

Caracterización clínica, citogenética y molecular de un nuevo caso de síndrome de Nijmegen en Chile

Katherine Marcelain C^{1a}, Mariana Aracena A²,
Cecilia Be R^{3b}, Carmen Luz Navarrete S⁴,
Rosa Moreno H⁵, Manuel Santos A⁶, Juana Pincheira V^{1c}.

Clinical, cytogenetic and molecular characterization of a new case of Nijmegen breakage syndrome in Chile

The Nijmegen Breakage Syndrome (NBS) is a rare autosomal recessive disorder associated with microcephaly, immunodeficiency, chromosome instability and cancer proneness. The mutated gene that results in NBS codes for nibrin (Nbs1/p95), a DNA repair protein that is functionally linked to ATM, the kinase protein product of the gene responsible of ataxia-telangiectasia (A-T). We report the clinical, cytogenetic and molecular characterization of a second case of NBS in Chile detected by us. The patient is a 7 years old Chilean boy from a consanguineous marriage, with microcephaly, immunodeficiency and acute non lymphocytic leukemia (ANLL). As NBS shares chromosomal and cellular features with A-T, the cytogenetic studies of this patient also included 3 A-T patients. Our results showed that the frequency of spontaneous and X rays induced chromosomal aberrations in NBS are higher than in A-T cells. DNA analysis revealed that the patient is homozygous for the Slavic mutation 657del5 in the NBS1 gene. This finding and the absence of nibrin in patient's cells, confirmed the clinical diagnosis of NBS in our patient (Rev Méd Chile 2004; 132: 211-18).

(Key Words: Ataxia telangiectasia; Genes; Nijmegen-Breakage syndrome)

El presente trabajo fue parcialmente financiado por la Beca de Apoyo para la Realización de Tesis Doctoral, CONICYT-2002; DID #56; y por el Proyecto PB98-0072 del Ministerio de Educación y Cultura. España.

¹Programa de Genética Humana (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile. ²Servicio de Genética, Hospital Calvo Mackena, Santiago, Chile. ³Servicio de Genética, Clínica Las Condes, Santiago, Chile. ⁴Unidad de Inmunorreumatología, Hospital Roberto del Río, Santiago, Chile. ⁵Servicio de Oncología, Hospital Sótero del Río, Santiago, Chile. ⁶Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.

^a Médico Veterinario. Tesista del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

^b Tecnólogo Médico

^c PhD.

Correspondencia a: Juana Pincheira. Programa de Genética Humana (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Casilla 70061 Santiago 7, Santiago-Chile. Fax: 7373158. E mail: jpincheira@machi.med.uchile.cl

El síndrome de Nijmegen (NBS) es una enfermedad genética, autosómica recesiva de muy baja frecuencia en la población¹. Las características clínicas del NBS (OMIM 251260) incluyen microcefalia severa, inmunodeficiencia acompañada de infecciones recurrentes, retraso en el desarrollo y una alta susceptibilidad al desarrollo de cáncer de tipo linforreticular².

Estudios de ligamiento en familias de afectados de NBS han permitido identificar el gen *NBS1*, encontrándose una mutación en la mayoría de los pacientes afectados^{3,4}. Este gen se localiza en el brazo largo del cromosoma 8 (8q2.1) y codifica la proteína nibrina (Nbs1/p95)⁵. La mayor parte de los pacientes estudiados son homocigotos para la mutación 657del5, una delección de 5 nucleótidos (ACAAA) en la posición 657 en el exón 6 del gen *NBS1*⁶. Esta mutación es responsable de la síntesis de una proteína nibrina truncada, no detectable por *Western blot*, en la mayoría de los casos de NBS.

El NBS forma parte del conjunto de síndromes de inestabilidad cromosómica, al cual también pertenecen la ataxia-telangiectasia (A-T), el síndrome ATDL (*A-T like disorder*), la anemia de Fanconi (FA) y el síndrome de Bloom, entre otros (Tabla 1).

El NBS comparte con A-T (OMIM208900) y con los otros síndromes mencionados, trastornos

en las vías de reparación del daño cromosómico endógeno e inducido y una alta predisposición al desarrollo de neoplasias. Estas características comunes, se relacionan con mutaciones en uno o más genes que participan en la formación de complejos proteicos, involucrados en la detección y reparación de fracturas bicatenarias en el ADN (Figura 1).

En el caso del NBS y la A-T, los productos génicos mutados (Nbs1 y ATM, respectivamente) participan en una misma vía de transducción de señales, relacionada con la reparación de fracturas bicatenarias y la detención transitoria de la progresión del ciclo celular. Además, ambos síndromes comparten algunas características clínicas y celulares tales como inmunodeficiencia y sensibilidad incrementada al daño cromosómico radioinducido. Estos hechos han determinado que el NBS sea clasificado como una variante de la A-T y que, aun cuando cada síndrome presenta características clínicas específicas, su diagnóstico en niños menores de 5 años presente algunas dificultades.

A la fecha se han descrito alrededor de 100 casos de NBS en el mundo^{1,6}. La mayor prevalencia para este síndrome es la detectada en tres poblaciones eslavas (República Checa, Polonia y Ucrania), en las cuales la frecuencia estimada de portadores de la mutación 657del5 en el gen *NBS1* fue de 1:177⁶.

Tabla 1. Síndromes de inestabilidad cromosómica

Síndromes	Proteínas mutadas	Agentes lesionantes	Tipos de daño en el ADN
Ataxia telangiectasia (A-T)	ATM	RI	DSB
Síndrome ATLD (A-T like disorder)	Mre11	RI	DSB
Síndrome de Nijmegen (NBS)	Nbs-1 (nibrina)	RI	DSB
Anemia de Fanconi (FANC)	FANC A, B, C, D1, D2, E, F, G	DEB; MMC	Puentes inter o intracatenarios
Síndrome de Bloom (BS)	BLM	UV	Dímeros de pirimidina

RI= Radiación ionizante; DEB= diepoxibutano; MMC= mitomicina C; UV= luz ultravioleta; DSB= fracturas bicatenarias (*double strand breaks*).

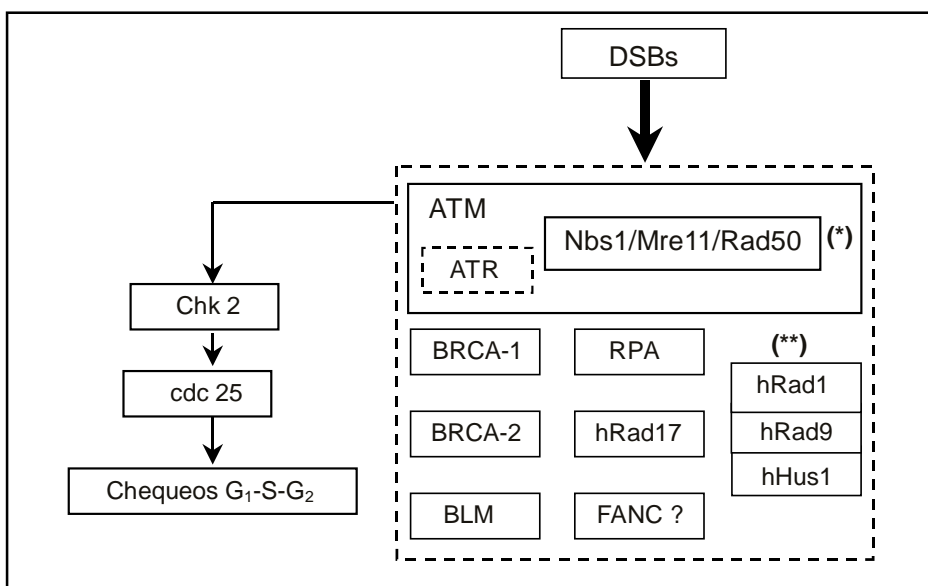


Figura 1. Complejo proteico involucrado en la detección y reparación del daño inducido por la radiación ionizante: DSBs, fracturas bicatenarias del ADN (*double strand breaks*); ATM quinasa; (*) complejo nucleásico; BRCA1 y BRCA2, proteínas mutadas en el cáncer familiar de mama y ovario; RPA, proteínas de unión a ADN monocatenario; (**) complejo tipo PCNA asociado a la actividad de la Polimerasa δ y ϵ que es mantenido por la hRad17; BLM, helicasa mutada en el síndrome de Bloom; FANC, grupo de proteínas mutadas en la anemia de Fanconi, de las cuales FANC D2 se une a BRCA1.

El presente trabajo corresponde a la descripción de un segundo caso de NBS detectado en Chile por nuestro grupo⁷. En éste se incluyen los antecedentes clínicos y genéticos del paciente, la identificación de la mutación y las características citogenéticas detectadas en células del afectado.

MATERIAL Y MÉTODO

Historia clínica del paciente. El probando, de sexo masculino, nació el 20/1/93, producto de un embarazo controlado y aparentemente sin patología. El parto fue de término, en el hospital de Curepto (Talca). El peso del RN fue de 2.750 g; talla de 44 cm; CC: 30 cm, quinto hijo de un matrimonio consanguíneo (Figura 2), tres hermanos sanos (2 mujeres y 1 varón) y una tercera hermana que habría sido fenotípicamente similar al afectado, con microcefalia y que a los ocho años falleció de leucemia. El afectado fue evalua-

do por primera vez en el Policlínico de Genética del Hospital Sótero del Río, a los 3 meses de vida, destacando una microcefalia (CC: 33,8 cm, \ll p 5 NCHS), frente «inclinada», nariz recta algo promi-

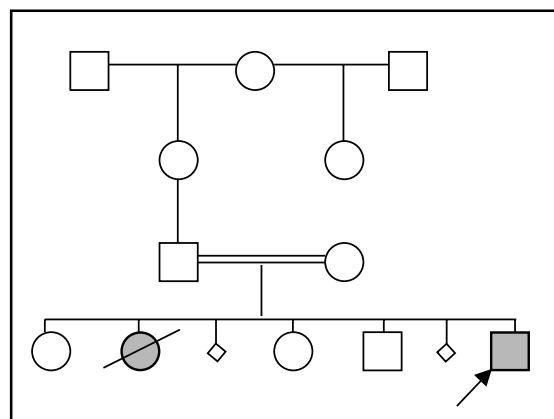


Figura 2. Genealogía del paciente.

nente, orejas grandes, hipertonia leve y pulgares incluidos. Durante los primeros 6 meses de vida, presentó repetidas infecciones respiratorias altas y varicela. Alrededor de los 4 años aparecieron manchas acrómicas en distintas partes del tronco y abdomen. En su desarrollo antropométrico, llamó la atención su persistente microcefalia (Figura 3). Su desarrollo psicomotor fue normal.

Entre sus exámenes, destacaba:

Tomografía axial computada (TAC) de encéfalo normal, un PPD de +5 mm, hemograma y VHS normales. En 1997, se realizó un estudio inmunológico que mostró las siguientes poblaciones linfocitarias: CD3: 31% (VN: 65,8±6,9); CD4: 13% (VN: 45,7±5,3), CD8: 14% (VN: 29±4,2), índice CD4/CD8: 0,93 (VN: 1,6±0,3). Linfocitos B: 8% (VN: 18,2±1,3). El estudio de las inmunoglobulinas mostró: IgG: 550 mg/dl (VN: 700-1500), IgA: <30 mg/dl (VN: 80-400), IgM: 54 mg/dl (VN: 40-260). Posteriormente, en 1998, un estudio control reveló: CD3: 23%, CD4: 11%, CD8: 7%, CD4/CD8: 1,57; y Linfo B: 23%. Un multitest cutáneo reveló anergia. Todo esto configuró una inmunodeficiencia combinada parcial, iniciándose profilaxis para *Pneumocystis carinii* con cotrimoxazol 960 mg cada 48 h. No presentó mayores incidentes hasta enero de 2000, cuando a los 7 años ingresó al servicio de Oncología del Hospital Dr. Sótero del Río por dolores óseos de 2 semanas de evolución. El hemograma mostró leucocitosis de 20.900 con 19% de blastos grandes de tipo mieloides; y 80.000 plaquetas. El informe inmunológico mostró una leucemia linfática aguda estirpe T. Se intentó realizar un cariotipo en médula ósea, no obteniéndose mitosis para análisis. Se tomó una muestra de sangre periférica y una biopsia de piel para el estudio citogenético y molecular, respectivamente. El análisis cromosómico en 51 metafases obtenidas de linfocitos cultivados *in vitro*, mostró que 80% de éstas presentaba un cariotipo 46,XY y sin alteraciones cromosómicas. El 20% restante presentó diversas aberraciones, que incluyeron fracturas cromatídicas y cromosómicas, translocaciones y dicéntricos. El 15% de éstas últimas involucró a los cromosomas 7 y 14. Se trató la leucemia según protocolo PINDA 98, terminando en junio de 2002. Posteriormente ha presentado cuadros de diarrea recurrentes.

Muestras. Las muestras utilizadas fueron: sangre periférica del paciente en estudio, de 3 pacientes



Figura 3. Fotografía del paciente a los 6 años de edad.

con ataxia telangiectasia y de tres niños controles; y una biopsia de piel del paciente NBS. Todas las muestras fueron extraídas después que el médico tratante obtuviera el consentimiento informado de los padres de los pacientes y de los niños controles. Los protocolos de consentimiento informado utilizados en el presente trabajo, fueron aprobados por los Comités de Ética de la Investigación de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile y del Hospital Dr. Sótero del Río.

Las muestras de sangre fueron utilizadas para la extracción de ADN genómico y para el establecimiento de cultivos de linfocitos. La biopsia de piel del paciente fue utilizada para establecer cultivos primarios de fibroblastos, en los cuales se evaluó la presencia de la proteína nibrina.

Extracción de ADN genómico e identificación de la mutación. El ADN genómico de los pacientes (NBS y A-T) y de un control fue extraído de 2 ml de sangre periférica, utilizando para ello el *kit Wizard®*, *genomic purification* (Promega Corporation, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Estos ADN fueron amplificados mediante la técnica de PCR, utilizando partidores para la detección de la mutación 657 del 5 del gen *NBS1*. Estos fueron:

Directo: 5'-ACCCACCTCTTGATGAACCA-3' y Reverso: 5'-CTGTTTGGCATTCAAAAA-3'. El fragmento amplificado corresponde a 112 pares de bases para el ADN control y a 107 pares de bases si la mutación 657 del 5 está presente.

La mezcla de reacción incluyó 0,15 a 0,3 µg de ADN genómico, 0,5 µg de cada partidor, 0,8 mM de dNTBs (Gibco BRL, USA) 1,5 mM de Mg Cl₂ (Boehringer Mannheim, Alemania) y 0,5 unidades de polimerasa Taq (Fermentas, Canadá) en un volumen final de 20 µl de *buffer* PCR (Fermentas, Canadá).

La amplificación fue realizada en un Termociclador PTC-100 (MJ Research Inc., USA) por 34 ciclos. Los productos de la reacción fueron separados en gel poliacrilamida al 8% (acrilamida-bisacrilamida 19:1) (Winckler, Chile) en condiciones no denaturante, a 150 V. El gel fue teñido con bromuro de etidio (10 min) previo a su visualización en transiluminador.

Estudio citogenético. Muestras de sangre (5 ml) de los pacientes (NBS y A-T) y controles fueron utilizadas para establecer cultivos de linfocitos. Para ello, los linfocitos fueron cultivados durante 72 h en medio RPM1 1460 suplementado con antibióticos, suero fetal bovino 20% y fitohemaglutinina M 2% (Gibco USA). El procesamiento de los cultivos se realizó de acuerdo al procedimiento usual, descrito previamente⁸.

Para cada individuo (pacientes NBS y A-T y controles) se establecieron dos cultivos, uno de ellos fue utilizado para el análisis de las aberraciones cromosómicas en situación basal y el segundo cultivo fue utilizado para evaluar la respuesta celular al daño radioinducido. Para estos efectos, los cultivos fueron irradiados con 0,4 Gy, 2,5 h antes del procesamiento y las metafases fueron acumuladas durante las dos últimas horas, mediante la adición de colchicina 5×10^{-7} M. Para la irradiación se utilizó un equipo de radioterapia Philips operado a 180 kV, 10 mA y filtro de Al de 4 mm, a una tasa de dosis de 0,4 Gy/min.

La frecuencia de daño cromosómico basal y radioinducido fue estimado en base al recuento de aberraciones en metafases teñidas con Giemsa 3%. Las aberraciones cromosómicas encuestadas fueron: fracturas cromosómicas, cromatídicas e isocromatídicas; translocaciones y cromosomas dicéntricos y en anillo. La identificación de los

cromosomas involucrados en reordenamientos se realizó en metafases bandeadas con tripsina⁹.

La significación estadística de las diferencias entre la frecuencia de aberraciones de los linfocitos NBS y A-T fue estimada mediante el test Z de una cola.

Cultivo de fibroblastos y detección de la nibrina mediante Western blot. Para el establecimiento de cultivos primarios de fibroblastos, pequeños trozos de la biopsia de piel del paciente fueron disgregados con colagenasa II 1% (Sigma). Las células disgregadas fueron centrifugadas, lavadas y posteriormente sembradas en placas de Petri con medio de cultivo Ham F-10 suplementado con 15% de suero fetal bovino y cultivadas a 37°C con atmósfera controlada de CO₂ 5% y 98% de humedad.

La detección de la presencia de nibrina se realizó en extractos proteicos nucleares de los fibroblastos del paciente y de una línea celular control y una A-T (GM02185 y GM01526; *Coriell Cell Repositories*, USA) mediante *Western blot*. Los extractos proteicos fueron obtenidos de acuerdo al protocolo descrito por Ausubel et al, 1999¹⁰.

Las proteínas (30 µg) fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 10% y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo policlonal p95NBS1 (Ab-1) (*Oncogene Research Products*, USA), seguido por la detección con el anticuerpo secundario, conjugado a peroxidasa. La actividad peroxidasa se reveló bajo condiciones de emisión de quimioluminiscencia (ECL[®]), Amersham Pharmacia Biotech, USA).

RESULTADOS

Análisis citogenético. Los resultados en la Tabla 2 muestran que tanto en situación basal como frente a daño radioinducido, la frecuencia de aberraciones cromosómicas en los linfocitos NBS y A-T fue superior a la de los controles. En situación basal, los tipos de aberraciones presentes en las células NBS y A-T incluyeron reordenamientos cromosómicos (f crom, t y dic) no detectados en linfocitos controles.

La Tabla 2 también muestra que la frecuencia de daño cromosómico radioinducido en los linfo-

Tabla 2. Frecuencia de aberraciones cromosómicas basales y radioinducidas en linfocitos del paciente NBS, de afectados de A-T y de controles

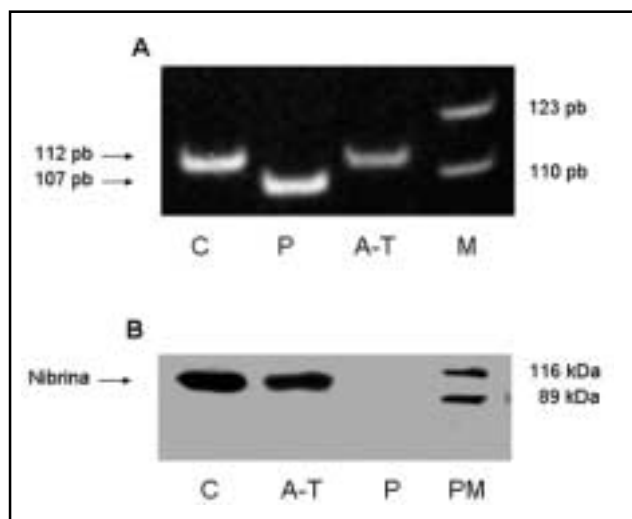
		Aberraciones cromosómicas/100 metafases					Total
		NMA	f ctd	f crom	t	dic-a	
Paciente NBS	Basal	101	9,9	11,9	3,0	1,0	25,8**
	Rx	78	124,4	24,4	3,8	1,3	153,9**
Pacientes AT*	Basal	156	4,5	3,8	2,6	0	10,9±3
	Rx	156	75,0	7,1	3,2	0,6	85,9±5
Controles*	Basal	166	1,2	0	0	0	1,2±0,5
	Rx	156	50,6	2,7	0	0	53,3±9

Rx= rayos X (0,4 Gy). NMA= Número de metafases analizadas. f ctd= fracturas cromatídicas; f crom= fracturas cromosómicas/isocromatídicas; t= translocaciones; dic-a= cromosomas dicéntricos o en anillos. *X±SD de resultados obtenidos en 3 pacientes A-T y en 3 niños controles. **Mayor que las de linfocitos A-T ($p \leq 0,001$, test Z de una cola).

citocitos NBS fue superior a la de los A-T. Sin embargo, tanto las células NBS como las A-T exhiben los mismos tipos de reordenamientos cromosómicos (f crom, t, dic-a) generados por la falta de reparación de fracturas bicatenarias en el ADN. El análisis de metafases bandeadas G mostró que en los linfocitos NBS, al igual que en los A-T, los cromosomas involucrados con mayor frecuencia en translocaciones y dicéntricos fueron el 7 y el 14, tanto en situación basal como de daño radioinducido.

Identificación de la mutación en el gen NBS1 y de la proteína nibrina (Nbs1/p95). El análisis del DNA del paciente en estudio mostró la existencia de una delección de 5 nucleótidos en la posición 657 (exón 6) del gen *NBS1* (Figura 4A). La presencia de esta mutación (657del5) sería la responsable de la síntesis de una proteína truncada. Ello fue confirmado por la ausencia de nibrina en el carril correspondiente a la muestra del paciente NBS en el *Western blot* para proteínas nucleares (Figura 4B).

Figura 4. A) Gel electroforético de los amplificadores correspondientes a ADN de los pacientes NBS y A-T y del individuo control, obtenidos por PCR. Las bandas superiores con mayor peso molecular (112 pares de bases) corresponden al control (C) y al paciente (A-T). La banda inferior con un menor peso molecular (107 pares de bases), producto de la delección de 5 nucleótidos, corresponde al paciente NBS (P). M= Marcador de peso molecular pBR322/Msp I. B) Western blot correspondiente a la inmunodetección de nibrina (Nbs1/p95) en la fracción de proteínas nucleares provenientes de fibroblastos NBS, A-T y controles. La banda correspondiente a la nibrina está indicada por la flecha (95 kDa). Los carriles C, A-T y P corresponden a la fracción proteica proveniente de células controles, A-T y del paciente NBS respectivamente. PM= indicador de peso molecular.



DISCUSIÓN

El síndrome de Nijmegen (NBS) y la ataxia-telangiectasia (A-T) son dos de los síndromes de inestabilidad cromosómica que comparten algunas características clínicas y celulares¹¹. En el presente caso, el afectado con NBS presenta inmunodeficiencia e inestabilidad cromosómica y desarrolló una leucemia linfática aguda T. Estas características también pueden estar presentes en los afectados de A-T. Sin embargo, a diferencia de estos últimos, el paciente estudiado no presenta ataxia cerebelar, telangiectasia ni niveles elevados de α -fetoproteínas, pero sí presenta microcefalia severa, característica ausente en los pacientes A-T¹². Estos antecedentes sugieren el diagnóstico de síndrome de Nijmegen. Sin embargo, en muchos de los casos estudiados, algunas de las características clínicas propias de los pacientes A-T se manifiestan después de los 5 años de edad, por lo cual el diagnóstico de los afectados de NBS puede presentar algunas dificultades. Ello hace necesario la utilización de otras metodologías que aporten mayor información, tales como los análisis citogenéticos y moleculares.

En este paciente, la evaluación citogenética en linfocitos mostró que al igual que en los afectados de A-T, la frecuencia de daño cromosómico basal y radioinducido fue mayor que en los controles. Los distintos tipos de aberraciones cromosómicas que se presentan en ambas patologías son generadas por la falta de reparación de las fracturas bicatenarias del DNA. Dado que la reparación de este tipo de daño requiere tanto de la actividad de la ATM como de la Nbs1^{13,14}, la ausencia de estas proteínas en las células A-T y NBS respectivamente, explicaría la mayor frecuencia de daño cromosómico en estos dos tipos de células con respecto

al control. Sin embargo, los resultados del análisis citogenético también revelaron que la frecuencia de daño cromosómico basal y radioinducido en los linfocitos NBS fue significativamente superior al de los A-T ($p < 0,001$). Esta menor frecuencia de daño cromosómico en las células A-T se explicaría por la existencia de una vía de reparación del daño alternativa, dependiente de la quinasa ATR (Figura 1)^{15,16}. A su vez, la mayor frecuencia de daño cromosómico en las células NBS obedecería a que la participación de la quinasa ATM en la activación de la vía de reparación de las fracturas bicatenarias durante G_2 sería dependiente de la actividad del complejo Nbs1/Mre11/Rad50¹⁷.

El análisis molecular, mostró la presencia de la mutación 657del5 en el gen *NBS1* y la ausencia de nibrina en las células del paciente, lo que confirmó el diagnóstico de síndrome de Nijmegen para el presente caso.

La mutación 657del5 encontrada en este paciente corresponde a la mutación eslava, identificada en 90% de los casos de NBS⁶. Sin embargo, a la fecha se han descrito otras 7 mutaciones en el gen *NBS*^{19,20}, 5 de las cuales también generan la ausencia de nibrina. Esto implica que un resultado negativo para la mutación 657del5 es insuficiente para descartar el diagnóstico de NBS. Más aún, estudios recientes de algunos casos con características clínicas idénticas o muy similares al NBS aparentemente no presentan mutaciones en el gen *NBS*. Ello sugiere la posible participación de otro gen en la producción del fenotipo NBS²¹.

Por lo tanto, sugerimos que en el diagnóstico de afectados de NBS, los datos clínicos se complementen con el análisis citogenético y los estudios moleculares para la detección de mutación en el gen *NBS1* y de la proteína nibrina en las células del afectado.

REFERENCIAS

1. THE INTERNATIONAL NIJMEGEN SYNDROME STUDY GROUP. Nijmegen breakage syndrome. *Arch Dis Child* 2000; 82: 400-6.
2. WEEMAES C, SMEETS D, VAN DER BURGT C. Nijmegen breakage syndrome: a progress report. *Int J Radiat Biol* 1994; 66: S185-188.
3. SAAR K, CHRZANOWSKA K, STUMM M, JUNG M, NURNBERG G, WIENKER T. The gene for the ataxia-telangiectasia variant, Nijmegen breakage syndrome, maps to a 1-cM interval on chromosome 8q21. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 605-10.
4. MATSUURA S, TAUCHI H, NAKAMURA A, KONDO N, SAKAMOTO S, ENDO S ET AL. Positional cloning of the gene for Nijmegen breakage syndrome. *Nat Genet* 1998; 19: 179-81.
5. VARON R, VISSINGA C, PLATZER M, CEROSALETTI K, CHRZANOWSKA K, SAAR K ET AL. Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen

- breakage syndrome. *Cell* 1998; 93: 467-76.
6. VARON R, SEEMANOVA E, CHRZANOWSKA K, HNATEYKO O, PIEKUTOWSKA-ABRAMCZUK D, KRAJCWSKA-WALESEK M ET AL. Clinical ascertainment of Nijmegen breakage syndrome (NBS) and prevalence of the major mutation, 657del5, in three Slav populations. *Eur J Hum Genet* 2000; 8: 900-2.
 7. PINCHEIRA J, BRAVO M, SANTOS JM. G2 repair in Nijmegen breakage syndrome: G2 duration and effect of caffeine and cycloheximide in control and X-ray irradiated lymphocytes. *Clin Genetics* 1998; 53: 262-7.
 8. PINCHEIRA J, GALLO C, BRAVO M, NAVARRETE MH, LÓPEZ-SÁEZ JF. G2 repair and aging: influence of donor age on chromosomal aberrations in human lymphocytes. *Mutat Res* 1993; 295: 55-62.
 9. CHIARELLI BA, SARTI-CHIARELLI M, SHAPER DA. Chromosome banding with trypsin. *Mammal Chrom Newsl* 1972; 13: 44-5.
 10. AUSUBEL F, BRENT R, KINGSTON R, MOORE D, SEIDMAN JD, SMITH J ET AL. *Short Protocols in Molecular Biology*, 4th Edition, 1999. Ed. John Wiley & Sons. pp. 17.1.1-17.1.15.
 11. SHILOH Y. Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart. *Ann Rev Genet* 1997; 31: 636-62.
 12. DE LA TORRE C, PINCHEIRA J, LÓPEZ-SÁEZ JF. Human Syndromes with genomic instability and multiprotein machines that repair DNA double-strand breaks. A review. *Histol Histopathol* 2003; 18: 225-43.
 13. PANDITA TK, LIEBERMAN HB, LIM DS, DHAR S, ZHENG W, TASYA Y ET AL. Ionizing radiation activates the ATM kinase throughout the cell cycle. *Oncogene* 2000; 19: 1386-91.
 14. HUANG J, DYNAN WS. Restitution of the mammalian DNA double strand breaks end joining reaction reveals a requirement for Mre11/Rad50/Nbs1 containing fraction. *Nucl Acids Res* 2002; 30: 667-74.
 15. SHILOH Y. ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11: 71-7.
 16. PINCHEIRA J, BRAVO M, NAVARRETE M, MARCELAIN K, LÓPEZ-SÁEZ J, DE LA TORRE C. Ataxia-telangiectasia: G2 checkpoint and chromosomal damage in proliferating lymphocytes. *Mutagenesis* 2001; 16: 419-22.
 17. PETRINI JH. The mammalian Mre11/Rad50/Nbs1 protein complex: integration of functions in the cellular DNA damage response. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 1264-9.
 18. MARASCHIO P, DANESINO C, ANTOCCIA A, RICORDY R, TANZARELLA C, VARON R ET AL. A novel mutation and novel features in Nijmegen breakage syndrome. *J Med Genet* 2001; 38: 113-7.
 19. FRITZ E, DIGWEED M. Nijmegen breakage syndrome. En: Hisama FM, Weissman SM, Martin GM, eds. *Chromosomal instability and aging*. USA Marcel Dekker, Inc. 2003; 311-43.
 20. RESNICK IB, KONDRATENKO I, TOGOEV O, VASSERMAN N, SHAGINA I, EVGRAFOV O ET AL. Nijmegen breakage syndrome: Clinical characteristics and mutation analysis in eight unrelated Russian families. *J Pediat* 2002; 355-61.
 21. MARASCHIO P, SPADONI E, TANZARELLA C, ANTOCCIA A, DI MARI A, MAGHENIE M ET AL. Genetic heterogeneity for a Nijmegen breakage-like syndrome. *Clin Genet* 2003; 63: 283-90.

Agradecimientos

A los Drs. Rodrigo Loubies, Cecilia Méndez, Luisa Herrera, y al Sr. Patricio González, alumno del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (Universidad de Chile), por su valiosa colaboración en la obtención de la biopsia de piel, estudio inmunológico y en la detección de la mutación del paciente, respectivamente. También a los profesionales del Laboratorio Clínico del Hospital de Niños Roberto del Río y del Hospital Dr. Sótero del Río de la Región Metropolitana, por su colaboración en la obtención de las muestras de sangre periférica; y a la Tecnóloga Médica, Sra. Iris Oviedo, por su asistencia técnica en el mantenimiento de los cultivos celulares.