

Otología y Neurología

# Estudio prospectivo del fenotipo audiológico y de la progresión de la hipoacusia neurosensorial no sindrómica asociada al genotipo homocigota c.35delG en GJB2

*Prospective study of the audiological phenotype and progression of non-syndromic sensorineural hearing loss associated with the homozygous c.35delG genotype in GJB2*

*Estudo prospectivo do fenótipo audiológico e progressão da perda auditiva neurosensorial não sindrômica associada ao genótipo homozigoto c.35delG em GJB2*

Biol. Raúl Reynoso<sup>(1)</sup>, Lic. Fga. María Inés Salvadores<sup>(2)</sup>, Lic. Fga. Fanny Quinteros<sup>(2)</sup>, Dra. Adela Sembaj<sup>(1)</sup>, Dr. Ignacio del Castillo<sup>(3)</sup>, Dr. Carlos A. Curet<sup>(2)</sup>

## Resumen

**Introducción:** La hipoacusia neurosensorial no sindrómica debida a la mutación más prevalente c.35delG en el gen GJB2, anula la función de la conexina 26 en el oído interno, proteína esencial para la audición. En la mayoría de los pacientes, la hipoacusia es prelocutiva severa a profunda, estable y simétrica; sin embargo, hay informes sobre algunos casos con hipoacusia progresiva y moderada. Se propuso realizar el seguimiento audiológico continuo a 2 hermanas hipoacúsicas homocigotas c.35delG y establecer la correlación genotipo-fenotipo.

**Material y Método:** Durante 40 años, se llevaron a cabo exámenes audiológicos en 2 hermanas hipoacúsicas pertenecientes a una familia con 4 individuos sordos. Tras obtener el consentimiento informado, se identificó mediante biología molecular la mutación c.35delG como la causa genética de hipoacusia.

**Resultados:** El análisis y seguimiento de los datos audiológicos en las 2 hermanas homocigotas c.35delG reveló que la hipoacusia intrafamiliar fue de penetrancia completa y expresividad variable. Una de las hermanas presentaba hipoacusia leve y progresiva, afectando las frecuencias neutras en forma incipiente y agudas en forma leve, con suave pendiente en la audiometría tonal y escaso desplazamiento en la logaudiometría. A diferencia de esta, su hermana con la misma mutación presentaba hipoacusia severa.

**Conclusiones:** Los datos confirman la variabilidad en la progresión intrafamiliar de la hipoacusia inducida por la mutación recesiva c.35delG en GJB2. La observación justifica el seguimiento audiológico continuo para estos pacientes y se advierte que este tipo de pérdidas auditivas pasarían el Cribado Auditivo Neonatal Universal.

**Palabras clave:** hipoacusia, postlocutiva, progresiva, GJB2, c.35delG.

<sup>(1)</sup> Centro Piloto de Detección de Errores Moleculares (Ce.Pi.D.E.M.), Hospital Universitario de Maternidad y Neonatología. Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

<sup>(2)</sup> Centro Otoaudiológico de Alta Tecnología (COAT), Córdoba, Argentina.

<sup>(3)</sup> Servicio de Genética, Hospital Universitario «Ramón y Cajal», Madrid, España.

Mail de contacto: raul.reynoso@unc.edu.ar

Fecha de envío: 13 de noviembre de 2023 - Fecha de aceptación: 12 de abril de 2024.

## Abstract

**Introduction:** Non-Syndromic Sensorineural Hearing Loss due to the most prevalent mutation c.35delG in the GJB2 gene abolishes the function of Connexin 26 in the inner ear, an essential protein for hearing. In most patients, the hearing loss is severe to profound, stable, and symmetric. However, there are reports of some cases with progressive and moderate hearing loss. We intended to continuously monitor the auditory status of two homozygous sisters with c.35delG and establish the genotype-phenotype correlation.

**Material and Method:** Audiological examinations were conducted on two deaf sisters from a family with four deaf individuals for 40 years. After obtaining informed consent, the c.35delG mutation was identified as the genetic cause of hearing loss through molecular biology.

**Results:** Analysis and monitoring of audiological data in the two homozygous sisters with c.35delG revealed that intrafamilial hearing loss had complete penetrance and variable expressivity. One sister had mild and progressive hearing loss affecting neutral frequencies incipiently and high frequencies mildly, with a gentle slope in tonal audiometry and minimal displacement in logaudiometry. In contrast, her sister with the same mutation had severe hearing loss.

**Conclusions:** Our data confirm the variability in intrafamilial progression of hearing loss induced by the recessive c.35delG mutation in GJB2. This observation justifies continuous audiological monitoring for these patients, and it is noted that this type of hearing loss would pass the Universal Newborn Hearing Screening.

**Keywords:** hearing loss, postlingual, progressive, GJB2, c.35delG.

## Resumo

**Introdução:** A Surdez Neurosensorial Não Síndromática devido à mutação mais prevalente c.35delG no gene GJB2, anula a função da conexina 26 no ouvido interno, uma proteína essencial para a audição. Na maioria 2 pacientes, a surdez é pré-locutiva, severa a profunda, estável e simétrica. No entanto, há relatos de alguns casos com surdez progressiva e moderada. Nos propusemos a realizar o acompanhamento audiológico contínuo de duas irmãs homozigotas surdas c.35delG e estabelecer a correlação genótipo-fenótipo.

**Material e Método:** Durante 40 anos, foram realizados exames audiológicos em duas irmãs surdas de

uma família com quatro indivíduos surdos. Após obtenção de consentimento informado, a mutação c.35delG foi identificada por biologia molecular como a causa genética da surdez.

**Resultados:** A análise e acompanhamento dos dados audiológicos nas duas irmãs homozigotas c.35delG revelaram que a surdez intrafamiliar tinha penetrância completa e expressividade variável. Uma das irmãs apresentava surdez leve e progressiva afetando as frequências neutras de forma incipiente e agudas de forma leve, com inclinação suave na audiometria tonal e deslocamento mínimo na logaudiometria. Ao contrário desta, sua irmã com a mesma mutação apresentava surdez severa.

**Conclusões:** Nossos dados confirmam a variabilidade na progressão intrafamiliar da surdez induzida pela mutação recessiva c.35delG no GJB2. Esta observação justifica o acompanhamento audiológico contínuo para esses pacientes e alerta que este tipo de perda auditiva passaria no Teste Auditivo Neonatal Universal.

**Palavras-chave:** perda auditiva pós-lingual, progressiva, GJB2, c.35delG.

## Introducción

La hipoacusia neurosensorial (HNS) es la discapacidad sensorial más común y afecta gravemente la vida de las personas<sup>(1)</sup>. Según el informe de la Organización Mundial de la Salud, más de 1500 millones de personas en todo el mundo tienen distintos grados de HNS y se espera que aumente a más de 2500 millones en 2050 (<https://www.who.int/zh/news-room/fact-sheets/detail/sorder-and-audiing-loss>), generando pesadas cargas sociales y económicas para los pacientes y sus familias, como así también para la sociedad.

Existen numerosos factores que causan sordera, como el envejecimiento, fármacos ototóxicos, factores ambientales, factores genéticos, inflamación y otras causas desconocidas<sup>(2)</sup>. Sin embargo, vale la pena señalar que más del 60% de los casos graves de HNS en recién nacidos o en la primera infancia están relacionados con factores genéticos<sup>(1)</sup>. Dependiendo de su asociación con otras anomalías orgánicas, los casos de sordera hereditaria generalmente se agrupan en 2 categorías, es decir, HNS síndromica e HNS no síndromica (HNSNS), que representan el 30% y el 70% del total de casos de sordera hereditaria, respectivamente<sup>(3)</sup>. Los patrones de herencia de HNSNS incluyen herencia autosómica recesiva (DFNB, 80%), autosómica dominante (DFNA, 15%-20%), herencia ligada al cromosoma sexual X (DFN, 1%) y heren-

cia del ADN mitocondrial (1%)<sup>(4)</sup>. Hasta la fecha, se ha informado que un total de 161 loci genéticos (68 dominantes y 93 recesivos) y 134 genes (45 dominantes, 74 recesivos y 5 ligados al cromosoma X) están asociados con HNSNS según la base de datos sobre HNS hereditaria (<https://hereditaryhearingloss.org/>; consultada en agosto de 2022).

A pesar de este grado de heterogeneidad genética, las variantes en un gen, GJB2 (MIM 121011), representan hasta el 50% de los casos de HNSNS en el locus DFNB1 en muchas poblaciones del mundo, lo que convierte a GJB2 en el gen más frecuentemente asociado con esta afección<sup>(5)</sup>. El análisis de mutaciones en este gen es una prueba genética clínicamente útil y, por lo tanto, ampliamente disponible.

GJB2 codifica la proteína conexina 26 (CX26), un miembro de la familia de conexinas de proteínas comunicantes. Las conexinas se oligomerizan para formar hemicanales hexaméricos llamados «conexones», que están presentes en la membrana plasmática, donde pueden unirse con conexones de células adyacentes para formar uniones en hendidura funcionales<sup>(6)</sup>. Estos canales de unión son permeables a iones y pequeños metabolitos con masas moleculares de hasta 1200 Da<sup>(7)</sup>. Pueden estar compuestos por una misma clase de conexina (homomérica) o diferentes (heteromérica), modificando así la permeabilidad selectiva de las uniones comunicantes<sup>(8)</sup>. Se ha propuesto que la expresión de GJB2 en la cóclea, es que las uniones comunicantes que contienen CX26 funcionan para mantener la homeostasis del catión K<sup>+</sup> en la endolinfa, al transportar el K<sup>+</sup> lejos de las células ciliadas durante la transducción auditiva<sup>(9)</sup>. Hasta la fecha, se han descrito más de 300 variantes alélicas diferentes (The Human Gene Mutation Database) en el gen GJB2<sup>(10)</sup>. La mutación recesiva c.35delG representa la mayoría de las mutaciones en caucásicos con HNSNS<sup>(11)</sup>. Esta mutación truncante da como resultado un cambio de marco de lectura y una terminación prematura de la proteína CX26, y su pérdida de función en la cóclea. Los autores del presente trabajo y otros autores han demostrado que la c.35delG es muy frecuente en la población de pacientes con HNSNS en Argentina<sup>(12, 13)</sup>.

Investigaciones sobre la correlación genotipo-fenotipo en diferentes cohortes de pacientes no relacionados entre sí y con HNSNS, y con mutaciones bialélicas en GJB2, demostraron que las personas homocigotas para la mutación c.35delG tienen HNSNS de inicio congénito o prelocutivo y es significativamente más grave que los heterocigotos compuestos c.35delG/no-c.35delG<sup>(14)</sup>.

## Objetivos

En este estudio se propuso documentar el fenotipo audiológico mediante el seguimiento continuo de la HNSNS a 2 hermanas con mutaciones bialélicas en homocigosis (c.35delG/c.35delG) en el gen GJB2 de la CX26 y correlacionarlo con el genotipo. Los presentes hallazgos contribuyen a mejorar el asesoramiento genético a los pacientes y sus familias, y alerta que estos casos pueden pasar el Cribado Audito Universal Neonatal.

## Material y Método

### Sujetos de estudio

La familia con HNSNS, estaba compuesta por un total de 10 personas en 2 generaciones, incluidos 4 miembros afectados. Con el consentimiento informado obtenido de cada individuo, un total de 7 familiares (4 afectados y 3 no afectados) participaron en un estudio de evaluación clínica (Figura 1). Los datos clínicos y las muestras de sangre de cada paciente, se obtuvieron de una colección prospectiva y de seguimiento continuo entre 2004 y 2023. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Nacional de Clínicas de la Facultad de Ciencias Médicas, UNC (Registro N.º 140/12).

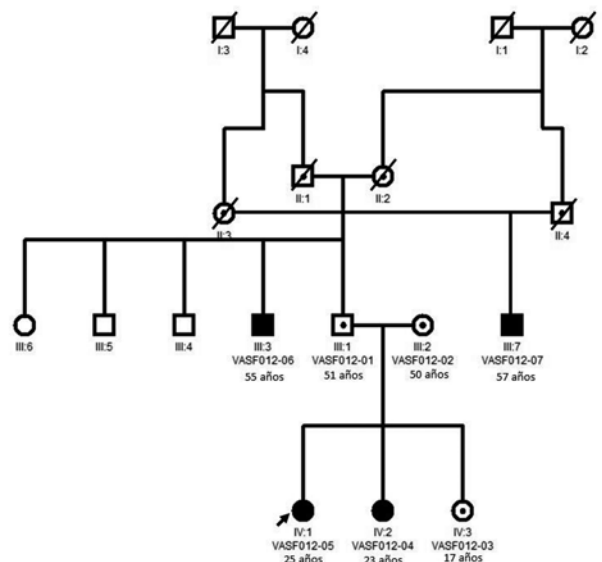


Figura 1. Pedigrí de la familia argentina VASF012 con cuatro generaciones y sus fenotipos audiológicos. Árbol genealógico de la familia afectada con HNSNS de herencia autosómica recesiva. Los hombres se indican con cuadrados, las mujeres con círculos y los fallecidos con una línea diagonal que atraviesa el símbolo. Probando: flecha; símbolo blanco: audición normal; símbolo blanco con un punto negro: portador con audición normal; símbolo negro: con HNSNS.

## Datos Clínicos

Se obtuvo la historia clínica de cada participante de la familia mediante un cuestionario para recopilar lo siguiente datos: edad de inicio, evolución y simetría del deterioro de la audición, presencia de tinnitus, uso de antibióticos aminoglucósidos y otras manifestaciones clínicas relevantes. Todos los participantes recibieron las evaluaciones clínicas y audiológicas realizado en el examen físico, incluyendo audiometría de tonos puros (PTA, del inglés *Pure-tone average*), logaudiometría, timpanometría, respuesta auditiva del tronco encefálico (ABR), productos de distorsión por emisión otoacústica (DPOAE), electrococleograma. Se realizó TC de peñasco para verificar malformación de oído interno. Fueron excluidos como causa de la HNSNS los factores ambientales. La gravedad de la HNSNS fue clasificada por el valor medio de PTA en 500, 1000, 2000 y 4000 Hz, como leve (26-40 dB), moderado (41-55 dB), moderadamente grave (56-70 dB), grave (71-90 dB) y profundo (>90 dB), respectivamente.

## Extracción de ADN

El ADN genómico, se extrajo de 5 ml de sangre periférica de cada uno de los 7 individuos de la familia VASF012, mediante la técnica del buffer CTAB.

## Prueba Genética para la Mutación c.35delG en el Gen GJB2

Para el cribado de la mutación c.35delG en nuestros pacientes, utilizamos un método rápido y sencillo basado en el principio de la PCR-RFLP (del inglés *Polymorphism Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*) mutagénesis sitio dirigida. Después de la amplificación mediante PCR, se lleva a cabo una digestión enzimática utilizando una enzima de restricción para identificar y confirmar la presencia de la mutación<sup>(15)</sup> (Figura 2).

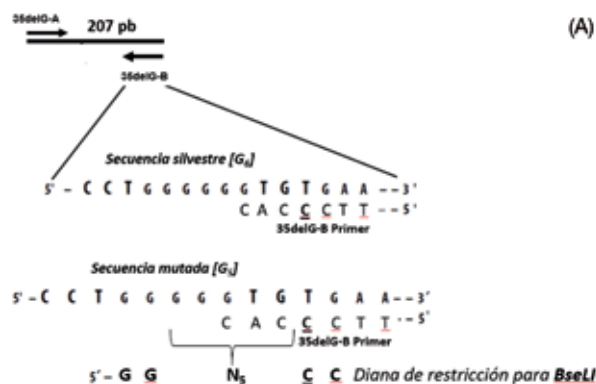


Figura 2. (a): fundamento molecular de la PCR-mutagénesis sitio dirigida, seguida de RFLP para la detección de la mutación c.35delG en el gen GJB2. La letra «C» indica el nucleótido en la posición 236, el cual reemplaza un nucleótido de Adenina en la secuencia silvestre<sup>(15)</sup>.

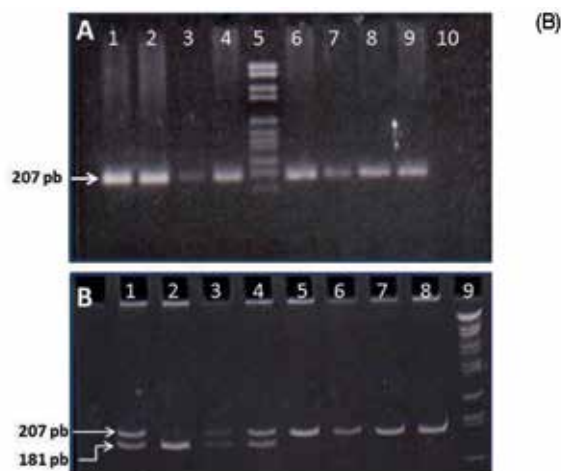


Figura 2. (b): A: fotografía del gel de agarosa con el producto de PCR (207pb). B: análisis de los genotipos luego de la digestión con la enzima BseLI. Calle 1 y 4: heterocigotas; calle 2: homocigota; calles 5 a 8: no portadores; calle 9: marcador de tamaño molecular.

## Resultados

### Características clínicas de los participantes

El pedigrí de la familia argentina de cuatro generaciones oriunda de la provincia de San Juan, Argentina, fue construido de acuerdo con las descripciones verbales de los participantes (Figura 3). En la familia, había 4 individuos con discapacidad auditiva, afectados por HNSNS recesiva, bilateral, simétrica de estable a progresiva. Los resultados de la PTA mostraron que tenía un deterioro predominante para todas las frecuencias y especialmente las agudas (Figura 2). Además, según el mapa de distribución por edades, la edad de inicio de la discapacidad auditiva varió entre 1 y 5 años en esta familia, y la mayoría de estos pacientes desarrollaron HNSNS, principalmente alrededor de los 4 años. A la paciente (VASF012-05) tomada como caso índice, se le realizó el seguimiento continuo de su salud auditiva durante un periodo de cuatro décadas, a partir de la edad de 5 años cuando fue diagnosticada de HNSNS de etiología desconocida (Figura 3).

### Correlación genotipo-fenotipo

La prueba molecular para detectar la mutación truncante c.35delG en el gen GJB2, mediante el método de PCR-RFLP, determinó la etiología genética de la HNSNS en los 4 individuos hipoacúsicos de la familia. Comprobamos que en la familia segregaba la mutación de herencia recesiva c.35delG en el gen GJB2. El análisis de los datos audiológicos y seguimiento de las HNSNS en 2 hermanas (VASF012-05 y VASF012-04) se realizó a partir de los 5 años de

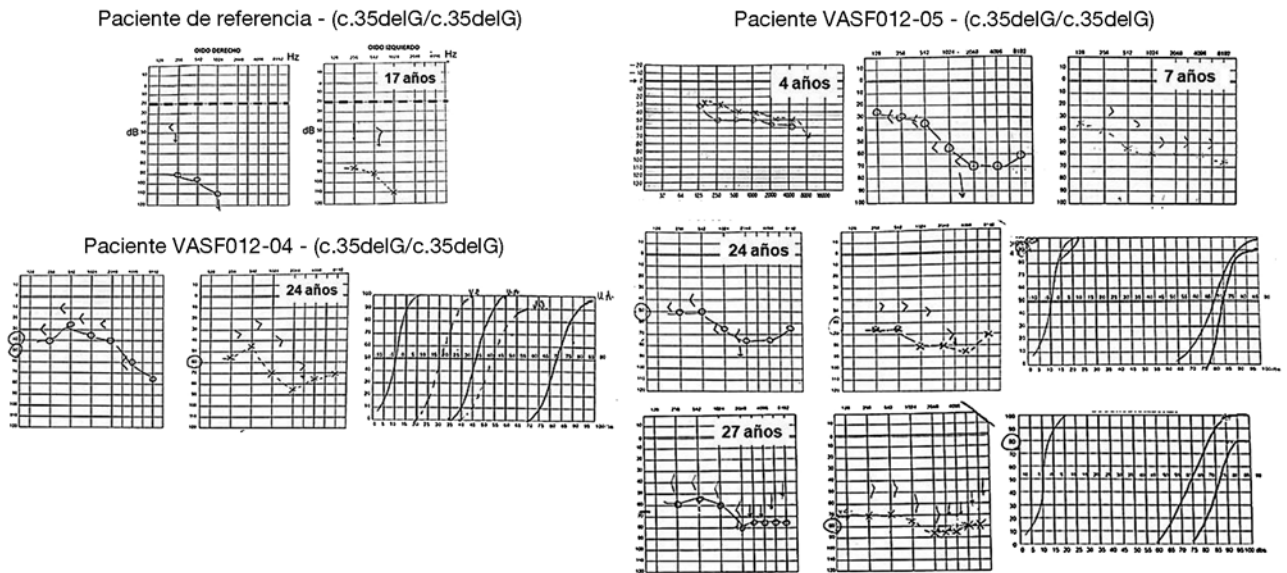


Figura 3. Audiogramas de tonos puros, de las 2 hermanas estudiadas de la familia VASF012, con HNSNS y sus genotipos (c35delG/c.35delG), significativamente diferentes al del paciente de referencia homocigoto c.35delG. La audición normal implica umbrales de 0-20 dB, como indica la línea de puntos.

edad, pero el estudio genético recién se les realizó a los 25 y 23 años de edad, respectivamente. Con los datos del estudio genético, se pudo establecer la etiología genética de la HNSNS en la familia. Además, se pudo determinar el genotipo para otros 5 integrantes de la familia que participaron del estudio genético. En los 4 individuos homocigotos c.35delG afectados, la HNSNS fue de penetrancia completa, pero de expresividad variable. En 2 hermanas de la familia, ante un mismo genotipo, la expresividad de la HNSNS fue diferente al resto de sus otros 2 familiares, 2 tíos que eran sordos profundos, prelocutivos con retraso del lenguaje. Las hermanas presentaban hipoacusia leve, generalmente estable, de aparición tardía y progresiva, afectando las frecuencias a partir de 1000 Hz en forma incipiente y las agudas en forma leve, con una suave pendiente en la audiometría tonal, escaso desplazamiento en la curva de la logaudiometría (Figura 3). En la paciente VASF012-05, el diagnóstico de su HNSNS fue entre los 4 y 5 años de edad, refiriendo que la hipoacusia para algunos sonidos agudos comenzó a los 4 años. La progresión de la hipoacusia en esta paciente fue muy lenta con respecto a su hermana. Actualmente con 46 años de edad usa audífonos, posee hipoacusia asimétrica y calificó para implante coclear unilateral. En su hermana, la hipoacusia evolucionó de manera diferente, siendo de grado grave del oído derecho y de grave a severa en oído izquierdo, corrigiendo su déficit con audífonos.

### Discusión

El seguimiento continuo a los pacientes con diagnóstico de HNSNS hereditaria, con el fin de poder evaluar el mejor tratamiento para aminorar los efectos de su discapacidad auditiva, está adquiriendo una importancia cada vez mayor en el ejercicio de la medicina traslacional. En muchas ocasiones, este seguimiento continuo prima sobre los resultados puramente genéticos. La mutación recesiva c.35delG en el gen GJB2 es una de las mutaciones más prevalentes asociadas con la HNSNS del tipo DFNB1. Esta mutación truncante, anula la síntesis y la función de la proteína CX26 en el oído interno, que es crucial para la audición normal. En la clínica de nuestros pacientes, la mutación homocigota c.35delG causa diversos fenotipos auditivos intrafamiliares que van desde una sordera congénita profunda al nacer, hasta una pérdida auditiva leve y generalmente estable al final de la infancia.

El mecanismo molecular del fenotipo variable (incluida la gravedad y la presencia o ausencia de progresión) en pacientes con mutaciones homocigotas c.35delG en el gen GJB2 no está claro. La expresión de la Cx26 se localiza, principalmente, en 2 grupos de células de la cóclea: células epiteliales no sensoriales y células del tejido conectivo. Se cree que los canales de conexones en la cóclea están compuestos por Cx26 y otras proteínas conexinas, que ayudan a mantener el potencial endococlear en la endolinfa, que es esencial para la excitación y fun-

ción de las células ciliadas sensoriales, al facilitar el paso de iones de potasio entre las células<sup>(14)</sup>. Sin embargo, no existe una relación aparente y demostrable entre cambios específicos en las funciones de las conexinas (canales) y los fenotipos de pérdida auditiva inducida por las mutaciones. Además, nuevos experimentos demuestran que la supuesta interrupción del reciclaje de K<sup>+</sup> no es un mecanismo principal de sordera para la pérdida auditiva inducida por deficiencia de conexina. Las mutaciones en otras conexinas, como en Cx30 (GJB6), Cx29 (GJC3), Cx31 (GJB3) y Cx43 (GJA1) también pueden causar pérdida auditiva con cambios patológicos en la cóclea. Estos nuevos estudios, proporcionan información invaluable sobre los mecanismos de sordera que subyacen a la pérdida auditiva inducida por la mutación de conexina y también brindan información importante para desarrollar nuevas estrategias protectoras y terapéuticas<sup>(16)</sup>. No obstante, los mecanismos celulares detallados que subyacen a estos cambios patológicos en la cóclea, aún no están claros. Además, se sabe poco sobre cambios patológicos inducidos por mutaciones específicas *in vivo* y hay poca información disponible para humanos. Se necesitan urgentemente más estudios de este tipo. Sin embargo, ahora sale a la luz y se comprende que diferentes mutaciones tienen efectos variables sobre la función de las uniones comunicantes, algunas de esas mutaciones conducen a la ausencia de proteínas y otras conducen a proteínas expresadas, pero con función alterada. Es probable que estas alteraciones específicas de las mutaciones, así como las diferencias en otros modificadores genéticos y ambientales, expliquen la variabilidad de expresión, tanto en la gravedad como en la progresión de la pérdida auditiva en pacientes con el mismo genotipo.

Este es el primer trabajo que informa sobre la mutación c.35delG de la conexina 26 y su correlación genotipo-fenotipo «intrafamiliar» en un seguimiento de 40 años, que demuestra la posibilidad de presentar diferentes fenotipos de HNSNS, siendo, por lo tanto, un hallazgo original e invaluable, que pone en alerta sobre estas variantes de HNSNS, ya que no serían detectadas al momento de hacerse el cribado auditivo neonatal universal, manifestándose recién algunos años más tarde.

## Conclusiones

Este estudio proporciona información invaluable sobre el seguimiento continuo de la HNSNS inducida por la mutación c.35delG en homocigosis, en una familia argentina de cuatro generaciones, y

también brinda información molecular y clínica adicional para establecer una fuerte correlación genotipo-fenotipo importante para este tipo de pérdida auditiva. Los datos presentados confirman que no se podría predecir el fenotipo según el tipo y la ubicación de la variante patogénica en GJB2. Por tanto, el establecimiento de correlaciones genotipo-fenotipo es extremadamente difícil, debido a la complejidad molecular de GJB2, sus diversas características clínicas y el pequeño número de pacientes estudiados. La variabilidad fenotípica observada en pacientes hipoacúsicos homocigotos para la mutación c.35delG en la familia, es el resultado de una interacción compleja entre factores genéticos, ambientales y epigenéticos. Esto hace que cada paciente sea único en términos de la gravedad de la pérdida auditiva y la edad de inicio, y subraya la importancia de un enfoque terapéutico individualizado en la atención médica y genética de su salud auditiva. Los individuos homocigotos c.35delG con fenotipos de HNSNS de inicio tardío y, por lo tanto, de inicio postlocutivo, pasarían la prueba del cribado auditivo neonatal universal. Esto retrasaría la detección de la HNSNS, su diagnóstico y el tratamiento de la pérdida auditiva permanente y progresiva.

**Los autores no manifiestan conflictos de interés.**

## Bibliografía

1. Morton CC, Nance WE. Newborn hearing screening—a silent revolution. *N Engl J Med.* 2006; 354(20): 2151-64.
2. Lieu JEC, Kenna M, Anne S, Davidson L. Hearing Loss in Children: A Review. *JAMA.* 2020; 324(21): 2195-2205.
3. Cui TY, Gao X, Huang SS, Sun YY, Zhang SQ, Jiang XX, et al. Four Novel Variants in POU4F3 Cause Autosomal Dominant Nonsyndromic Hearing Loss. *Neural Plast.* 2020; 6137083.
4. Van Camp G, Willems PJ, Smith RJ. Nonsyndromic hearing impairment: unparallelled heterogeneity. *Am J Hum Genet.* 1997; 60(4): 758-764.
5. Kenneson A, Van Naarden Braun K, Boyle C. GJB2 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: a HuGE review. *Genet Med.* 2002; 4: 258-274.
6. Bruzzone R, White TW, Paul DL. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem.* 1996; 238: 1-27.
7. Harris AL, Bevans CG. Exploring hemichannel permeability *in vitro*. *Methods Mol Biol.* 2001; 154: 357-377.
8. Stauffer KA. The gap junction proteins beta 1-connexin (connexin-32) and beta 2-connexin (connexin-26) can form heteromeric hemichannels. *J Biol Chem.* 1995. 270: 6768-6772.
9. Kikuchi T, Kimura RS, Paul DL, Adams JC. Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anat Embryol (Berl);* 1995. 191: 101-118.

10. Stenson PD, Mort M, Ball EV, Shaw K, Phillips AD, Cooper DN. *The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine.* *Human Genetics.* 2014; 133(1): 1-9.
  11. Scott DA, Carmi R, Kraft ML, Ramesh A, Elbedour K, Yairi Y, et al. *Identification of mutations in the connexin 26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss.* *Hum Mutat.* 1998; 11(5): 387-394.
  12. Gravina LP, Foncuberta ME, Estrada RC, Barreiro C, Chertkoff L. *Carrier frequency of the 35delG and A1555G deafness mutations in the Argentinean population. Impact on the newborn hearing screening.* *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2007; (4): 639-43.
  13. Dalamón V, Florencia Wernert M, Lotersztein V, Craig PO, Diamante RR, Barteik ME, et al. *Identification of four novel connexin 26 mutations in non-syndromic deaf patients: genotype-phenotype analysis in moderate cases.* *Mol Biol Rep.* 2013; 40(12): 6945-55.
  14. Kenna MA, Feldman HA, Neault MW, Frangulov A, Wu BL, Fligor B, et al. *Audiologic phenotype and progression in GJB2 (Connexin 26) hearing loss.* *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010; 136(1): 81-7.
  15. Storm K, Willocx S, Flothmann K, Van Camp G. *Determination of the carrier frequency of the common GJB2 (connexin-26) 35delG mutation in the Belgian population using an easy and reliable screening method.* *Hum Mutat.* 1999; 14(3): 263-6.
  16. Wingard JC, Zhao HB. *Cellular and Deafness Mechanisms Underlying Connexin Mutation-Induced Hearing Loss-A Common Hereditary Deafness.* *Front Cell Neurosci.* 2015; 9: 202.
-