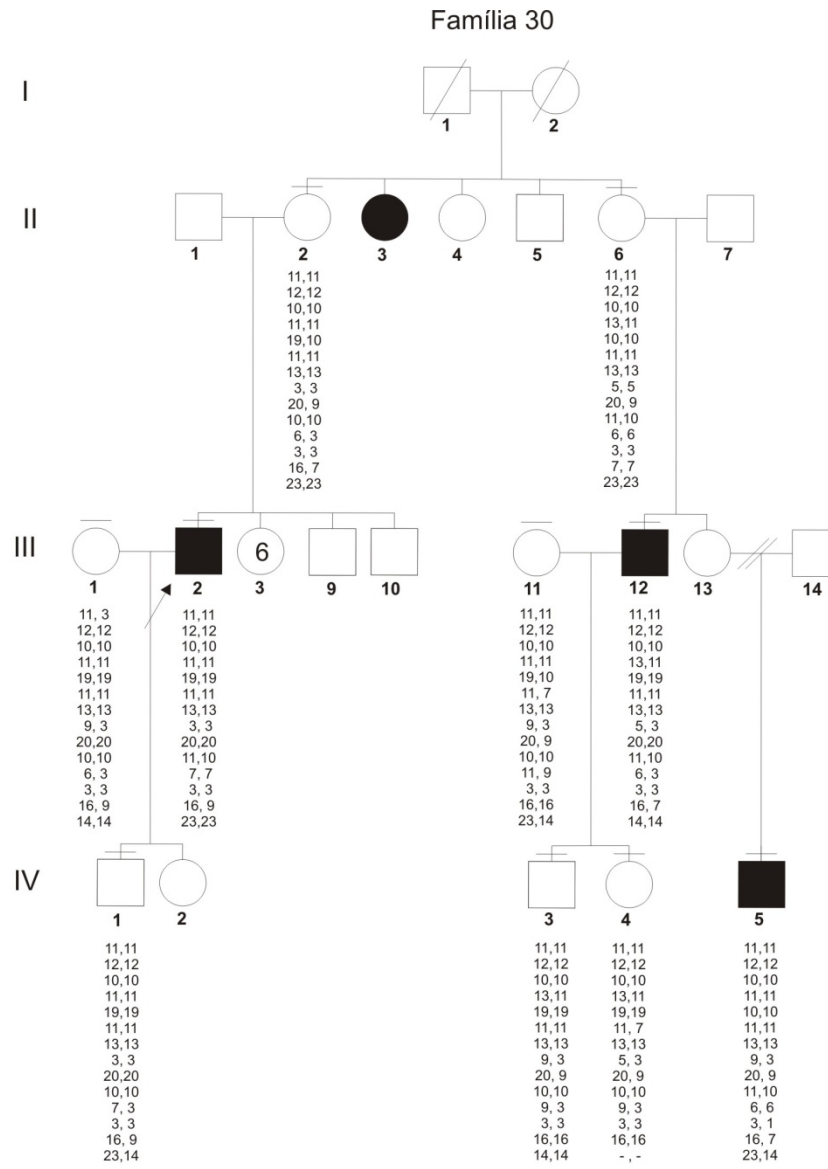
**Figura 4:** Heredogramas das 31 famílias com os respectivos alelos para os 14 marcadores.(continuação)



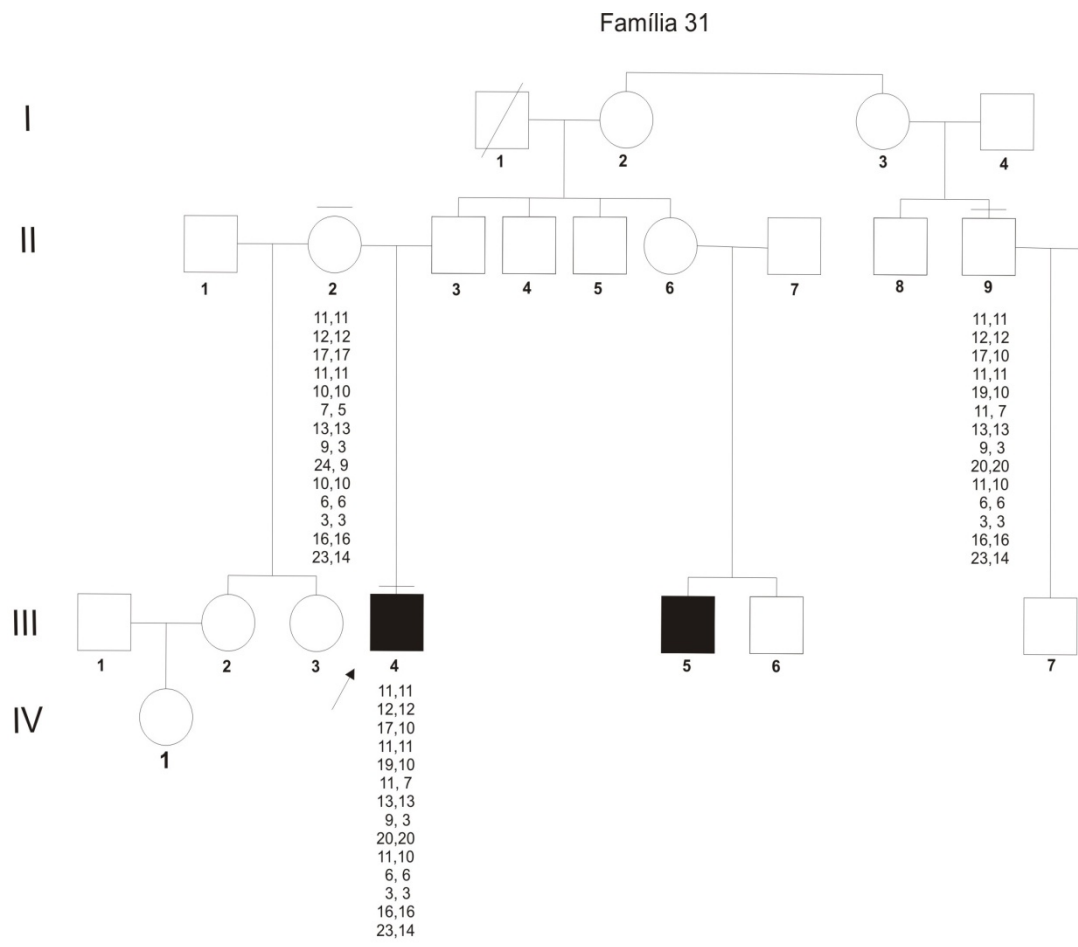
**Figura 4:** Heredogramas das 31 famílias com os respectivos alelos para os 14 marcadores.(continuação)



**Figura 4:** Heredogramas das 31 famílias com os respectivos alelos para os 14 marcadores.(continuação)



**Figura 4:** Heredogramas das 31 famílias com os respectivos alelos para os 14 marcadores.(continuação)



**Figura 4:** Heredogramas das 31 famílias com os respectivos alelos para os 14 marcadores.(continuação)

### **4.3. Análise dos dados**

Os genótipos obtidos para as 185 amostras foram tabulados e utilizados para gerar arquivos de entrada para os programas SIMWALK 2 (Sobel & Lange, 1996; Sobel; Sengul; Weeks, 2001; Sobel; Papp; Lange, 2002), FBAT (Laird, N. et al, 2000) e POINTER (Lalouel et at., 1983).

#### **4.3.1. Frequencias alélicas**

A análise descritiva da frequência alélica de cada um dos marcadores microssatélites estudados foi realizada identificando o número de alelos por marcador e a distribuição de frequência

As frequências dos marcadores microssatélites obtidas no programa FBAT (Laird, N. et al, 2000) são apresentados na tabela 7. Para cada marcador são utilizadas duas linhas, a superior com o número do alelo e a inferior com a frequência observada. Além disso, são apresentadas as regiões cromossômica em que se localiza cada marcador, bem como sua posição em centimorgans (cM). Observamos que dentre os 14 marcadores microssatélites utilizados nas análises, o que se apresentou mais polimórfico (nove alelos) foi o marcador D18S78 enquanto que, o menos polimórfico (um alelo), foi o D18S452, excluindo-o das análises de associação alélica e genotípica.

#### **4.3.2. Diversidade gênica**

A heterozigose ou diversidade gênica foi estimada no programa FBAT (Laird, N. et al, 2000).

A distribuição dos marcadores na população quanto às taxas de homozigose e heterozigose observadas, bem como a heterozigosidade observada e a obtida a partir do *Marshfiled Genetic Maps*, estão apresentados na tabela 8. Taxas distintas de



heteroziguidade são verificadas entre a observada neste estudo, grupo amostral de 185 indivíduos brasileiros, e a obtida na literatura, a partir de um grupo amostral de 520 indivíduos caucasianos, pertencentes às Famílias do *Centre d'Etude Du Polymorphisme Humain* (CEPH) ([www.marshfieldclinic.org](http://www.marshfieldclinic.org)).

Observamos que todos os marcadores selecionados apresentaram diferenças quanto à taxa de heterozigose, sendo que a maior discrepância foi verificada no marcador D18S452, que apresentou taxa 0 (zero) enquanto que na literatura, é descrita de 0,84.

A caracterização dos haplótipos e suas frequências também foram analisadas pelo programa FBAT (Laird, N. et al, 2000). Os 13 marcadores microssatélite foram segregados em dois grupos baseando-se em suas relações de proximidade, sendo o grupo 01 constituído pelos marcadores D18S1146; GATA178F11; D18S1098; D18S52; D18S1376; D18S452; D18S78 e o grupo 02, pelos marcadores D18S1104; D18S877; D18S847; D18S457; D18S1133; D18S57. Nesta fase, os marcadores D18S1146, GATA178F11, D18S452 e D18S877 foram retirados das análises por apresentarem taxa de heterozigose muito próxima de zero (tabela 8). Os dois grupos de haplótipos e suas respectivas frequências estão apresentados nas tabelas 9 e 10.

#### **4.3.3. Análise de Associação**

Das 31 famílias com gagueira persistente familiar, uma foi excluída das análises de associação por não apresentar nenhum núcleo familiar informativo (sem heteroziguidade). Assim, as 30 famílias remanescentes, foram submetidas a dois tipos de análises: bi-alélico e multi-alélico. Em cada um dos modos foram contemplados os mesmos modelos genéticos: aditivo, dominante, recessivo e genotípico.

As figuras 5 e 6 exemplificam alguns dos resultados obtidos a partir do estudo de associação pelo programa FBAT. Nelas observamos que não houve indicativos de

associação em nenhum dos dois tipos de análises, uma vez que a hipótese nula, não foi rejeitada ( $p < 0,05$ ).

Nas tabelas 11 e 12 são apresentadas, respectivamente, as associações alélicas e genóticas. Ambas, apresentam os níveis de significância ( $p$ -value) para população agrupada, ou seja, o grupo amostral composto apenas de indivíduos gagos e fluentes e para população não agrupada, na qual o grupo amostral é separado em indivíduos gagos, gagos recuperados e fluentes.

#### **4.3.4. Análise dos genótipos**

As amostras uma vez genotipadas foram submetidas ao programa SIMWALK 2 (Sobel & Lange, 1996; Sobel; Sengul; Weeks, 2001; Sobel; Papp; Lange, 2002). Das 2590 amostras de genotipagem inicialmente planejadas, foram aplicadas nas análises 2496 amostras, tal diferença (94 amostras), deve-se tanto a falhas na etapa de amplificação da PCR e análise dos fragmentos, quanto a erros de genotipagem e de segregação. Além disso, dentre estas exclusões, um indivíduo foi retirado do grupo amostral, por apresentar completa incompatibilidade genotípica. Desta forma, a taxa de erro total estimada foi de 1,27%. Os dados referentes à genotipagem dos microssatélites estão apresentados na tabela 6.

#### **4.3.5. Análise de segregação complexa**

As análises de segregação complexa foram prejudicadas, provavelmente devido à forma de averiguação adotada, na qual o probando e ao menos mais um membro da família, diagnosticado como gago, são necessários para a inclusão da família no grupo amostral. Diversos modelos adotados não convergiram e desta forma foi então realizado um mapeamento de superfície de verossimilhança máxima

utilizando-se mais de 20.000 pontos iniciais, variando a dominância (d), deslocamento (t), frequência gênica (p) e a herdabilidade multifatorial (H).

A figura 7 exemplifica a variação da medida de ajuste ao modelo ( $-2 \ln L$ ) com a dominância (d) fixada em 1 e a frequência (q) fixada em 0,40. No eixo x está representada a distância (t) e no eixo z está representada a herdabilidade (h). Nos modelos aleatório (d, t, q, H = 0) e sem gene principal (d, t, q = 0) não houve convergência, impedindo o cálculo do coeficiente de verossimilhança máxima (tabela 13). O modelo sem a herdabilidade multifatorial (H = 0), entretanto, foi estimado. Dentre os modelos com gene principal, o que apresentou melhor ajuste foi o dominante, com frequência de 0,40.

**Tabela 6:** Distribuição do número de amostras e porcentagem de erro.

MARCADOR	NÚMERO DE AMOSTRAS					% ERRO
	Proposta para genotipagem	Não genotipadas	Genotipadas total	Excluídas das análises	Genotipadas e analisadas	
D18S1146	185	6	179	2	177	1,12
GATA178F11	185	1	184	2	182	1,09
D18S1098	185	4	181	2	179	1,10
D18S1370	185	3	182	5	177	2,75
D18S52	185	5	180	5	175	2,78
D18S1376	185	3	182	0	182	0,00
D18S452	185	0	185	0	185	0,00
D18S78	185	2	183	0	183	0,00
D18S1104	185	5	180	2	178	1,11
D18S877	185	1	184	3	181	1,63
D18S847	185	1	184	2	182	1,09
D18S457	185	15	170	2	168	1,18
D18S1133	185	4	181	4	177	2,21
D18S57	185	12	173	3	170	1,73
TOTAL	2590	62	2528	32	2496	1,27

**Tabela 7:** Frequencia observada dos marcadores microssatélites

<b>Região cromossômica</b>	<b>Microssatélite UNISTS</b>	<b>Posição (cM)</b>	<b>Alelos /Frequencia</b>								
18p11.32	D18S1146 13737	2,1	3	11							
			0,011767	0,988233							
	GATA178F11 498553	2,8	12	13							
	D18S1098 4883	5,6	1	10	12	17					
			0,011513	0,564898	0,000000	0,423589					
18p11.31	D18S1370 55295	6,9	2	3	4	5	11	13			
			0,012166	0,048141	0,000000	0,012166	0,854536	0,072993			
	D18S52 80913	9,3	10	16	18	19	20	21			
			0,363636	0,000000	0,011364	0,602273	0,011364	0,011364			
	D18S1376 72775	16,5	3	5	7	10	11	12			
			0,070655	0,034434	0,251944	0,022842	0,620125	0,000000			
	D18S452 17066	18,7	13								
			1,0								
	D18S78 147771	19,6	1	3	4	5	7	9	10	11	12
			0,011364	0,568182	0,000000	0,079545	0,000000	0,272727	0,022727	0,011364	0,034091
18q11.2	D18S1104 43199	49,6	2	7	9	20	21	23	24	25	
			0,000000	0,022875	0,302379	0,617559	0,022875	0,000000	0,011437	0,022875	
18q12.1	D18S877 45947	54,4	10	11	12						
			0,988303	0,011697	0,000000						
	D18S847 76273	56,7	1	3	6	7	9	11	12		
			0,011459	0,125570	0,549750	0,011459	0,210380	0,057103	0,034281		
	D18S457 32805	58,5	1	3							
			0,144737	0,855263							
	D18S1133 31675	61,7	7	8	9	16	19				
			0,240697	0,022856	0,045841	0,633531	0,057076				
18q12.2	D18S57 77950	62,8	2	4	14	23					
			0,025256	0,012628	0,710578	0,251538					

**Tabela 8:** Distribuição dos marcadores microssatélites quanto à homozigose, heterozigose, heterozigosidade observada e heterozigosidade (Marshfield Genetic Maps)

<b>Microssatélite</b>	<b>N</b>	<b>Heterozigotos Observados</b>	<b>Homozigotos Observados</b>	<b>Heterozigosidade Observados</b>	<b>Heterozigosidade (Marshfield Genetic Maps)</b>
D18S1146	179	5	174	0,0279	0,51
GATA178F11	185	6	179	0,0324	0,82
D18S1098	181	90	91	0,4972	0,56
D18S1370	182	54	128	0,2967	0,82
D18S52	180	69	111	0,3833	0,76
D18S1376	182	95	87	0,5219	0,60
D18S452	184	0	184	0,0000	0,84
D18S78	183	120	63	0,6557	0,43
D18S1104	180	118	62	0,6555	0,87
D18S877	184	17	167	0,0923	0,70
D18S847	184	118	66	0,6413	0,76
D18S457	170	62	108	0,3647	0,42
D18S1133	181	113	68	0,6243	0,83
D18S57	173	69	104	0,3988	0,87

**Tabela 9:** Frequencia dos haplótipos do grupo 01 de marcadores microssatélites.

Haplótipo				Frequencia
D18S1098 (5,6 cM)	D18S52 (9,3 cM)	D18S1376 (16,5cM)	D18S78 (19,6 cM)	
10	10	11	3	0,166
10	19	11	3	0,107
10	19	11	9	0,068
17	10	11	3	0,063
17	19	11	3	0,044
17	19	11	9	0,037
10	10	11	9	0,030
10	19	7	3	0,030
10	19	7	9	0,029
17	10	7	3	0,025
10	19	5	3	0,022
17	19	7	3	0,022
17	19	7	9	0,022
10	19	11	5	0,019
10	19	11	10	0,015
10	10	11	5	0,014
10	10	7	5	0,014
10	19	7	5	0,013
17	10	5	3	0,013
17	19	7	5	0,013
10	19	12	9	0,013
10	10	5	3	0,013
10	19	10	3	0,013
17	19	12	9	0,009
17	10	11	11	0,009
10	20	11	9	0,009
10	19	11	12	0,009
10	10	3	7	0,009
17	10	11	12	0,009
10	10	3	3	0,007
10	10	7	9	0,007
10	19	12	5	0,005
10	19	3	3	0,004
12	10	11	3	0,004
17	10	11	9	0,004
17	19	7	10	0,004
12	10	11	9	0,004

**Tabela 9:** Frequencia dos haplótipos do grupo 01 de marcadores microssatélites (*continuação*)

Haplótipo				Frequencia
D18S1098 (5,6 cM)	D18S52 (9,3 cM)	D18S1376 (16,5cM)	D18S78 (19,6cM)	
12	10	7	5	0,004
10	19	12	11	0,004
12	10	10	5	0,004
17	19	3	9	0,004
17	19	3	5	0,004
17	19	5	9	0,004
10	10	11	12	0,004
10	10	7	12	0,004
17	19	11	10	0,004
10	10	7	10	0,004
10	19	7	10	0,004
17	10	11	5	0,004
17	19	11	5	0,003
10	16	11	3	0,002
10	16	11	9	0,002
17	16	11	3	0,002
17	16	11	9	0,002
12	19	10	9	0,002
10	18	11	9	0,002
17	20	11	9	0,002
10	20	7	5	0,002
17	20	11	5	0,002
10	18	7	9	0,002
10	21	11	3	0,002
17	19	3	10	0,002
10	19	3	1	0,002
10	21	3	3	0,002
12	10	10	3	0,002
10	19	11	1	0,002
10	19	10	9	0,002
10	10	10	3	0,002
17	10	11	10	0,002
10	10	11	10	0,002
10	19	12	3	0,001
17	19	12	3	0,001
17	19	12	5	0,001
17	19	12	5	0,001



**Tabela 10:** Frequencia dos haplótipos do grupo 02 de marcadores microsatélites.

Haplótipo						Frequencia
D18S1104 (49,6 cM)	D18S877 (54,4 cM)	D18S847 (56,7 cM)	D18S457 (58,5 cM)	D18S1133 (61,7 cM)	D18S57 (62,8 cM)	
20	10	6	3	16	14	0,152
20	10	6	3	16	23	0,098
9	10	6	3	16	14	0,057
20	10	6	3	7	14	0,057
20	10	9	3	16	14	0,053
20	10	3	3	16	14	0,045
20	10	6	1	7	14	0,032
9	10	6	3	7	23	0,031
9	10	6	1	7	14	0,026
20	10	9	3	7	14	0,019
20	10	11	3	16	14	0,019
20	10	7	3	16	23	0,016
20	10	6	1	16	14	0,015
21	10	6	3	16	14	0,014
9	10	9	3	16	23	0,014
9	12	6	3	16	23	0,013
9	10	9	3	16	14	0,013
2	10	3	1	7	23	0,013
9	10	9	1	7	14	0,013
20	10	6	3	19	14	0,013
9	10	6	3	16	2	0,013
9	10	9	1	16	14	0,013
2	10	6	1	7	14	0,013
20	11	6	3	7	23	0,010
20	10	3	3	9	14	0,010
9	10	6	3	16	23	0,010
2	10	3	1	7	14	0,010
20	10	1	3	16	23	0,006
7	10	6	3	16	23	0,006
9	10	11	3	7	23	0,006
9	10	3	3	16	14	0,006
9	10	6	3	9	23	0,006
9	10	11	3	9	14	0,006
20	10	11	3	16	23	0,006

**Tabela 10:** Frequencia dos haplótipos do grupo 02 de marcadores microssatélites.(continuação).

Haplótipo						Frequencia
D18S1104 (49,6 cM)	D18S877 (54,4 cM)	D18S847 (56,7 cM)	D18S457 (58,5 cM)	D18S1133 (61,7 cM)	D18S57 (62,8 cM)	
20	10	3	3	16	23	0,006
7	10	6	3	16	14	0,006
9	10	9	1	7	23	0,006
9	10	7	3	16	14	0,006
21	10	11	1	16	14	0,006
9	10	6	1	19	14	0,006
21	10	11	3	16	14	0,006
9	10	11	3	16	23	0,006
9	10	9	3	7	23	0,006
9	10	6	1	16	23	0,006
20	10	9	3	9	14	0,006
20	10	9	3	16	23	0,006
20	10	9	1	7	14	0,006
9	10	6	1	16	14	0,006
9	10	11	3	16	14	0,006
9	10	6	3	7	2	0,006
20	10	6	3	8	14	0,006
7	10	9	1	9	23	0,006
9	10	6	3	7	14	0,006
9	11	6	3	16	14	0,006
2	10	6	1	7	23	0,006
9	10	3	3	16	23	0,006
20	10	7	3	9	23	0,003
20	11	6	3	7	14	0,003
20	10	6	1	7	23	0,003
20	10	6	3	9	14	0,003
25	10	6	3	16	14	0,003
25	10	6	3	7	14	0,003
20	11	6	3	16	23	0,001
20	11	7	3	9	23	0,001
20	11	7	3	16	23	0,001
20	11	6	3	9	23	0,001
20	11	3	3	16	23	0,001
20	11	3	3	9	23	0,001

```

current test mode is multi-allelic
>> model a
current genetic model is additive
>> fbat D18S1146 GATA178F11 D18S1098 D18S1370 D18S52 D18S1376 D18S78 D18S1104 D18S877 D18S847 D18S457 D18S1133 D18S57
trait affection; offset 0.000; model additive; test multi-allelic; minsize 3; min_freq 0.000; p 1.000; maxcmh 1000
Marker Allele# DF CHISQ P
D18S1146 *** less than 2 major alleles ***
GATA178F11 2 1 1.000 0.317311
D18S1098 4 2 4.633 0.098597
D18S1370 6 4 3.344 0.501924
D18S52 6 2 0.907 0.635530
D18S1376 6 5 1.449 0.918830
D18S78 9 6 4.833 0.565405
D18S1104 8 3 5.449 0.141711
D18S877 *** less than 2 major alleles ***
D18S847 7 5 4.716 0.451553
D18S457 2 1 0.159 0.689636
D18S1133 5 4 2.444 0.654756
D18S57 4 2 2.806 0.245816
Total number of test(s): 11

```

**Figura 5:** Exemplo dos resultados obtidos do programa FBAT quanto aos testes bi-alélico e multi-alélico e seus modelos.

Allele	afreq	fam#	S	E(S)	Var(S)	Z	P
h1	0.158	6.5	10.917	12.709	1.814	-1.330	0.183507
h2	0.084	3.3	5.333	5.666	0.767	-0.381	0.703384
h3	0.065	4.5	5.000	5.500	1.125	-0.471	0.637352
h4	0.054	2.0	*****				
h5	0.048	5.2	5.250	4.125	1.516	0.914	0.360816
h6	0.030	3.0	4.000	3.500	0.750	0.577	0.563703

**Figura 6:** Exemplo dos resultados obtidos do programa FBAT quanto as frequencia dos haplótipos.

Tabela 11: Associação alélica

Microssatélite	Nível de Significância (P-Value)	População Agrupada		Nível de Significância (P-Value)	População não Agrupada		
		N gagos	N fluentes		N gagos	N gagos recuperados	N fluentes
D18S1146	0,6234	170	188	0,8596	144	26	188
GATA178F11	0,5251	178	192	0,3689	150	28	192
D18S1098	0,6058	172	190	0,8365	146	26	190
D18S1370	0,9303	174	190	0,3488	146	28	190
D18S52	0,8223	172	188	0,8666	144	28	188
D18S1376	0,2693	176	188	0,5306	148	28	188
D18S452	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
D18S78	0,3986	176	190	0,2944	148	28	190
D18S1104	0,5774	172	188	0,8797	144	28	188
D18S877	0,2918	176	192	0,2025	148	28	192
D18S847	0,9795	176	192	0,7270	148	28	192
D18S457	0,8881	166	174	0,3372	138	28	174
D18S1133	0,8786	176	186	0,5524	148	28	186
D18S57	0,2491	170	176	0,3341	144	26	176

**Tabela 12:** Associação genotípica

Microssatélite	Nível de Significância (P-Value)	População Agrupada		Nível de Significância (P-Value)	População não Agrupada		
		N gagos	N fluentes		N gagos	N gagos recuperados	N fluentes
D18S1146	0,6236	85	94	0,8584	72	13	94
GATA178F11	0,8349	89	96	0,7177	75	14	96
D18S1098	0,9337	87	95	0,2460	73	14	95
D18S1370	0,8909	86	94	0,8638	72	14	94
D18S52	0,3133	88	94	0,4003	74	14	94
D18S1376	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
D18S452	0,5460	95	95	0,4800	74	14	95
D18S78	0,5376	86	94	0,7815	72	14	94
D18S1104	0,3512	88	96	0,3594	74	14	96
D18S877	0,9808	88	96	0,4834	74	14	96
D18S847	0,8748	83	87	0,2879	69	14	87
D18S457	0,8738	88	93	0,6522	74	14	93
D18S1133	0,4172	85	88	0,4003	72	13	88
D18S57	0,5248	86	95	0,6885	73	13	95

**Tabela 13:** Análise de segregação de gagueira

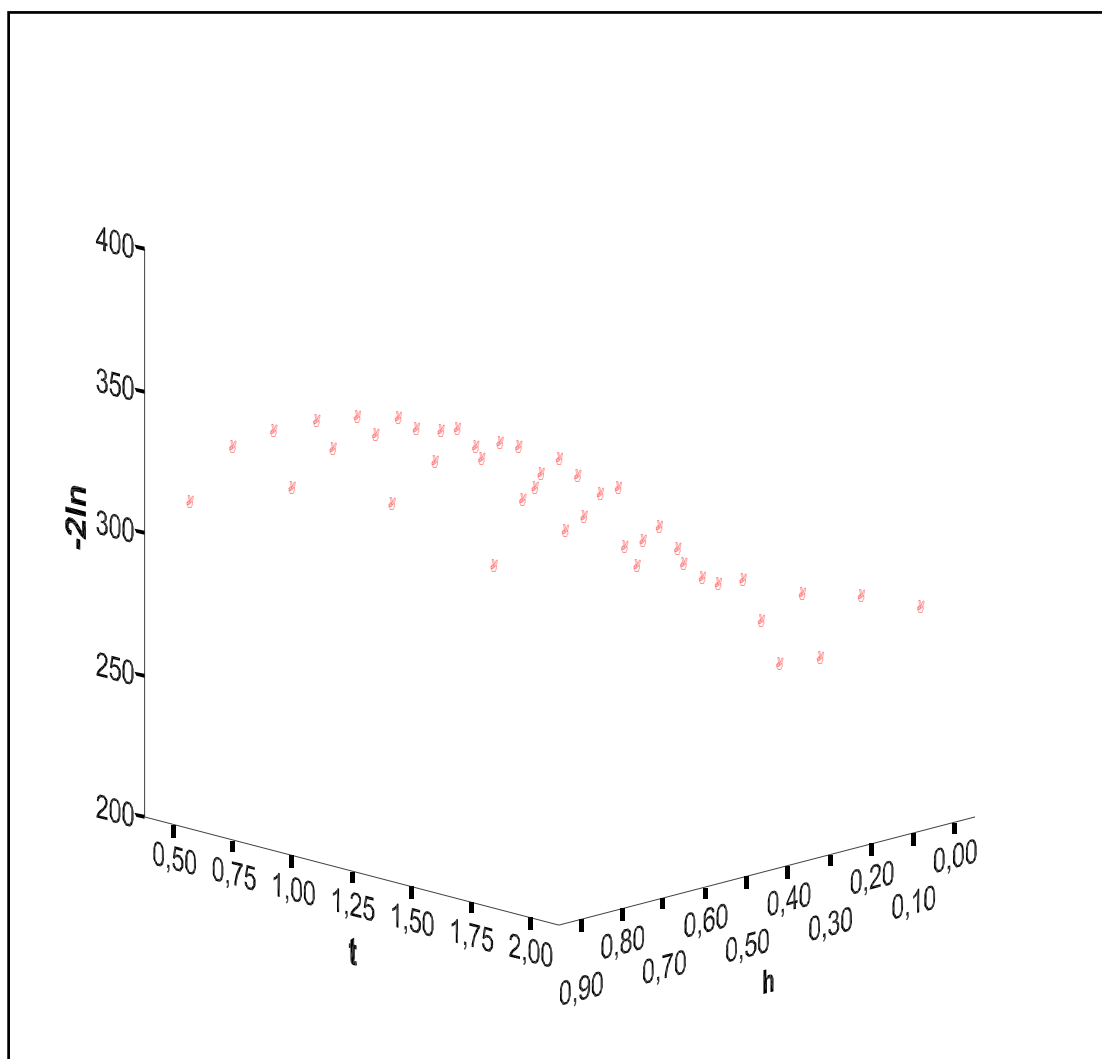
Modelo	<i>d</i>	<i>t</i>	<i>q</i>	<i>H</i>	-2 ln L	AIC
<b>1.Misto</b>	<b>[1]</b>	<b>[0,75]</b>	<b>[0,4]</b>	<b>[0,1]</b>	<b>251,72</b>	<b>251,72</b>
2.Aleatório	[0]	[0]	[0]	[0]	N.C.	-
3.Sem gene principal	[0]	[0]	[0]	-	N.C.	-
4.Sem componente multifatorial	[1]	[1]	[0,3]	[0]	262,61	262,61
5.Recessivo (d=0)	[0]	[0,5]	[0,6]	[0,1]	260,12	260,12
6.Aditivo (d=0,5)	[0,5]	[2,25]	[0,4]	[0,1]	253,94	-
7.Dominante (d=1)	[1]	[0,75]	[0,4]	[0,1]	251,72	251,72

Parâmetros entre colchetes foram fixados no valor indicado.

V = variância; m = média; *d* = grau de dominância; *t* = deslocamento; *q* = frequência alélica;

H = herdabilidade multifatorial; -2 ln L = menos duas vezes o logaritmo neperiano do likelihood.

N.C. - modelo não convergiu.



**Figura 7:** exemplo de variação da medida de ajuste ao modelo ( $-2 \ln L$ )

## 5. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, foram descritos resultados de estudos moleculares no genoma completo em diferentes populações. Trabalhos realizados por Shugart et al.(2004), indicaram ligação das regiões 18p e 18q proximal com a gagueira. Em 2005, Costa et al., visando refinar os estudos nesta mesma região, realizaram análises de ligação em 15 famílias brasileiras com gagueira persistente familiar, com 11 marcadores microssatélites a 5 cM de distância. Os resultados encontrados correspondiam aos da literatura até então, ou seja, havia ligação dessa região com a gagueira. Assim, seguindo a lógica dos estudos, neste trabalho, refinamos as análises, com o estudo de 31 famílias brasileiras com gagueira persistente e 14 marcadores microssatélites a uma distância aproximada de 2 cM. Concomitantemente, publicações com estudos de genoma completo, foram lançadas no meio científico, indicando a ligação desse fenótipo a outros cromossomos. Assim, por se tratar de um estudo pioneiro no Brasil, e que está associado a variações genéticas e populacionais, demos continuidade com as análises de modo a tentar confirmar ou não os achados em nossa população.

Em um grande estudo de genoma completo, com mais de 10.000 marcadores SNP's, com 100 famílias de indivíduos gogos da América do norte, Suíça e Israel foram encontrados indícios de ligação em algumas regiões cromossômicas, as quais se mostraram mais consistentes com o cruzamento de dados sexo específicos.

A população brasileira foi constituída pela miscigenação de povos europeus, africanos e ameríndios, fato este exaustivamente comprovado seja por dados históricos, seja por dados genéticos. Por esse motivo, a ausência de associação dos marcadores microssatélites do cromossomo 18 estudados e a gagueira, pode refletir as diferenças existentes entre a população brasileira, e as populações norte americana e inglesa estudadas por Shugart, et al. (2004).



O refinamento das regiões cromossômicas 18p e 18q proximal, e o aumento do número de famílias no presente estudo, excluiu a associação do fenótipo da gagueira nas famílias paulistas.

O diagnóstico e a terapia fonoaudiológica dos pacientes com gagueira são feitos por profissionais da área especializados nessa afecção e também pela triagem das famílias. Tal medida adotada visa reduzir sobremaneira possíveis erros de diagnóstico uma vez que são capazes de definir critérios específicos, muitas vezes pautados em normas internacionais e aplicá-los de forma criteriosa na seleção das famílias.

A seleção direcionada das amostras pautou-se em famílias com gagueira persistente, nas quais ao menos dois indivíduos eram afetados. Assim, apesar deste critério ter contribuído com a uniformidade do grupo amostral, as análises de segregação complexa foram comprometidas. A escolha de uma população que já apresenta traços de herança genética para o fenótipo, observados durante a triagem, tornou o grupo amostral enviesado para as análises de segregação, não permitindo inferir com precisão quanto aos modelos de herança.

Entender os efeitos de supostos genes da gagueira nas diferentes populações e assim, auxiliar quanto à melhor compreensão dos componentes biológicos envolvidos no mecanismo da fala, são aspectos que fazem parte de um processo que envolve o planejamento do estudo, métodos de análise adequados e a interpretação dos resultados. O potencial do estudo em relação ao tamanho do grupo amostral e a possíveis erros nos genótipos, pode estar relacionado à interpretação de resultados aparentemente negativos.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados da análise de associação não apresentaram indicativos de associação dos 13 marcadores microssatélites (D18S1146, GATA178F11, D18S1098, D18S1370, D18S52, D18S1376, D18S78, D18S1104, D18S877, D18S847, D18S348, D18S1133, D18S57) nas regiões cromossômicas 18p e 18q proximal, com a gagueira familiar persistente.

Outras regiões cromossômicas candidatas como nos cromossomos 1, 5, 7, 9, 12, 13 e 15 vêm sendo estudadas em outras populações por todo o mundo. A diversidade de regiões candidatas, a presença de genes responsáveis pelo desenvolvimento da gagueira, bem como a diversidade populacional, sustenta a hipótese de haver um gene principal e que quando combinado com outros genes, determinam um aumento no risco de ocorrência.

## 7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALM, P.A.; RISBERG, J.; Stuttering in adults: The acoustic startle response, temperamental traits, and biological factors. **Journal of Communication Disorders**, v. 5358, p.41, April, 2006.
- AMBROSE, N., COX, N., YAIRI, E. The Genetic Basis of Persistence and Recovery in Stuttering. **Journal of Speech Language and Hearing Research**, v.40, p.567-580, 1997.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**, 4º ed., Washington DC, American Psychiatric Press, 1994.
- ANDRADE, C. R.F, de; SASSI, F.C.; CAMPANATTI-OSTIZ, H. Terminologia: fluência e desordens da fluência. **Pró-fono**, Carapicuíba, v.13, n.1, p.107-113, 2001.
- ANDRADE, C.R.F., FLUÊNCIA. IN: ANDRADE, C.R.F., BÉFI-LOPES, D.M., FERNANDES, F.D.M.; WERTZNER, H.F. (EDS). **ABFW - Teste de linguagem infantil nas áreas de fonologia, vocabulário, fluência e pragmática**. Carapicuíba SP: Pró-Fono, 2000.
- ANDREWS, G. **The epidemiology of stuttering**. In: CURLEE, R.F.; PERKINS, W.H. (Eds). **Nature and treatment of stuttering: new directions**. San Diego: College-Hill Press, 1984.
- ANDREWS, G., et al. Stuttering: A review of research findings and theories circa 1982. **Journal of Speech and Hearing Disorders**, v.48, p.226-246, 1983.

ANDREWS, G., HARRIS, M. **The syndrome of stuttering, Clinics in developmental medicine**, nº 17. London: Spastic Society Medical Education and Information Unit in association with William Heineman Medical Books Ltd. 1964.

ANDREWS, G.; MORRIS, Y.A; HOWIE, P.; MARTIN, N.G. Genetic factors in stuttering confirmed. **Arch Gen Psychiatry**, v.48, p.1034-5, 1991.

ASHA. **Special Interest Division 4: Fluency and Fluency Disorders**. Terminology pertaining to fluency and fluency disorders. Guidelines. Asha 41(Suppl), p.29-36, mar 1999.

BARBOSA, L.M.G., CHIARI, B.M. **Gagueira – etiologia, prevenção e tratamento**. São Paulo, Pró-fono, 1998.

BERNSTEIN- RATNER, N. **Stuttering: a psycholinguistic perspective**. In: CURLEE, R.F.; SIEGEL, G.M. (orgs). *The nature and treatment of stuttering: new directions*. Boston: Allyn & Bacon, 1997.

BERRY, M. A common denominator in twinning and stuttering. **Journal of Speech Disorders**, v.3, p. 51-57, 1939.

BLOODSTEIN, O. **A handbook on stuttering**. 5 ed. Chicago: National Easter Seal Society, 1995.

BLOODSTEIN, O.; GROSSMAN, N. Early stuttering: some aspects of their form and distribution. **J. Speech Hear. Res.**, v. 24, p. 298-302, 1981.

BORSEL, J.V.; TETNOWSKI, J.A. Fluency disorders in genetics syndromes. **Journal of Fluency Disorders**, v. 32, p. 279 – 296, 2007.

BOTSTEIN, D.; RISCH, N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: Past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. **Nature Genetics**, v. 33 (supl.), p. 228-237, 2003.

BRANDI, E. **Voz falada – estudo, avaliação e tratamento**. São Paulo, Atheneu, 1990, v.1 e 2.

BRIN, M.F., et al. Laryngeal botulinum toxin injections for disabling stuttering in adults. **Neurology**, v.44, 1994.

BRITO PEREIRA, M.M. **A gagueira infantil como resultado da interação dos fatores sociais e emocionais**. Tratando Gagueira: diferentes abordagens. São Paulo, Cortez, p. 41, 2002.

BRYNGLESON, B. A study of laterality of stutterers and normal speakers. **Journal of Speech Disorders**, v.4, p.231-234, 1939.

BRYNGLESON, B. Sidedness as an etiological factor in stuttering. **Journal of Genetic Psychology**, v.47, p.204-217, 1935.

BRYNGLESON, B., RUTHERFORD, B. A comparative study of laterality of stutterers and non-stutterers. **Journal of Speech Disorders**, v.2, p. 15-16, 1937.

BUDWOLE, B. Analysis of the VNTR Locus D1S80 by PCR followed by high resolution PAGE. **Am. J. Hum. Genet.** , v.48, p.137-44, 1991.

BÜCHEL, C.; SOMMER, M. What cause stuttering? **Plos Biol**, v.2, 2004.

CAMPBELL, J.; HILL, D. **Systematic disfluency analysis. Stuttering Therapy**. In: Northwestern University and Stuttering Foundation of America. Memphis, p.51-75. 1998.

CANHETTI-OLIVEIRA , C.M.C. **Gagueira Familiar: Aspectos fonoaudiológicos e genéticos**. Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista/Botucatu. Botucatu, 2004.

CANHETTI-OLIVEIRA, C.M.; RICHIERI-COSTA, A. A study of familial stuttering. **American Journal of Medical Genetics**, V.140, n 19, p. 2139 – 2141, 2006.

COOPER, E.B. Red herrings, dead horses, straw men, and blind alleys: escaping the stuttering conundrum. **Journal of Fluency Disorders**, v.21, n.4, p.119-135, 1993.

CORDES, A.K.; INGHAM, R.J. Stuttering includes both within-word and between-word disfluências. **J. Speech Hear. Disord.**, v. 38, p. 382 – 386, 1995.

COSTA, F.L. **Análise de ligação da região 18p11.32-11 em portadores de gagueira familiar**. Monografia apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista/Botucatu. Botucatu, 2005.

COX, N.; YAIRI, E. Genetics of stuttering: Insights and recent advances. ASHA leader 5 (16). Bethesda: **Amer. Speech Lang. Hear. Association**. Abstract nº 674. 2000

COX, N.J.; SEIDER, R.A.; KIDD, K.K. Some environmental factors and hypotheses for stuttering in families with several stutterers. **J. Speech Hear. Res.**, v.27, p.543-548, 1984.

COX, N.J. Molecular genetics: the key to the puzzle of stuttering? **ASHA**, v.30, n. 4, p. 36-40, 1988.

CRAIG, A.; HANCOCK, K.; TRAN, Y.; CRAIG, M.; PETERS, K. Epidemiology of stuttering in the community across the entire life span. **J Speech Lang and Hearing Research**, v.45, p.1097-1105, 2002.

DEGIOVANI, V.M.; CHIARI, B.M.; SCHIEFER, A.M. Disfluência: caracterização dos tipos e frequências de ocorrência em um grupo de escolares. **Pró-Fono Rev. Atual. Cient.**, v.11, p.32-41, 1999.

**Diagnosis and Statistical Manual of Mental Disorder (DSM-IV)**, 4th edn. American Psychiatric Association, Washington, DC, 1994.

DOUGLAS, J.; HANKS, S.; TEMPLE, I.K., et al. NSD! Mutation are the major cause of Sotos syndrome and occur in some cases of Weaver syndrome but are rare in other overgrowth phenotypes. **Am J Hum Genet.**, v. 72, n.1, p.132-143, 2003.

DRAYNA D, KILSHAW J, KELLY J. The sex ratio in familial persistent stuttering. **Am J Hum Genet** v.65, p.1473-1475, 1999.

DUCHIN, S.W.; MYSAK, E.D. Disfluency and rate characteristics of young adult, middle-age, and older males. **J. Commun Disord.**, v.20, p.245-257, 1987.

DWORZYNSKI, K. et al. Genetic etiology in cases of recovered and persistent stuttering in an unselected, longitudinal sample of young twins. **Am J. Speech Lang Pathol**, v. 16(5), p. 169 – 178, May, 2007.

DWORZYNSKI, K. et al. Genetic etiology in cases of recovered and persistent stuttering in an unselected, longitudinal sample of young twins. **Am J Speech Lang Pathol**, v.16, n.2, p.169-178, 2007.

ELSTON, R.C.; STEWART, J. A general model for the genetic analysis of pedigree data. **Hum Hered.**, v.21, n.6, p.523-42, 1971.

ENSEMBL home. European Bioinformatics Institute and Wellcome Trust Sanger Institute. Disponível em: <http://www.ensembl.org/info/about/intro.html>> acesso em dezembro de 2008.

FEITOSA, M.F.; KRIEGER, H. O futuro da epidemiologia genética de características complexas. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.7, n.001, p.73-83, 2002.

FELSENFELD, S. Finding susceptibility genes for developmental disorders of speech: the long and winding road. **Commun Disord**, v.35, n.4, p.239-245, 2002.

FELSENFELD, S.; KIRK, K.M.; ZHU, G.; STATHAM, D.J.; NEALE, M.C.; MARTIN, N.G. A study of the genetic and environmental etiology of stuttering in a select twin sample. **Behav Genet.**, v. 30, n. 5, p. 359-366, 2000.

FENSENFELD, S.; PLOMIN, R. Epidemiological and offspring analyses of developmental speech disorders using data from the Colorado adoption project. **J Speech Lang and Hearing Research**, v.40, p.778-791, 1997.

FERREIRA, R.; KAWAMATA, C.M.; KRIEGER, H. **Genes em indivíduos e famílias: Diagnóstico e Tratamento**, São Paulo, Malone, v.3, p.217-225, 2007.



FINN, P. Establishing the Validity of Recovery From Stuttering Without Formal Treatment. **Journal of Speech and Hearing Research**, v.39, p. 1171 – 1181, Dec. 1996.

FOUNDAS, M.D. et al. Aberrant auditory processing and atypical planum temporale in developmental stuttering. **American Academy of Neurology**, v.63, n.9, p.1640-1646, 2001.

FOUNDAS, M.D. et al. Anomalous anatomy of speech-language areas in adults with persistent developmental stuttering. **American Academy of Neurology**, v.61, p.1378-1385, 2003.

FOUNDAS, M.D. et al. Atypical cerebral laterality in adults with persistent developmental stuttering. **American Academy of Neurology**, v.63, p.1640-1646, 2004.

GIRAUD, A.L. et al. Severity of dysfluency correlates with basal ganglia activity in persistent developmental stuttering. **Brain and Language**, doi:10.1016/j.bandl, April, 2007.

GRAY, M. The X family: A clinical and laboratory study of a "stuttering" family. **Journal of Speech and Hearing Disorders**, v.5, p. 343-348, 1940.

GUDBJARTSSON, D.F., et al. Allegro, a new computer program for multipoint linkage analysis. **Nat Genet** 25 (1): 12-13, 2000.

HOWIE, P., Concordance for stuttering in monozygotic and dizygotic twin pairs. **J. Speech Lang. Hear. Disord.** 24:317-321, 1981.

IRWIN, A. **Gagueira**: uma ajuda prática em qualquer idade. São Paulo: Martins Fontes, 1993.

JAKUBOVICZ, R. **A gagueira**: teoria e tratamento de adultos e crianças. São Paulo, Revinter, 1997.

KIDD, K.K.; KIDD, J.R.; RECORDS, M.A The possible causes of the sex ratio in stuttering and its implications. **J. Fluency Disord.**, v.3, p.13-23, 1978.

KONDO, H.; TAHIRA, T.; HAYASHI. H.; OSHIMA, K.; HAYASHI K. Microsatellite genotyping of post-PCR fluorescently labeled marker. **Biotechniques**, n.29, p.868-872, 2000.

LAI, C.S.L.; FISHER, S.E.; HURST, J.A.; VARGA-KHADEM, F.; MONACO, A.P. A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder. **Nature**, v. 413, n. 6855, p. 519-523, 2001.

LAIRD, N.; HORVATH, S.; XU, X. Implementing a unified approach to family based tests of association. **Genet Epidemiol.**, v.19, s.1, p.36-42.

LALOUEL, J.M.; MORTON, N.E. Complex segregation analysis with pointers. **Hum Hered**, v.31, p.312-321, 1981.

LALOUEL, J.M.; RAO, D.C.; MORTON, N.E.; ELSTON, R.C. A unified model for complex segregation analysis. **Am J Hum Genet**, v.35, p.816-826, 1983.

LEEPER, L.H.; CULATTA, R. Speech fluency: effect of age, gender and context. **Folia Phoniatr. Logop.**, v.47, p. 1-14, 1995.

LOGAN, R. **The three dimensions of stuttering**. Neurology, behavior and emotion. London: Whurr Publishers Ltd., 1999.

MARSHFIELD GENETIC MAPS. Disponível em:  
<<http://www.bli.unizh.ch/BLI/Projects/genetics/maps/marsh.html>> Acesso em:  
24/05/2006.

MEYER, B. Psychomatic aspects of stuttering. **Journal of Nervous and Mental Disorders**, v.101, p. 127-157, 1945.

MORTON, N.E.; MACLEAN, C.J. Analysis of family resemblance: complex segregation of quantitative traits. **Am J Hum Genet.**, v.27, n.3, p.273, 1975.

MYERS, F.L. Cluttering: a matter of perspective. **J. Fluency Disord.**, v. 21, p.175-185, 1996

NELSON, S. The role of heredity in stuttering. **Journal of Pediatrics**, 14:642-654, 1939.

ORITA M.; IWAHANA H.; KANAZAWA H. et al.. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. **Proceeding of the National Academy of Sciences**. v.86, p.2766-2770, 1989.

PACKMAN, A.; ONSLOW, M. What is the take-home message from Curlee and Yairi? **American Journal Speech-Language Pathology**, v. 7, n.3, p. 5-9, 1998.

PAN, C.H. et al. Single nucleotide polymorphisms of DAT and DRD2 genes in Han Chinese population and their association with stuttering. **J Speech Hearing Research**, v.35, p.755-760, 1992.

PERKINS, W. **Speech Pathology**: an applied behavioral science. S. Luis (MO): Mosby, 1977.

PERKINS, W.; KENT, R.D. & CURLEE, R.F. A theory of neuropsycholinguistic function in stuttering. **Journal of Speech and Hearing Research**, v.34, p.734-752, 1991.

PERKINS, W.H. What is stuttering? **J. Speech Hear. Disord.**, v.55, p. 370-382, 1990.

PETERS, T.J.; GUITAR, B. **Stuttering an integrated approach to its nature and treatment**. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 385, 1991.

POULOS, M.G.; WEBSTER, W.G. Family history as a basis for subgrouping people who stutter. **J. Speech Hear. Res.**, v. 34, p. 5-10, 1991.

RABINOWITZ, D.; LAIRD, N. A unified approach to adjusting association tests for population admixture with arbitrary pedigree structure and arbitrary missing marker information. **Hum Hered.**, v.50, p.211-223, 2000.

RAO, D.C; PROVINCE, M.A. Genetic dissection of complex traits. **Academic Press**, San Diego, p.583, 2001.

RIAZ, N.; STEINBERG, S.; AHMAD, J. ET AL. Genomewide Significant Linkage to Stuttering on Chromosome 12. **American Journal of Medical Genetics**. v.76, p647-651, 2005.

RILEY, G.D. A stuttering instrument for children and adults. **J. Speech Hear. Dis.**, v. 37, p. 314-322, 1972.

RILEY, G.D. **Stuttering Severity Instrument for Children and Adults**. Austin: Pro Ed. 1994.

SCHWARTZ, H.D.; CONTURE, E.G. Subgrouping young stutterers: preliminary behavioral observations. **J. Speech Hear. Res.**, v.31, p. 62-71, 1988.

SHUGART, Y.Y.; MUNDORFF, J.; KILSHAW, J.; DOHENY, K.; DOAN, B.; WANYEE, J. GREE, E.D.; DRAYNA, E. Results of a genoma-wide linkage scan for stuttering. **Amer. J. Med. Genet.**, v. 124A, p. 133-135, 2004.

SOBEL, E.; LANGE, K. Descent graphs in pedigrees analysis: applications to haplotyping, location scores, and marker-sharing statistics. **Am J Hum Genet.**, v.58, n.6, p.1323-1337, 1996.

SOBEL, E.; SENGUL, H.; WEEKS, D.E. Multipoint estimation of identity-by-descent probabilities at arbitrary position among marker loci on general pedigrees. **Hum Hered.**, v.52, p.121-131, 2001.

SOBEL, E.; PAPP, J.C.; LANGE, K. Detection and integration of genotyping errors in statistical genetics. **Am J Hum Genet.**, v.70, n.2, p.496-508, 2002.

SPIELMAM, R.S.; GINNIS, R.E.; EWENS, W.J. Transmission test for linkage disequilibrium the insulin gene region and insulin dependent diabetes mellitus (IDDM). **Am J Hum Genet.**, v.52, n.3, p.506-516, 1993.

STARKWEATHER, C.W. **The assesement of fluency**: In: National Institute on Deafness and Other Communication Disorders. Assessment of speech and voice

production: research and clinical applications. Bethesda, (Proceedings, v.1, p. 215, 1991.

STARKWEATHER, C.W. A simple theory of stuttering. **Journal of Fluency Disorders**, v.20,n.2, p.91-116, 1995.

SUBRAMANIAN, A.; YAIRI, E.; AMIR, O. Second formant transitions in fluent speech of persistent and recovered preschool children who stutter. **Journal of Communication Disorders**, v.36, p.59-75, 2003.

SUBRAMANIAN, A.; YAIRI, E. Identification of traits associated with stuttering. **Journal of Communication Disorders**, v.39, p. 200 – 216, Dec, 2006.

SURESH, R.; AMBROSE, N.; ROE, C.; ET AL. New complexities in the genetics of stuttering: significant sex-specific linkage signals. **Am J Hum Genet.** n°78, v.4, p.554-63, 2006.

THRONEBURG, R.N.; YAIRI, E.; PADEN, E.P. Relation between phonologic difficulty and occurrence of disfluencies in the early stage of stuttering. **J. Speech Hear. Res.**, v. 37, p. 504-509, 1994.

VAN RIPER, C. **Stuttering: it's nature and causes.** In: VAN RIPER C. Speech correction: principles and methods. New Jersey: Prentice Hall, p. 456, 1972.

VAN RIPER, C.; EMERICK, L. **Stuttering.** In: Speech correction: an introduction to speech pathology and audiology. New Jersey: Prentice Hall/Englewood Cliffs, p. 294-359, 1990.

VISWANATH, N.; LEE, H.S.; CHAKRABORTY, R. Evidence for a Major Gene on Persistent Developmental Stuttering. **Human Biology**, v. 76, n. 3, p. 401-412, Jun, 2004.

WARBURTON, P. et al. Overview of CAPACITY data. **Int J Biomed Comput**, v.30 (3-4), p.173-80, 1992.

WARBURTON, P. et al. Support for Linkage of Autism and Specific Language Impairment to 7q3 From Two Chromosome Rearrangements Involving Band 7q31. **American Journal of Medical Genetics**, v. 96, p. 228-234, 2000.

WEISS, D. Cluttering: central language imbalance. **Pediat Clin N Amer**, v.5, p.66-76, 1968.

WEPMAN, J. Familial incidence of stammering. **Journal of Heredity**, v. 30, p.199-204, 1939.

WEST, R., NELSON, S., BERRY, M. The heredity of stuttering. **Quarterly Journal of Speech**, v. 25, p.23-30, 1939.

WINGATE, M.E. A standard definition of stuttering. **J Speech Hearing Disord.**, v.29, p.484-489, 1964.

WITKE-THOMPSON, J.K. et al. Genetic studied of stuttering in a founder population. **Journal of Fluency Disorders**, v. 32, p.33-50, 2007.

YAIRI, E. The onset oh stuttering in two and three-year-old children: a preliminary report. **J. Speech Hear Disord**, v. 48(2), p. 171-7, 1983.

YAIRI, E.; AMBROSE, N.G. A longitudinal study of stuttering in children: a preliminary report. **J. Speech Hear. Res.**, v. 35, p. 755-760, 1992a.

YAIRI, E.; AMBROSE, N.G. Onset of stuttering in preschool children: select factors. **J. Speech Hear. Res.**, v. 35, p. 782-788, 1992b.

YAIRI, E.; AMBROSE, N.G.; NIERMAN, R. The early months of stuttering: a developmental study. **J. Speech Hear. Res.**, v. 36, p. 521-528, 1993.

YAIRI, E., AMBROSE, N., COX, n. Genetics of stuttering : A critical review. **Journal of Speech Language and Hearing Research**, v. 39, p.771-784, 1996a.

YAIRI, E., et al. Predictive factors of persistence and recovery: Pathways of childhood stuttering. **J. Commun. Disord.**, v. 29, p. 53–77, 1996b.

YAIRI, E. **Disfluency characteristics of childhood of stuttering.** In: Curlee, R.F.; Siegel, f. (Eds.), *Nature and treatment of stuttering: new directions.* Boston: Allyn & Bacon, p.49-78. 1997.

YAIRI, E. Is the basis of stuttering genetic? **ASHA.**, v. 40, n. 1, p. 29-32, 1998.

YAIRI, E.; AMBROSE, N.G. Early childhood stuttering. **J Speech Lang and Hearing Research**, v.42, p.1097-1112, 1999.

YAIRI, E.; AMBROSE, N. A longitudinal study of stuttering in children. **Genet Epidemiol**, v.19, s.1, p.36-42, 2000.



YAIRI, E.; AMBROSE, N.G. **Early childhood stuttering**. Austin, TX: Pro-ed, Inc, 2005.

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.

**ANEXO A:**

***PARECER DOS COMITÊS DE ÉTICA EM PESQUISA***



Universidade Estadual Paulista  
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.  
CEP: 18.618-970  
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143  
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de  
abril de 1997

Botucatu, 06 de agosto de 2.007

OF. 311/2007-CEP

Ilustríssimo Senhor  
Prof. Dr. Danilo Moretti-Ferreira  
Departamento de Genética do  
Instituto de Biociências de Botucatu

Prezado Prof. Danilo,

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa "**Análise molecular em portadores de Gagueira Familiar: estudo de ligação das regiões cromossômicas 18p e 18q proximal**", a ser conduzido por Carlos Eduardo F. Domingues, orientado por Vossa Senhoria, recebeu do relator **parecer favorável**, aprovado em reunião de 06 de agosto de 2.007.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP "**Relatório Final de Atividades**".

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi  
Secretário do CEP.



Universidade Estadual Paulista  
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.  
CEP: 18.618-970  
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143  
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de  
abril de 1997

Botucatu, 06 de agosto de 2.007

OF. 310/2007-CEP

Ilustríssimo Senhor  
Prof. Dr. Danilo Moretti-Ferreira  
Departamento de Genética do  
Instituto de Biociências de Botucatu

Prezado Prof. Danilo,

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa "**Análise molecular em portadores de Gagueira Familiar**", a ser conduzido por Vossa Senhoria, recebeu do relator **parecer favorável**, aprovado em reunião de 06 de agosto de 2.007

Situação do Projeto: **APROVADO**. Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP "**Relatório Final de Atividades**".

Atenciosamente,

  
Alberto Santos Capelluppi  
Secretário do CEP.



CEP, 26/06/07.  
(Grupo II)

**PARECER CEP:** N° 421/2007 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)  
**CAAE:** 0311.0.146.000-07

### **I - IDENTIFICAÇÃO:**

**PROJETO:** “ANÁLISE MOLECULAR EM PORTADORES DE GAGUEIRA FAMILIAL:  
**ESTUDO DE LIGAÇÃO DAS REGIÕES CROMOSSÔMICAS 18P E 18Q PROXIMAL”.**

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Danilo Moretti-Ferreira.

**INSTITUIÇÃO:** CEPRE / FCM / UNICAMP

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 22/06/2007

**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 26/06/08 (O formulário encontra-se no *site* acima)

### **II - OBJETIVOS**

Estudar fatores genéticos em diferentes famílias a partir de um indivíduo considerado gago e em pelo menos mais uma repetição de gagueira em cada núcleo familiar em busca de evidências de segregação da característica. Aprofundar as análises do cromossomo 18 em famílias com portadores de gagueira.

### **III - SUMÁRIO**

Serão analisados 25 núcleos familiares de parentesco natural de indivíduos gagos, dos quais 15 destes foram selecionados em estudos anteriores. No CEPRE serão analisados 10 novos núcleos familiares. Todo estudo molecular será realizado no Laboratório de Biologia Molecular do serviço de Aconselhamento Genético da UNESP/Botucatu.

### **IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES**

Trata-se de um estudo multicêntrico Nacional. É um protocolo de pesquisa da área de Genética Humana com formação de Banco de Material biológico. O protocolo abrange a tese de mestrado do aluno Carlos Eduardo F. Domingues intitulada “Análise Molecular em Portadores de Gagueira Familiar: Estudo de ligação das regiões cromossômicas 18p e 18q proximal”. Os métodos a serem utilizados são adequados. O material biológico será armazenado em Banco de Material Biológico da UNESP/Botucatu. Há declaração de que qualquer estudo posterior deverá ser aprovado também pelo CEP/FCM/UNICAMP. O TCLE é adequado.

Recomendação: Caso alguma ligação seja encontrada, um profissional habilitado deverá informar a família.



(CONTINUAÇÃO)



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

#### V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

#### VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

#### VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 26 de junho de 2007.

  
**Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo**  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13084-971 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936  
FAX (019) 3521-7187  
cep@fcm.unicamp.br



**Unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE FILOSOFIA E CIÊNCIAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Fone: (0xx 14) 3402-1346

Fax: (0xx14) 3422-1302

[www.marilia.unesp.br/cep](http://www.marilia.unesp.br/cep)

e-mail: [cep@marilia.unesp.br](mailto:cep@marilia.unesp.br)

### PARECER DO PROJETO N° 2016/2007

IDENTIFICAÇÃO
1. Título do Projeto: Análise molecular em portadores de gagueira familiar
2. Pesquisador Responsável: Carlos Henrique F. Domingues, Cristiane M. Canhetti de Oliveira e Danilo Moretti-Ferreira
3. Instituição do Pesquisador: : Pos – Graduação em Ciências Biológicas – Área Genética – Instituto de Biociências/ Departamento de Genética/ Serviço de Aconselhamento Genético (IB/SAG/FM/UNESP – Botucatu e Centro de Estudos da Educação e Saúde – CEES/FFC/UNESP-Marília.
4. Apresentação ao CEP: 17/07/2007
5. Apresentar relatório em: Semestralmente durante a realização da pesquisa.

OBJETIVOS
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Estudar fatores genéticos em diferentes famílias a partir de um indivíduo considerado gago e em pelo menos mais uma repetição da gagueira em cada núcleo familiar em busca de evidências de segregação da característica.</li> <li>- Aprofundar as análises do braço curto do cromossomo 18 iniciado por Costa (2005) por meio de um mapeamento gênico mais fino dessa região e consolidar definitivamente o desequilíbrio de ligação sugerido em seus estudos.</li> <li>- Analisar região proximal do braço longo do cromossomo 18 e as regiões 7q31 e 7q34 como possíveis regiões candidatas à gagueira familiar.</li> </ul>

SUMÁRIO DO PROJETO
<p>A gagueira é um distúrbio da comunicação, mais especificamente da fluência, onde há interrupções e alterações na velocidade do fluxo da fala. Esta é uma condição complexa que vem sendo estudada desde a década de 50, e acomete de 3 a 4% dos indivíduos do sexo masculino e de 1 a 2% do sexo feminino, em algum momento de suas vidas. Sua frequência pode variar de acordo com a idade de 1% de crianças em idade escolar, em 2,4% de crianças em idade pré-escolar e chegar a 15% entre os 4 e 6 anos. Em adultos estima-se que de 1 a 2% sofram com este distúrbio. Referências à agregação familiar de gagueira e à gagueira familiar têm aparecido na literatura há mais de 50 anos.</p> <p>Recentemente foi realizada uma triagem genômica em famílias de gogos provenientes da América do Norte e da Europa e foi demonstrada a existência de um locus de predisposição a gagueira familiar no cromossomo 18 envolvendo a região 18p e um segundo locus na região 18q proximal. Estes estudos sugerem a existência de heterogeneidade genética em diferentes populações além de fatores adicionais.</p> <p>O gene SPCH1, localizado na região 7q31, quando alterado, parece ser o responsável pelo desenvolvimento anormal de estruturas neurais, ligadas diretamente ao desenvolvimento da</p>



## (CONTINUAÇÃO)

fala e linguagem. Esta região é também relacionada com o desenvolvimento de autismo. Desta forma, a região 7q31, do cromossomo 7 é candidata a realização de estudos com indivíduos gagos.

Assim, neste trabalho também é proposto aprofundar as análises do braço curto do cromossomo 18 iniciado por Costa (2005) e, além disso, analisar a região proximal do braço longo do cromossomo 18 como possíveis regiões candidatas à gagueira familiar.

Para isso estudaremos 25 núcleos com gagueira familiar de parentesco natural de indivíduos gagos, dos quais 15 destes foram selecionados em estudos preliminares de Oliveira (2004) e Costa (2005) e que dispõem de 92 indivíduos (48 afetados e 44 normais) e 10 núcleos familiares que serão incluídos nesta amostra seguindo os mesmos critérios de seleção provenientes das clínicas escolas – Centro de Estudos da Educação e da Saúde (CEES-UNESP – Marília - SP) e no curso de Fonoaudiologia (CEPRE/IEL/FCM-UNICAMP – Campinas - SP) selecionados independente do número de membros da família, sem distinção de sexo, raça, escolaridade e nível sócio-econômico-cultural.

**COMENTÁRIOS DO RELATOR**


O projeto tem caráter multicêntrico e está apresentado de forma clara, objetiva e concisa e tem condições de ser executado no tempo previsto pelos pesquisadores. Apresenta documentos necessários para a apreciação, protocolo de pesquisa devidamente instruído e resguarda a integridade e os direitos dos voluntários, participantes desta pesquisa.

**PARECER FINAL**

O CEP da FFC da UNESP após acatar o parecer do membro relator previamente aprovado para o presente estudo e atendendo a todos os dispositivos das resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido como também todos os anexos incluídos na pesquisa resolve aprovar o projeto de pesquisa supracitado.

**INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES****DATA DA REUNIÃO**

Aprovado na reunião do CEP da FFC em 25/07/2007.

  
Dr.ª Simone Aparecida Capellini  
Presidente do CEP

  
Prof.ª Dr.ª Maria Candida Soares Del Masso  
Vice-Diretora no exercício da Direção da FFC





COMISSÃO DE ÉTICA PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA  
 DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

## APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 25.06.08, **APROVOU ad endo** referente ao Protocolo de Pesquisa nº **266/05**, intitulado: "**Perfil familiar da fluência da fala - Estudo lingüístico, acústico e eletromiográfico**" apresentado pelo Departamento de Fisioterapia, Fonoaudiologia e Terapia Ocupacional.

Pesquisador(a) Responsável: **Profa. Dra. Cláudia Regina Furquim de Andrade**

CAPPesq, 07 de julho de 2008.

**PROF. DR. EDUARDO MASSAD**  
 Presidente da Comissão de Ética para Análise  
 de Projetos de Pesquisa

**ANEXO B:**

***TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO***



Depto. de Genética - Inst. de Biociências - UNESP  
 Tel. (14) 3811-6016 Fone/Fax (14) 3815-3131  
 Cx.P. 529 18618-000 Botucatu/SP  
 E-Mail: sag@fmb.unesp.br

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós estamos convidando vocês a participarem do projeto de pesquisa intitulado “Análise Molecular em Portadores de Gagueira Familiar” do Serviço de Aconselhamento Genético (SAG) – UNESP - Botucatu cujo responsável é o Prof. Adj. Dr. Danilo Moretti-Ferreira. Para a obtenção deste termo gostaríamos que vocês soubessem que:

- Participar deste projeto é uma opção de vocês, podendo decidir participar ou não;
- Caso vocês decidirem não participar ou desistirem de participar a qualquer momento vocês não perderão nenhum benefício ou tratamento que estiverem fazendo nesta instituição – Centro de Estudos da Educação e da Saúde (CEES – UNESP – Marília).
- A qualquer momento você terá a liberdade de buscar junto aos responsáveis 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.
- 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 pela equipe de fonoaudiólogas.

A partir de um indivíduo considerado gago serão realizados estudos no sentido de analisar os fatores genéticos envolvidos com esse distúrbio.

-Esperam-se obter os seguintes benefícios decorrentes da presente pesquisa:

Ampliar o conhecimento sobre a origem da gagueira e se é ou não transmitida aos seus descendentes.

- se vocês decidirem participar gostaríamos de informar-lhes que:

- a) Os instrumentos de registro utilizados neste estudo incluem: gravador, filmadora para a coleta, registro e análise das amostras de fala além de coletarmos uma amostra de 3ml de sangue (1 colher de sopa) do portador de gagueira, seus pais e familiares, nos quais serão realizados um estudo na busca por fatores genéticos causadores da gagueira.
- b) A coleta de sangue pode causar algum desconforto físico e existe um risco de ocorrer uma mancha roxa (hematoma) na região da coleta.
- c) Os resultados deste estudo talvez não sejam de benefício imediato para você ou sua família.
- d) Vocês estarão colaborando para aumentar o nosso conhecimento sobre a origem da Gagueira.
- e) O material biológico (DNA) 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.
- e) Os resultados poderão demorar meses para ficarem prontos.

- f) Assim que existam resultados, estes serão apresentados a vocês pelos responsáveis.
- g) Os resultados deverão ser publicados em revistas científicas que circulam entre os profissionais da saúde que tenham interesse nesta área.
- h) Sempre que ocorrerem publicações científicas a sua identidade, de seu filho ou familiar será mantida em absoluto sigilo.
  - i) Somente pesquisadores envolvidos com o projeto terão acesso aos dados completos, não sendo permitido o acesso aos dados por terceiros.
- j) Todos os resultados de exames moleculares estarão disponíveis no prontuário do portador de gagueira nas clínicas de fonaudiologias.
- 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. n° \_\_\_\_\_ (responsável pelo paciente) concordo em participar do projeto de pesquisa “Análise Molecular em Portadores de Gagueira Familiar”. 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.

Nome \_\_\_\_\_ do  
Paciente: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

—

\_\_\_\_\_

Assinatura

Nome do responsável:

**Responsável pela pesquisa: Prof. Adj. Dr. Danilo Moretti-Ferreira**

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

[sag@fmb.unesp.br](mailto:sag@fmb.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.

\_\_\_\_\_  
Assinatura  
Nome do responsável: