

# Regiones organizadoras nucleolares argirófilas como un biomarcador esperanzador para la detección de niveles de hipoxia cerebral causados por diferentes dosis de intoxicación de monóxido de carbono

Kerim Yesildag<sup>1</sup>, Kamil Kokulu<sup>2</sup>, Huseyin Mutlu<sup>2</sup>, Recep Eroz<sup>3</sup>, Ekrem Taha-Sert<sup>2</sup> y Ayhan Saritas<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Enfermedades Torácicas, Hospital Konya Numune, Konya; <sup>2</sup>Departamento de Medicina de Emergencia, Facultad de Medicina, Universidad de Aksaray, Aksaray; <sup>3</sup>Departamento de Genética Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Aksaray, Aksaray. Turquía

## Resumen

**Objetivos:** El objetivo del estudio es investigar si existe alguna relación entre el número medio de regiones organizadoras nucleolares argirófilas (AgNOR) y la proporción de área total de AgNOR/área nuclear total (TAA/TNA) y los niveles de hipoxia cerebral en la exposición a diferentes dosis agudas de gas monóxido de carbono (CO). **Métodos:** Cada grupo experimental fue expuesto a gas CO (concentraciones de 1,000, 3,000 y 5,000 ppm). Luego las ratas fueron anestesiadas, se tomaron muestras de sangre de la vena yugular derecha para la detección de los niveles de carboxihemoglobina. Las ratas se sacrificaron el séptimo día. Se aplicó tinción con AgNOR en los tejidos cerebrales. Se detectaron el TAA/TNA y el número medio de AgNOR para cada núcleo. **Resultados:** Se detectaron diferencias significativas entre todos los grupos para la relación TAA/TNA, el número medio de AgNOR y el nivel de carboxihemoglobina. Según la doble comparación de grupos, las diferencias entre control y 1,000 ppm, control y 3,000 ppm, control y 5,000 ppm y 1,000 y 5,000 ppm fueron significativas para la relación TAA/TNA. Cuando se consideró el número de AgNOR medio, se detectaron diferencias significativas entre control y 1,000ppm, control y 3,000ppm, control y 5,000 ppm y 1,000 y 3,000 ppm. **Conclusión:** Las proteínas AgNOR pueden usarse para la detección temprana de la duración, intensidad y daño de la lesión cerebral causada por la intoxicación por CO. Por lo tanto, se pueden desarrollar estrategias de tratamiento efectivas para la prevención de condiciones hipóxicas.

**PALABRAS CLAVE:** Regiones organizadoras nucleolares argirofílicas. Cerebro. Intoxicación por CO. Regiones organizadoras nucleolares. ADNr.

## Argyrophilic nucleolar organizer regions as a promising biomarker for the detection of brain hypoxia levels caused by different doses of carbon monoxide poisoning

### Abstract

**Objectives:** The purpose of the study is to investigate whether there is any relationship between mean argyrophilic nucleolar organizing regions (AgNOR) number and total AgNOR area/total nuclear area (TAA/TNA) ratio and the levels of brain hypoxia after exposure to different acute doses of carbon monoxide (CO) gas. **Methods:** Each experimental group was exposed to CO gas (concentrations of 1,000, 3,000 and 5,000 ppm). Then, the rats were anesthetized, and blood samples were taken from the right jugular vein for carboxyhemoglobin levels detection. The rats were sacrificed on seventh day. AgNOR staining was applied to brain tissues. TAA/TNA and mean AgNOR number were detected for each nucleus. **Results:** Significant differences were detected among the all groups for TAA/TNA ratio, mean AgNOR number and carboxyhemoglobin level. According

### Correspondencia:

\*Ayhan Saritas

E-mail: a\_saritas\_@hotmail.com

0016-3813/© 2021 Academia Nacional de Medicina de México, A.C. Publicado por Permanyer. Este es un artículo open access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Fecha de recepción: 06-05-2021

Fecha de aceptación: 11-10-2021

DOI: 10.24875/GMM.21000273

Gac Med Mex. 2021;157:630-637

Disponible en PubMed

[www.gacetamedicademexico.com](http://www.gacetamedicademexico.com)

to double comparison of groups, the differences between control and 1000ppm, control and 3000ppm, control and 5000ppm and 1000 and 5000ppm were significant for TAA/TNA ratio. When mean AgNOR number to be considered, significant differences were detected between control and 1000ppm, control and 3000ppm, control and 5000ppm and 1000 and 3000ppm. **Conclusion:** AgNOR proteins may be used for early detection of the duration, intensity and damage of brain injury caused by CO intoxication. Thus, effective treatment strategies for the prevention of hypoxic conditions may be developed.

**KEY WORDS:** Argyrophilic nucleolar organizer regions. Brain. CO poisoning. Nucleolar organizer regions. rDNA.

## Introducción

El gas de monóxido de carbono (CO) no es irritante, es insípido, inodoro, incoloro y se forma como resultado de la combustión incompleta de sustancias que contienen carbono. Las fuentes de gas CO son causadas por incendios, incendios forestales, calderas de gas defectuosas, gases de escape de vehículos de motor, etc. Hay 20,000-50,000 casos de intoxicación por exposición a CO en los EE.UU. cada año. La intoxicación por CO se conoce como la causa de muchas intoxicaciones fatales en algunos países<sup>1</sup>.

El gas CO se difunde rápidamente a través de las membranas capilares alveolares, se une al oxígeno y conduce a la formación de carboxihemoglobina (COHb). La afinidad del CO por la Hb es aproximadamente 200-250 veces mayor que la del oxígeno. La intoxicación por CO causa hipoxia en el cuerpo y el cerebro es uno de los órganos más sensibles a la hipoxia. Se ha observado atrofia del hipocampo, cambios en las estructuras subcorticales y el pálido<sup>1,2</sup>.

Las regiones organizadoras nucleolares (NOR) son locus genéticos en los cromosomas. Estas regiones se producen a partir de proteínas y ADN ribosómico (ADNr), algunos de los cuales son características argirófilas. Las NOR son bucles de ADN, repetidos en serie con espaciadores intergénicos y transcritos en ARN ribosómico (ARNr), que es parte de los ribosomas maduros en los nucléolos, y finalmente se convierte en parte de los ribosomas maduros en el citoplasma. Las NOR son subunidades funcionales del nucleolo<sup>3</sup>.

Hasta donde sabemos, no existen estudios sobre la relación entre el envenenamiento por CO y las proteínas organizadoras nucleolares argirófilas (AgNOR) en los tejidos cerebrales. Además, las AgNOR revelan la actividad metabólica, la proliferación y el potencial de autorrenovación de las células dañadas en eventos isquémicos. Por lo tanto, nuestro objetivo fue evaluar los efectos potenciales de la intoxicación por CO en la síntesis de proteína NOR de los tejidos cerebrales e investigar si existe alguna relación no solo entre la cantidad de proteína AgNOR y los niveles de COHb,

sino también entre el grado de hipoxia y ambas cantidades de AgNOR (número medio de AgNOR y proporción de área total de AgNOR/área nuclear total [TAA/TNA]) en el estudio actual.

## Materiales y métodos

### Procedimientos experimentales

El presente estudio fue aprobado de acuerdo con los principios aceptados internacionalmente para el cuidado y uso de animales de laboratorio por el comité de ética de experimentos con animales local. Usamos los tejidos cerebrales de las ratas utilizadas en nuestro estudio anterior<sup>2</sup>. Se incluyeron en el estudio veinte ratas albinas Wistar macho adultas (con un peso de 150 y 180 g) seleccionadas de la misma raza.

Se constituyeron cuatro grupos que contenían cada uno cinco ratas de la siguiente manera:

- Grupo A: el grupo de control (que consiste en ratas expuestas al aire ambiente).
- Grupo B: formado por ratas expuestas a CO en una concentración baja (mezcla de aire ambiente y 1,000 ppm de CO).
- Grupo C: formado por ratas expuestas a CO en una concentración media (mezcla de aire ambiente y 3,000 ppm de CO).
- Grupo D: compuesto por ratas expuestas a CO en una alta concentración (mezcla de aire ambiente y 5,000 ppm de CO).

Se utilizaron tres tubos de acero (Habas, Industrial and Medical Gases Production Industries Inc., Kocaeli, Turquía) que contenían 10 l de gas CO y diferentes concentraciones de mezcla de aire (1,000, 3,000 y 5,000 ppm). Todas las ratas se expusieron a gas CO en una cámara de plástico cerrada (tamaño: 20 x 40 x 60 cm<sup>3</sup>). Había dos aberturas (salida y entrada) con 2 cm de diámetro en lados opuestos de la cámara de plástico.

Los grupos B, C y D se expusieron a gas CO en tres densidades (1,000 ppm, 3,000 ppm y 5,000 ppm) a un caudal de 4 l/minuto durante 30 minutos en la

cámara de plástico. Después de siete días de exposición, las ratas fueron anestesiadas con 50 mg/kg de hidrocloreto de ketamina por vía intraperitoneal (Ketalar, Parke-Davis, Eczacibasi, Estambul-Turquía) y 3 mg/kg de hidrocloreto de xilacina por vía intraperitoneal (Rompun, Bayer AG, Leverkusen-Alemania). Las muestras de sangre para la detección del nivel de COHb se obtuvieron de la vena yugular derecha mediante cateterismo en cada grupo. Después de tomar la muestra de sangre se retiró el catéter.

Bajo anestesia, las ratas se colocaron en posición supina, se afeitó la pared torácica y se desinfectó utilizando una solución de povidona yodada al 10% para el procedimiento quirúrgico. La toracotomía se aplicó a través de una incisión en la línea media. La fijación por perfusión se obtuvo con una solución de formaldehído al 10% (administrada por vía intracardiaca). Luego se extrajeron los tejidos del cerebro y se colocaron en una solución de formaldehído al 10% para su fijación. Después de eso, estos tejidos se incrustaron en bloques de parafina después de los protocolos de procesamiento de tejidos habituales.

### DetECCIÓN DE PROTEÍNAS AgNOR

Se lograron secciones con 4  $\mu\text{m}$  de espesor de tejido cerebral, se desparafinaron en solución de xileno y se rehidrataron en soluciones de alcohol graduado. Luego los portaobjetos se secaron al aire a temperatura ambiente durante 15 minutos y se logró la fijación en metanol absoluto durante 5 minutos. La tinción de AgNOR se aplicó utilizando una forma indistintamente modificada del protocolo de Benn y Perle<sup>4</sup> y Lindner<sup>5</sup>. Los portaobjetos se evaluaron mediante microscopio óptico (Olympus CHK 2, Olympus, Japón) y los tejidos cerebrales se fotografiaron con una cámara digital (Axio Cam ICc5, ZEISS, Alemania). Las imágenes capturadas se transfirieron a un programa de procesamiento de imágenes digitales (ImageJ 1.53f, *National Institutes of Health*, Bethesda, Maryland, EE.UU.). Las mediciones del área AgNOR y del área nuclear se actualizaron utilizando la herramienta de «selecciones a mano alzada». Se evaluaron 50 núcleos por rata y se detectó la relación TAA/TNA y el número medio de AgNOR para cada núcleo de células cerebrales.

### ANÁLISIS DE LABORATORIO

Medimos los niveles de COHb con análisis de gases en sangre. Se evaluó la relación entre los

niveles de COHb y los tejidos cerebrales. El análisis de gases en sangre se aplicó con el dispositivo ABL 800 (Radiometer, Carlsbad, California-EE.UU.).

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizó SPSS versión 22 (*Statistical Package for Social Sciences*). Al evaluar los resultados del estudio, además de la estadística descriptiva (número, media, desviación estándar, mediana y rango), se realizó la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de todos los grupos y la prueba U de Mann-Whitney para la comparación por pares de grupos. Además, se realizó una prueba de regresión polinomial. Una  $p < 0.05$  se aceptó como estadísticamente significativa.

### RESULTADOS

El número medio de AgNOR, la relación TAA/TNA de cada subgrupo y su número promedio de AgNOR y la relación TAA/TNA se proporcionan en la tabla 1. Cuando se consideraron todos los grupos, se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos tanto para TAA/TNA relación ( $\chi^2$ : 14.417;  $p = 0.002$ ) y el número medio de AgNOR ( $\chi^2$ : 14.339;  $p = 0.002$ ), respectivamente (Tabla 1 y Fig. 1). Para comprender estas diferencias causadas por los grupos, se realizó una comparación binaria entre los grupos. Según doble comparación de grupos para la relación TAA/TNA, las diferencias entre control y 1,000 ppm ( $Z$ : -2.611;  $p = 0.009$ ), entre control y 3,000 ppm ( $Z$ : -2.611;  $p = 0.009$ ), entre control y 5,000 ppm ( $Z$ : -2.611;  $p = 0.009$ ) y entre 1,000 y 5,000 ppm ( $Z$ : -2.611;  $p = 0.009$ ) fueron estadísticamente significativas. Por el contrario, las diferencias entre 1,000 y 3,000 ppm ( $Z$ : -1.149;  $p = 0.251$ ) y entre 3,000 y 5,000 ppm ( $Z$ : -1.149;  $p = 0.251$ ) no fueron significativas para la relación TAA/TNA (Tabla 2).

Cuando se tuvo en cuenta el número medio de AgNOR, se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre el control y 1,000 ppm ( $Z$ : -2.611;  $p = 0.009$ ), entre el control y 3,000 ppm ( $Z$ : -2.611;  $p = 0.009$ ), entre los controles y 5,000 ppm ( $Z$ : -2.611;  $p = 0.009$ ) y entre 1,000 y 3,000 ppm ( $Z$ : -2.514;  $p = 0.012$ ). Pero las diferencias entre 1,000 y 5,000 ppm ( $Z$ : -0.419;  $p = 0.675$ ) y entre 3,000 y 5,000 ppm ( $Z$ : -1.776;  $p = 0.076$ ) no fueron significativas para el número medio de AgNOR (Tabla 2). Además, se detectaron diferencias

**Tabla 1.** Número medio de regiones organizadoras nucleolares argirófilas (AgNOR), relación área total de AgNOR/área nuclear total (TAA/TNA) de cada subgrupo y su número de AgNOR medio, relación TAA/TNA

Grupos	Número medio de AgNOR ± DE (n = 50)	TAA/TNA media ± DE (n = 50)	Número promedio de AgNOR de grupo/ mediana (rango) (n = 250)	TAA/TNA promedio del grupo/mediana (rango) (n = 250)	$\chi^2$	p
C1	1.56 ± 0.760	0.066 ± 0.017	1.565±0.071/1.56 (0.19)	0.063±0.002/0.064 (0.006)	14.339*	0.002*
C2	1.46 ± 0.579	0.060 ± 0.019				
C3	1.549 ± 0.541	0.064 ± 0.015				
C4	1.647 ± 0.796	0.064 ± 0.070				
C5	1.608 ± 0.532	0.063 ± 0.016				
A 1,000 ppm 1	2.647 ± 0.700	0.090 ± 0.028	2.675±0.140/2.686 (0.39)	0.096±0.007/0.097 (0.016)		
A 1,000 ppm 2	2.863 ± 0.663	0.104 ± 0.030				
A 1,000 ppm 3	2.706 ± 0.807	0.097 ± 0.025				
A 1,000 ppm 4	2.471 ± 0.731	0.101 ± 0.025				
A 1,000 ppm 5	2.686 ± 0.787	0.088 ± 0.024				
A 3,000 ppm 1	2.420 ± 0.785	0.095 ± 0.020	2.241±0.216/2.275 (0.49)	0.107±0.015/0.112 (0.034)		
A 3,000 ppm 2	2.275 ± 0.723	0.118 ± 0.057				
A 3,000 ppm 3	2.059 ± 0.580	0.122 ± 0.037				
A 3,000 ppm 4	1.98 ± 0.589	0.096 ± 0.015				
A 3,000 ppm 5	2.471 ± 0.674	0.112 ± 0.101				
A 5,000 ppm 1	2.961 ± 1.039	0.113 ± 0.049	2.678±0.445/2.706 (1.16)	0.123±0.016/0.116 (0.037)		
A 5,000 ppm 2	2.039 ± 0.871	0.105 ± 0.032				
A 5,000 ppm 3	3.196 ± 1.200	0.142 ± 0.057				
A 5,000 ppm 4	2.706 ± 1.064	0.138 ± 0.050				
A 5,000 ppm 5	2.490 ± 1.027	0.116 ± 0.034				

\*Para el número medio de AgNOR.

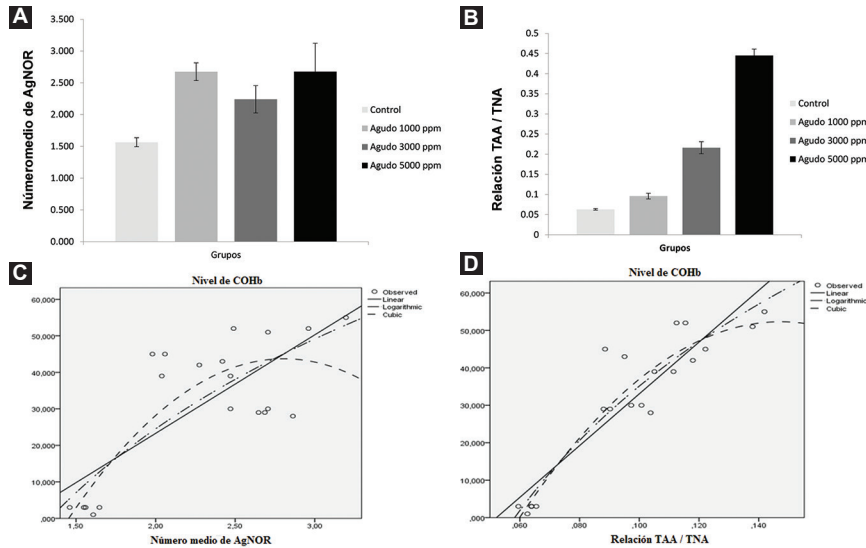
†Para TAA/TNA.

C: control; A: agudo; DE: desviación estándar.

**Tabla 2.** Resultados de la doble comparación de los grupos para la relación área total de AgNOR/área nuclear total (TAA/TNA) y el número medio de regiones organizadoras nucleolares argirófilas (AgNOR)

	Grupos	C		1,000 ppm		3,000 ppm		5,000 ppm	
		Z	p	Z	p	Z	p	Z	p
AA/TNA	C	–	–	-2.611	0.009	-2.611	0.009	-2.611	0.009
	1,000 ppm	-2.611	0.009	–	–	-1.149	0.251	-2.611	0.009
	3,000 ppm	-2.611	0.009	-1.149	0.251	–	–	-1.149	0.251
	5,000 ppm	-2.611	0.009	-2.611	0.009	-1.149	0.251	–	–
Número medio de AgNOR	C	–	–	-2.611	0.009	-2.611	0.009	-2.611	0.009
	1,000 ppm	-2.611	0.009	–	–	-2.514	0.012	-0.419	0.675
	3,000 ppm	-2.611	0.009	-2.514	0.012	–	–	-1.776	0.076
	5,000 ppm	-2.611	0.009	-0.419	0.675	-1.776	0.076	–	–

C: control.



**Figura 1.** Comparación del número medio de regiones organizadoras nucleolares argirófilas (AgNOR) (A) y la relación área total de AgNOR/área nuclear total (TAA/TNA) (B) de los grupos. Relación entre el número medio de AgNOR de células cerebrales y los niveles de carboxihemoglobina (COHb) (C) y entre la relación media de TAA/TNA de las células cerebrales y los niveles de COHb (D).

estadísticamente significativas entre todos los grupos para COHb ( $\chi^2$ : 16.995;  $p = 0.001$ ) (Tabla 3).

Para detectar la relación entre los niveles de COHb y las cantidades de AgNOR se realizó un análisis de regresión polinomial y se detectó una relación estadísticamente significativa entre los niveles de COHb y el número medio de AgNOR de células cerebrales ( $p < 0.05$ ) (Tabla 4, Fig. 1C). Además, la relación entre la relación TAA/TNA de las células cerebrales y los niveles de COHb también fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) (Tabla 4, Fig. 1D).

Demostración experimental de la toxicidad por monóxido de carbono *in vivo*. La hipoxia cerebral causada por la intoxicación por monóxido de carbono provoca daño celular y se produce una respuesta en el núcleo. Los genes de ADNr se replican a partir del núcleo, los ARNr se transcriben a partir de ADNr y las NOR se traducen a partir de ARNr. NOR teñida con plata en las células cerebrales expuso diferentes niveles de CO (control y 1,000, 3,000 y 5,000 ppm para las células cerebrales) (Fig. 2).

## Discusión

La aparición de inflamación, estrés oxidativo, radicales de oxígeno y apoptosis es comparable a una lesión por reperfusión y constituye un mecanismo de daño considerable. Las lesiones neurológicas ocurrirán a largo plazo (déficit de concentración, demencia,

ataxias o comportamiento anormal, etc.). Se pueden observar cambios en el pálido y las estructuras subcorticales. La gravedad del envenenamiento inicial no puede correlacionarse con el desarrollo de daño neuronal a largo plazo<sup>1</sup>.

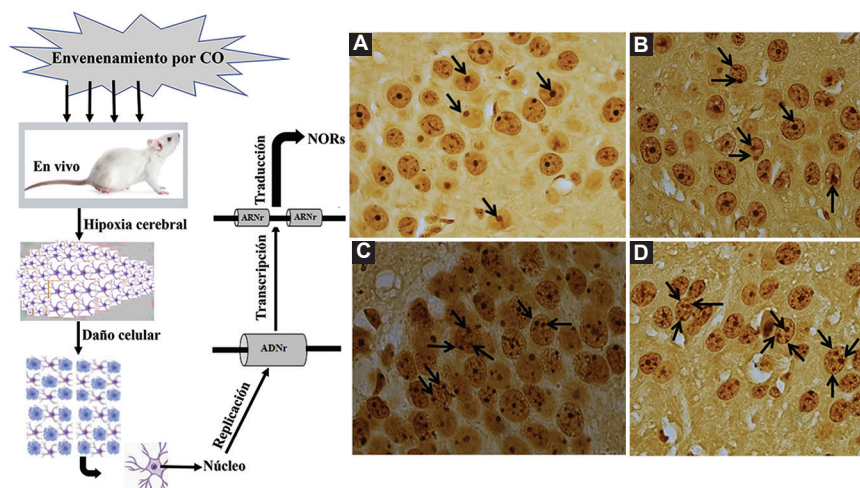
Las concentraciones de oxígeno pueden reducirse por diferentes agentes internos y externos como la intoxicación por CO. Esta situación provoca hipoxia y acidosis de las diferentes células como corazón, pulmón, músculo, cerebro, etc. En esta condición puede ocurrir daño estructural y funcional de diferentes tejidos y células dependiendo de la duración, tiempo y grado de hipoxia. Por lo tanto, la detección temprana de la duración, el tiempo y el grado de la hipoxia es de gran importancia no solo para reducir el daño de la hipoxia, sino también para el desarrollo de una estrategia de tratamiento eficaz.

Las mediciones de las cantidades de proteína AgNOR (especialmente la relación TAA/TNA) mediante *software* dan resultados más confiables sobre los cambios de estas proteínas. La técnica de tinción AgNOR es un método eficaz, fiable, económico y sensible en la evaluación del daño por isquemia del cerebro. Además, las AgNOR son un buen indicador para la detección de la proliferación, la actividad metabólica, la formación de subunidades ribosómicas, la capacidad de síntesis de proteínas de las células y el potencial de autorrenovación de las células dañadas por eventos isquémicos. Por ello se han

**Tabla 3.** Comparación de los niveles de carboxihemoglobina (COHb) en todos los grupos

Grupos	Media de COHb (n = 50)	COHb promedio del grupo/mediana (rango) (n = 250)	$\chi^2$	p
C1	3	2.6 ± 0.894/3 (2)	16.995	0.001
C2	3			
C3	3			
C4	3			
C5	1			
A 1,000 ppm 1	29	29.2 ± 0.837/29 (2)		
A 1,000 ppm 2	28			
A 1,000 ppm 3	30			
A 1,000 ppm 4	30			
A 1,000 ppm 5	29			
A 3,000 ppm 1	43	42.8 ± 2.490/43 (6)		
A 3,000 ppm 2	42			
A 3,000 ppm 3	45			
A 3,000 ppm 4	45			
A 3,000 ppm 5	39			
A 5,000 ppm 1	52	49.8 ± 6.221/52 (16)		
A 5,000 ppm 2	39			
A 5,000 ppm 3	55			
A 5,000 ppm 4	51			
A 5,000 ppm 5	52			

C: control; A: agudo.



**Figura 2.** Demostración experimental de la toxicidad por monóxido de carbono (CO) in vivo. La hipoxia cerebral causada por la intoxicación por monóxido de carbono provoca daño celular y se produce una respuesta en el núcleo. Los genes de ADN ribosómico (ADNr) se replican a partir del núcleo, los ARN ribosómico (ARNr) se transcriben a partir de ADNr y las regiones organizadoras nucleolares (NOR) se traducen a partir de ARNr. NOR teñidas con plata en células cerebrales expuestas a diferentes niveles de CO. A: control; B: 1,000 ppm; C: 3,000 ppm; D: 5,000 ppm para células cerebrales (aumento X100).

**Tabla 4.** Resumen del modelo y estimaciones de los parámetros para los niveles de carboxihemoglobina (COHb) y los números medios de regiones organizadoras nucleolares argirófilas (AgNOR), relación área total de AgNOR/área nuclear total (TAA/TNA)

Variable	Ecuación	Resumen modelo					Estimaciones de parámetros			
		R <sup>2</sup>	F	df1	df2	sig.	Constante	b1	b2	b3
M-AgNOR -N y COHb	Lineal	0.567	23.544	1	18	0.000	-30.679	26.982		
	Logarítmico	0.615	28.803	1	18	0.000	-17.556	60.703		
	Cúbico	0.665	16.843	2	17	0.000	-144.662	134.271	-23.926	0.000
TAA/TNA y COHb	Lineal	0.831	88.719	1	18	0.000	-36.059	691.112		
	Logarítmico	0.874	124.603	1	18	0.000	184.976	65.081		
	Cúbico	0.885	65.595	2	17	0.000	-96.421	2019.695	-6856.583	0.000

M-AgNOR-N: número medio de AgNOR

realizado diversos estudios sobre diferentes células como células de la raíz del cabello humano<sup>6</sup>, células epiteliales bucales del síndrome de Down<sup>7</sup> y humanos sanos<sup>8</sup>, células tiroideas benignas y malignas<sup>9-12</sup>, diferentes tipos de células cancerosas<sup>13-15</sup> e hipoxia provocada por intoxicación por CO en diferentes células<sup>2,3,16-18</sup>. Según nuestros resultados, en el primer estudio en la literatura sobre el cerebro expuesto a intoxicación por CO, se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos tanto para la relación TAA/TNA como para el número medio de AgNOR. Según la doble comparación de grupos, las diferencias entre control y 1,000 ppm, entre control y 3,000 ppm, entre control y 5,000 ppm y entre 1,000 y 5,000 ppm fueron estadísticamente significativas para la relación TAA/TNA. Además, se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre el control y 1,000 ppm, entre el control y 3,000 ppm, entre el control y 5,000 ppm y entre 1,000 y 3,000 ppm para el número de AgNOR medio.

Anteriormente informamos de que el nivel de las proteínas AgNOR aumentaba dependiendo de la duración y los niveles de exposición al CO en pulmón<sup>2</sup>, miocitos<sup>3,16</sup> y células musculares<sup>17,18</sup>. En nuestro estudio actual, los niveles de las proteínas AgNOR también aumentaron significativamente dependiendo de los niveles de exposición al CO en las células cerebrales. Además, las relaciones entre los niveles de COHb y las cantidades de AgNOR (números medios de AgNOR y relación TAA/TNA) fueron estadísticamente significativas.

Todos los organismos vivos deben protegerse a sí mismos de agentes peligrosos externos e internos como la intoxicación por CO. ¿Se pueden sintetizar las proteínas AgNOR contra la intoxicación por CO con fines protectores o desencadenar la síntesis de

otras proteínas, que tienen un efecto protector sobre la regulación de las vías de transducción de señales y genes en la condición de intoxicación por CO? ¿Se pueden utilizar esas proteínas como agente terapéutico para prevenir los efectos peligrosos de la intoxicación por CO? La hipoxia y la asfixia son un importante problema de salud que enfrenta la humanidad y pueden causar graves daños a la vida del organismo. Por tanto, ¿puede la administración de estas proteínas a individuos con riesgo de nacimiento hipóxico y asfixiante, como B12 y folato por vía oral, reducir las secuelas? ¿Pueden reducirse las deficiencias de algunos órganos durante la morfogénesis embrionaria utilizando esas proteínas? Se necesitan estudios adicionales que incluyan grandes series para comprender este tema con mayor claridad.

Como conclusión, las AgNOR brindan información sobre la actividad metabólica, la proliferación y el potencial de autorrenovación de las células dañadas en eventos isquémicos. También se puede decir que las proteínas AgNOR pueden usarse para la detección temprana de la duración, intensidad y daño de la intoxicación por CO en las células cerebrales. Por lo tanto, se pueden desarrollar estrategias de tratamiento efectivas para la prevención de condiciones hipóxicas.

## Financiamiento

Esta investigación no ha recibido ninguna subvención específica de agencias del sector público, comercial o sin fines de lucro.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Responsabilidades éticas

**Protección de personas y animales.** Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

**Confidencialidad de los datos.** Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

**Derecho a la privacidad y consentimiento informado.** Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

## Bibliografía

- Eichhorn L, Thudium M, Jüttner B. The diagnosis and treatment of carbon monoxide poisoning. *Dtsch Arztebl Int.* 2018;115:863-70.
- Colakoglu S, Saritas A, Eroz R, Oktay M, Yaykasli KO, Akoz A, et al. Is one-time carbon monoxide intoxication harmless? Evaluation by argyrophilic nucleolar-organizing regions staining method. *Hum Exp Toxicol.* 2015;34(1):24-31.
- Saritas A, Gunes H, Colakoglu S, Eroz R, Akoz A, Oktay M, et al. Are there any effects of chronic carbon monoxide exposure on argyrophilic nucleolar-organizing region-associated protein synthesis in rat myocardium? *Hum Exp Toxicol* 2016;35(9):921-8.
- Benn PA, Perle M. Técnicas de tinción y bandas de cromosomas En: Rooney DE, Czepulkowski BH, editores. *Citogenética humana, Análisis constitucional, enfoque práctico*, Vol. 1. Oxford: Oxford University Press; 1986. pp. 91-118.
- Lindner LE. Improvements in the silver-staining technique for nucleolar organizer regions (AgNOR). *J Histochem Cytochem.* 1993;41(3):439-45.
- Eroz R, Yilmaz S, Cucer N. Argyrophilic nucleolar organizing region associated protein synthesis in hair root cells of humans at different developmental stages and sex. *Biotech Histochem.* 2013;88:267-71.
- Eroz R, Okur M, Ozkan A, Berik O, Gunes C. Does higher NORs expression affect the developmental stages of Down syndrome infants? *Genet Couns.* 2012;23(2):249-53.
- Selvi B, Demirtas H, Eroz R, Imamoglu N. Reduction of the argyrophilic nucleolar organizing region associated protein synthesis with age in buccal epithelial cells of healthy individuals. *Aging Clin Exp Res.* 2015;27(2):201-8.
- Eroz R, Cucer N, Karaca Z, Unluhizarci K, Ozturk F. The evaluation of argyrophilic nucleolar organizing region proteins in fine-needle aspiration samples of thyroid. *Endocr Pathol.* 2011;22:74-8.
- Eroz R, Cucer N, Unluhizarci K, Ozturk F. Detection and comparison of cut-off values for total AgNOR area/nuclear area and AgNOR number/nucleus in benign thyroid nodules and normal thyroid tissue. *Cell Biol Int.* 2013;37(3):257-61.
- Eroz R, Unluhizarci K, Cucer N, Ozturk F. Value of argyrophilic nucleolar organizing region protein determinations in nondiagnostic fine needle aspiration samples (due to insufficient cell groups) of thyroid nodules. *Anal Quant Cytopathol Histopathol.* 2013;35:226-32.
- Oktay M, Eroz R, Oktay NA, Erdem H, Başar F, Akyol L, et al. Argyrophilic nucleolar organizing region associated protein synthesis for cytologic discrimination of follicular thyroid lesions. *Biotech Histochem.* 2015;90:179-83.
- Eroz R, Alpay, M. Investigation of the effect of capsaicin on AgNOR protein synthesis using staining intensity degree in human colon adenocarcinoma. *Edorium J Cell Biol.* 2018;4:100007C06RE2018. doi: 10.5348/100007C06RE2018OA.
- Ertekin T, Bozkurt O, Eroz R, Nisari M, Bircan D, Nisari M, et al. May argyrophilic nucleolar organizing region-associated protein synthesis be used for selecting the most reliable dose of drugs such as rhamnetin in cancer treatments? *Bratisl Lek Listy.* 2016;117(11):653-8.
- Nisari M, Eroz R. Does capsaicin have therapeutic benefits in human colon adenocarcinoma? Selection of the most reliable dose via AgNOR. *Turk J Med Sci.* 2020;50(4):1076-81.
- Kandis H, Afacan MA, Eroz R, Colakoglu S, Bayramoglu A, Oktay M, et al. Can argyrophilic nucleolar organizing region-associated protein amount be used for the detection of cardiac damage? *Hum Exp Toxicol.* 2015;35:323-31.
- Eroz R, Saritas A, Colakoglu S, Oktay M, Kandis H. Evaluation of argyrophilic nucleolar organizing region-associated protein synthesis in femoral muscle cells of rats exposed 3000 ppm carbon monoxide gas. *Konuralp Med J.* 2016;8:9-13.
- Gunes H, Saritas A, Eroz R, Colakoglu S. Use of argyrophilic nucleolar-organizer region-associated protein synthesis in skeletal muscle cells for prediction of chronic carbon monoxide exposure. *Tox Rev.* 2020; 39(4):349-54.