

Biotempo (Lima)

latindex
catálogo



<https://revistas.urp.edu.pe/index.php/Biotempo>

ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

DETERMINATION OF THE LC_{50} AND EVALUATION OF THE GENOTOXIC ACTIVITY OF ARSENIC ON NUCLEATED ERYTHROCYTES FROM THE PERIPHERAL BLOOD OF ZEBRAFISH (*DANIO RERIO* HAMILTON, 1822)

DETERMINACIÓN DEL CL_{50} Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD GENOTÓXICA DEL ARSÉNICO SOBRE LOS ERITROCITOS NUCLEADOS DE LA SANGRE PERIFÉRICA DEL PEZ CEBRA (*DANIO RERIO* HAMILTON, 1822)

Carlos Scotto^{1,2*}, Ricardo Céspedes-Lizarraga¹ & Hugo Medina-Gomez¹

¹ Laboratorio de Mejora Genética & Reproducción Animal. Facultad de Ciencias Naturales y Matemática. Universidad Nacional Federico Villarreal. Jirón Río Chepén s/n. El Agustino. Lima. Perú. E-mail: cscotto@unfv.edu.pe

² Módulo dulceacuícola de la Facultad de Ciencias de la Universidad Ricardo Palma. Lima. Perú.

* Corresponding author: cscotto@unfv.edu.pe

Carlos Scotto: <https://orcid.org/0000-0003-1592-0419>

Ricardo Céspedes-Lizarraga: <https://orcid.org/0000-0001-7324-3423>

Hugo Medina-Gómez: <https://orcid.org/0000-0002-9076-6370>

ABSTRACT

The importance of the zebrafish (*Danio rerio* Hamilton, 1822) as an animal model to understand how various biological processes that occur due to genotoxicity is well known. In the present investigation, the LC_{50} (median lethal concentration) was obtained in zebrafish for arsenic (As), which was $0.3\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Peripheral blood was then used to visualize genotoxic damage caused by As in nucleated erythrocytes using the comet assay. All types of comets were found according to the As concentration, type 0 (without damage) in the control, and in the rest from LC_{50} , all types of comets were present, type 3 and 4 (severe damage) being more abundant. Concentrations 1/10, 1/5, and 1/2 of the LC_{50} showed comet types 1 and 2 more frequently, demonstrating the high sensitivity of the comet assay and the great versatility of an animal model of the zebrafish.

Keywords: Arsenic – erythrocyte – genotoxic – LC_{50} – zebrafish

RESUMEN

Es conocida la importancia del pez cebra (*Danio rerio*, Hamilton, 1822) como animal modelo para entender cómo se producen diversos procesos biológicos por genotoxicidad. En la presente investigación se obtuvo la CL_{50} (concentración letal media) para el arsénico (As) que fue $0,3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Luego se usó la sangre periférica para poder visualizar el daño



genotóxico causado por el As en los eritrocitos nucleados mediante el ensayo cometa. Se encontraron todos los tipos de cometas de acuerdo con la concentración de As, el tipo 0 (sin daño) en el control y en el resto desde la CL_{50} estaban presentes todos los tipos de cometa, siendo más abundantes el tipo 3 y 4 (daño severo y grave). Las concentraciones 1/10, 1/5 y 1/2 de la CL_{50} se evidenció los tipos de cometa tipo 1 y 2 con mayor frecuencia demostrándose la alta sensibilidad del ensayo cometa y la gran versatilidad como animal modelo del pez cebra.

Palabras clave: Arsénico – CL_{50} – eritrocito – genotóxico – pez cebra

INTRODUCCIÓN

El estudio en genotoxicidad que es la capacidad relativa de un agente para causar efectos biológicos adversos al dañar el ADN se suele usar a ratas y ratones para así tener resultados más cercanos al ser humano (Gustavino *et al.*, 2001; Hallauer *et al.*, 2016; Guzmán-Delgado *et al.*, 2021); sin embargo, existen modelos animales que recientemente se vienen utilizando para la investigación científica como el pez Cebra (*Danio rerio*, Hamilton, 1822), que ha sido muy útil en la investigación de diversos desordenes genéticos, metabólicos y hasta en cancerogénesis, pero en genotoxicidad se ha vuelto relevante por su gran versatilidad (Gustavino *et al.*, 2001; Hallauer *et al.*, 2016; Guzmán-Delgado *et al.*, 2021). Los peces son buenos bioindicadores porque dependen de varios eslabones de la cadena trófica y son capaces de acumular sustancias tóxicas y responden fácilmente a bajas concentraciones de agentes mutagénicos (Gustavino *et al.*, 2001; Hallauer *et al.*, 2016; Guzmán-Delgado *et al.*, 2021). Esto producen alteraciones morfológicas nucleares en eritrocitos y en otros tejidos y tipos celulares, lo cual han sido utilizadas por diversos autores como posibles indicadores de genotoxicidad (Da Silva-Souza & Fontanetti *et al.*, 2006; Tanguay, 2018; Cassar *et al.*, 2019; Canedo & Rocha, 2021). Una técnica muy utilizada en la detección del daño en el ADN muy sensible es el ensayo cometa que se ha utilizado en diversos modelos animales, pero existe poca bibliografía sobre la utilización de esta técnica en la sangre periférica en el pez cebra. Actualmente el ensayo cometa ha sido aplicado con éxito en los eritrocitos en una gran cantidad de especies de peces, mostrando la sensibilidad de las células de la sangre de estos animales a los efectos genotóxicos (Pandurangi *et al.*, 1995). También es conocido que en los estudios de genotoxicidad *in vivo* se utilizan sustancias tóxicas con efectos mutagénicos, como por ejemplo cobre, cadmio, y arsénico, mercurio entre muchos otros (Cavas & Ergene-Gözükara *et al.*, 2005; Tanguay, 2018; Cassar *et al.*, 2019; Canedo & Rocha, 2021).

La presente investigación determinó la actividad genotóxica del As en eritrocitos de la sangre periférica utilizando como bioindicador al pez Cebra a diferentes concentraciones y periodos de exposición. Y usándose la técnica ensayo cometa se visualizó los efectos de la exposición al As en diversas concentraciones por debajo de la CL_{50} , de esta manera la detección es relativamente rápida y precisa gracias a la gran sensibilidad de dicha técnica siendo posible visualizar los núcleos afectados a nivel del ADN en la sangre de este pez.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se desarrolló entre enero y noviembre del año 2019. Los peces fueron seleccionados del stock de *D. rerio* pertenecientes al Laboratorio de Mejora Genética y Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad Nacional Federico Villarreal en la ciudad de Lima, Perú.

Material biológico

Para el estudio se utilizaron un total de 50 especímenes de peces adultos de ambos sexos de diversos acuarios de Lima Metropolitana y se aclimataron en condiciones controladas del Laboratorio de Mejora Genética y Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad Nacional Federico Villarreal, Lima, Perú.

Obtención de concentración letal media (CL_{50})

Se observó la supervivencia de un grupo de seis peces en tres repeticiones y las de un grupo control del mismo número durante 96 h usando las siguientes concentraciones como se muestra en la figura 1 (Barch *et al.*, 1997; Ramírez & Mendoza, 2008; Scotto *et al.*, 2019; Nava-Rivera *et al.*, 2021). Las soluciones de prueba en recipientes de vidrio fueron añadidas y se registró la mortalidad a las 96 h y finalmente se ingresaron los datos al programa

estadístico Probit (STATGRAPHICS Centurion XVIII, 2016) para obtener la estimación de la CL_{50} . Luego de la obtención de la CL_{50} con los límites de confianza al 95% se usaron concentraciones por debajo de la CL_{50}

fraccionadas al 1/2, 1/5, 1/10 con tres repeticiones más su control como en la fig. 1 (Barch *et al.*, 1997; Ramírez & Mendoza, 2008; Scotto *et al.*, 2019; Nava-Rivera *et al.*, 2021).

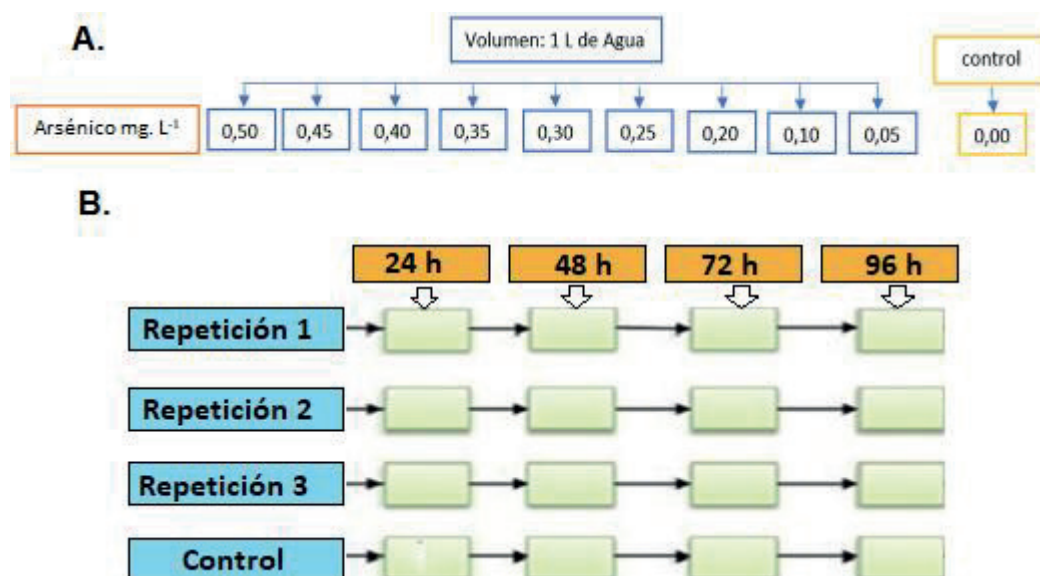


Figura 1. Esquema para determinar la CL_{50} . A. Ensayo preliminar para determinar el posible CL_{50} del arsénico en el pez cebra (*Danio rerio*) hasta las 96 h de exposición. B. Ensayo mostrando las repeticiones por cada concentración para determinar el CL_{50} del arsénico realizado a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición (Scotto *et al.*, 2019).

Obtención de cometas

Con la finalidad de obtener los cometas se siguió un protocolo ya estandarizado para el uso del ensayo cometa. En un portaobjetos se formó una capa delgada de agarosa de normal punto de fusión al 1,5% (Christofoletti *et al.*, 2009). En un "beaker" se vertió la agarosa líquida y se sumergió el portaobjetos unas 25 a 30 veces dejando un espacio de 30 seg en cada una y se deja secar a temperatura ambiente por 1 ½ - 2 h y luego se aplica sobre la primera capa la mezcla de 5 µL de sangre periférica de *D. rerio*. con 85 µL de agarosa de bajo punto de fusión al 0,5% (Christofoletti *et al.*, 2009). Luego se colocó un cubreobjetos sobre ella y llevar a 4 °C por 10 min. Pasado los 10 min se retiró del portaobjetos la laminilla cubreobjetos y se agregó 85 µL de agarosa de bajo punto de fusión 0,5% (Christofoletti *et al.*, 2009), se colocó una laminilla cubreobjetos y se llevó a 4 °C por 10 min. Luego las láminas fueron cubiertas en una solución de lisis constituida por 2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris pH10, 20 ml DMSO y 1 ml Tritón X-100 por 1h y media a 4°C en oscuridad. Al finalizar, las láminas son extraídas y lavadas con una solución de electroforesis; Dejándose secar. Después se colocaron las láminas en una placa Petri con solución de denaturación

(NaOH 300mM y EDTA 1mM, pH 12) durante 20 min en oscuridad y a 4°C, al término del tiempo las láminas son puestas en la cámara electroforética oscura con solución de electroforesis por 20 min, 21 V. y 270 mA. Estas son lavadas con 3 ml de solución de neutralización: 0,4M Tris-HCl, pH 7,5 durante cinco min; dejándose secar las láminas por 20 min. Se sumergen las láminas en etanol absoluto por 10 min para fijar y al terminar el tiempo se dejan secar por 20 min. La solución de 0,25 % de Nitrato de plata, 40 µL/100 mL de formaldehído 37% y agua destilada, penetra en la célula y tiñe el núcleo. Las láminas fueron cubiertas con la solución de nitrato de plata por 15 min hasta observar oscurecimiento de la lámina. Luego fueron enjuagadas con agua destilada y se dejaron secar por 20 min. Al observar en el microscopio las células tienen apariencia de cometas con una cabeza en la región nuclear y una cola que contiene los fragmentos o roturas que migran en dirección del ánodo en las láminas. Finalmente, estas fueron ser observadas a un aumento de 400x para su conteo y fotografiado.

Consideraciones éticas

Los experimentos se realizaron de acuerdo con todos los protocolos de bioseguridad en el laboratorio de Genética y

Reproducción animal de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas de la UNFV dado por la ASOPEBAID (2017). En el presente trabajo se empleó el principio de las 3Rs. Estos principios han sido incorporados de una manera responsable en las prácticas del presente trabajo. Los peces vivos fueron mantenidos en un ambiente de laboratorio con todas las medidas tomadas para un normal desarrollo de los individuos. Las condiciones ambientales fueron controladas en un sistema de soporte total bajo una recirculación total del agua dulce (25-28°C, pH 7), se usó una misma dieta *ad libitum* con una iluminación de 14 h y control de la calidad de agua (°dH entre 3,35 y 4,2). Para el sacrificio se consideró una concentración de 60 mg/L de la solución de eugenol en el agua para ocasionar la muerte del animal a los 10 min con la pérdida completa de los reflejos e ingreso a estado de inconciencia (Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio, 2017).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El valor de la CL_{50} a 96 h (95% de límites de confianza) fue $0,30 \text{ mg.L}^{-1}$ en el pez Cebra. Y fue hallada mediante el programa Probit (STATGRAPHICS Centurion XVIII, 2016). También se observaron los efectos de toxicidad en *D. rerio* en las primeras 24 h de exposición y luego de las 48 h de exposición no hay más variaciones.

Las distintas concentraciones del arsénico se muestran en la fig. 2 en la cual podemos destacar una relación del nivel de daño y tipos de cometas acorde con la concentración mostrando también unos resultados alentadores por el nivel de sensibilidad de la técnica ensayo cometa que permite exponer al *D. rerio* a muy bajas concentraciones de exposición. Se desarrolló la tabla inversa de predicciones con los porcentajes más relevantes con su respectiva concentración con un límite de confianza de la CL_{50} inferior a 95,0% y una CL_{50} superior a 95,0%.

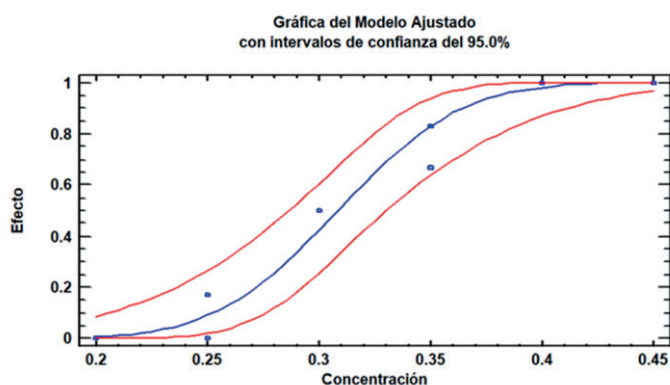


Figura 2. Grafica del modelo ajustado con intervalos de confianza del 95% entre efecto y concentración del arsénico en el pez cebra.

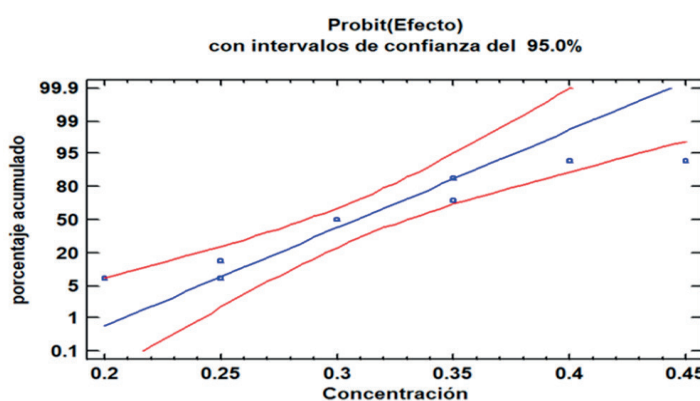


Figura 3. Modelo de regresión Probit para describir la relación entre porcentaje acumulado y Concentración del arsénico en el pez cebra.

La CL_{50} del arsénico ($0,30 \text{ mg.L}^{-1}$) se diluyó a la mitad (1/2), un quinto (1/5) y un décimo (1/10). La frecuencia está relacionada al grado de toxicidad es decir de acuerdo con la prevalencia de un tipo de cometa podemos

inferir la concentración a la que han sido expuestos los eritrocitos del pez cebra, siendo la más frecuentes la del tipo 4 en la concentración $0,30 \text{ mg.L}^{-1}$ con un total de 41 cometas. Pero esta frecuencia del tipo 4 decrece a

sólo 29 en la concentración de 0,15 mg.L⁻¹, a 18 a 0,06 mg.L⁻¹ y a 5 en 0,03 mg.L⁻¹. El tipo 1 es más frecuente entre las concentraciones 0,15 mg.L⁻¹ y 0,03 mg.L⁻¹. La del tipo 2 resulto ser más abundante en la concentración

de 0,30 mg.L⁻¹. Y la del tipo 3 fue más abundante en la concentración 0,03 mg.L⁻¹. Estos resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Tabla de Predicciones Inversas para Concentración del arsénico en el pez cebra.

Tipo de cometa	Concentración				
	0,30 mg.L ⁻¹	0,15 mg.L ⁻¹	0,06 mg.L ⁻¹	0,03 mg.L ⁻¹	Control
0	21	18	13	26	8
1	14	22	24	23	4
2	15	10	8	7	0
3	13	8	5	19	0
4	41	29	18	5	0

La mortalidad de acuerdo con la concentración se muestra desde las 24 a las 96 h de exposición teniendo

una tendencia muy regular luego de las 24 h (Fig. 4

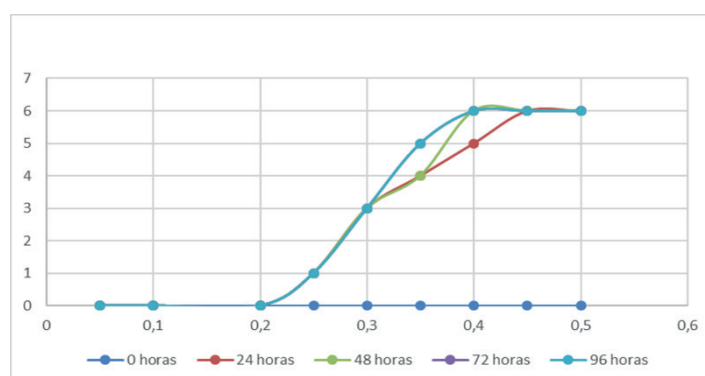


Figura 4. Mortalidad en el pez cebra *versus* la concentración del arsénico expresada en mg.L⁻¹.

Se utilizó la data en base de las cometas observadas en cada concentración, para la cual, se sacrificó un pez por cada repetición, las búsquedas de cometas se realizaron

mediante el análisis y observación en el microscopio óptico en un aumento total de 400X.

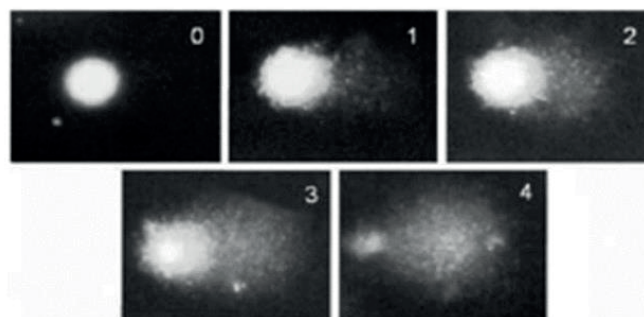


Figura 5. Categorización del daño en las cometas por el arsénico. Nivel de daño de acuerdo con la longitud de la cola: 0/ sin daño, 1/ daño leve, 2/daño moderado, 3/ daño alto, 4/daño grave, visualización de cometas con fluorescencia (Kumaravel *et al.*, 2009).

A continuación, se muestra fig. 6 el cual se muestra los diferentes tipos de cometas encontradas en este trabajo,

así como el nivel de daño.

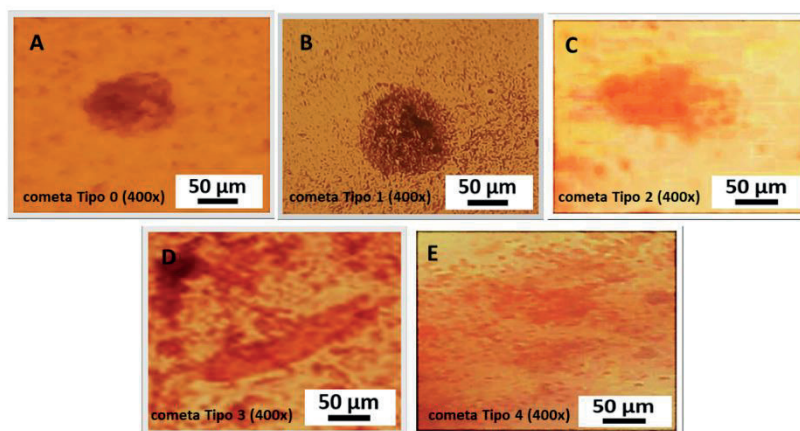


Figura 6. Cometas halladas con todos los niveles de daño por arsénico. (A) cometa tipo 0 abundante en el control y no muestra daño, (B) Cometa tipo 1 el cual muestra un daño ligero, (C) Cometa tipo 2 con daño medio, (D) Cometa tipo 3 con daño severo y (E) Cometa tipo 4 con daño grave y destrucción total del ADN.

La alta sensibilidad de los peces como modelo animal y bioindicadores con una altísima capacidad de acumular sustancias tóxicas responden a muy bajas concentraciones de las mismas (Gustavino *et al.*, 2001), Además el daño causado en los eritrocitos afecta otros tejidos como el sistema nervioso que conlleva a efectos severos en el comportamiento y la locomoción siendo indicadores de genotoxicidad (Ergene *et al.*, 2007; Tanguay, 2018; Cassar *et al.*, 2019; Canedo & Rocha, 2021).

En este estudio, se utilizó el pez cebra como un modelo animal viable y alternativo en la exposición al As. El estudio actual demostró el potencial de la exposición al As para generar a nivel celular destrucción del ADN de acuerdo con la concentración. Como resultado pudimos comprobar que el efecto tóxico del As en los eritrocitos era evidente de acuerdo con la concentración de As siendo el daño mayor a nivel celular y esto se fue evidenciando con los diversos tipos de cometas encontrados. Los valores de CL_{50} encontrado en el pez cebra fue de $0,30 \text{ mg.L}^{-1}$. En relación con los tipos de cometas encontrados, las frecuencias registradas entre las 24 a 96 h de tratamiento con la concentración de $0,30 \text{ mg.L}^{-1}$ fueron significativamente mayores para el tipo 4 (daño grave) mostrando una destrucción total del ADN. La mortalidad fue marcada directamente por dos variables, la concentración y por el tiempo de exposición obteniéndose que en concentraciones mayores al $0,45 \text{ mg.L}^{-1}$ todos los individuos morían a las 24 h. Sin embargo, dicha mortalidad se reduce a medida que la concentración disminuye. Luego de hallar la CL_{50} el cual

implica que es la concentración por la cual solo el 50% de los individuos muere sin cambiar esta tendencia por el tiempo de exposición.

La frecuencia está relacionada al grado de toxicidad sugiere que está directamente relacionado a la concentración, siendo los más frecuentes en el tipo 0 en el grupo de control indicando que no hay daño alguno. En el grupo expuesto a $0,30 \text{ mg.L}^{-1}$, las células presentaron una frecuencia mucho más alta de cometas del tipo 4 evidenciando un daño severo comprobando que nuestros resultados son similares al de otros proyectos en el cual se hallaron efectos similares en otros animales modelo (Hallauer *et al.*, 2016).

En el resto de las concentraciones se hallaron fases intermedias observando los otros tipos de cometa 0, 2 y 3, evidenciando un daño a diversos niveles tal como reportan otros trabajos no solamente con el efecto del arsénico sino también estudios en los efectos de otras sustancias. Al $1/10$ de la CL_{50} , es decir a $0,03 \text{ mg.L}^{-1}$ es más frecuente el tipo de cometa 0 pero se observaron todos los niveles incluyendo el tipo 4 con una frecuencia baja.

En conclusión, los resultados obtenidos sugieren que la técnica del ensayo cometa es altamente sensible para el As y la gran versatilidad del pez cebra es muy útil para el estudio y análisis con genotóxicos permitiendo ampliar el conocimiento y entender el impacto en un organismo a nivel celular.

Author contributions: CRediT (Contributor Roles Taxonomy)

CSE= Carlos Scotto Espinoza

RCL = Ricardo Céspedes Lizarraga

HMG = Hugo Medina Gomez

Conceptualization: CSE, RCL, HMG**Data curation:** CSE, RCL**Formal Analysis:** RCL, HMG**Funding acquisition:** CSE, RCL, HMG**Investigation:** CSE, RCL, HMG**Methodology:** CSE, RCL, HMG**Project administration:** CSE, RCL**Resources:** CSE, RCL, HMG**Software:** RCL, HMG**Supervision:** CSE, RCL**Validation:** CSE, RCL, HMG**Visualization:** CSE, RCL, HMG**Writing – original draft:** CSE, RCL**Writing – review & editing:** CSE, RCL, HMG**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ASOPEBAID, Asociación para el empleo y bienestar animal en la investigación y docencia del Perú (2017). <https://asopebaid.org.pe/>

Barch, M. J., Knutsen, T. & Spurbeck, J. L. (1997). *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. Lippincott-Raven. Tercera Ed.

Canedo, A., & Rocha, T. L. (2021). Zebrafish (*Danio rerio*) using as model for genotoxicity and DNA repair assessments: Historical review, current status and trends. *The Science of the total environment*, 762, 144084.

Cavas, T., & Ergene-Gozukara, S. (2005). Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. *Environment Molecular Mutagen*, 46, 64–70.

Cassar, S., Adatto, I., Freeman, J. L., Gamse, J. T., Iturria, I., Lawrence, C., Muriana, A., Peterson, R.T., Van Cruchten, S., & Zon, L. I. (2019). Use of zebrafish in drug discovery toxicology. *Chemical research in toxicology*, 33, 95-118.

Christofoletti, C. A., David, J. A. O., & Fontanetti, C. S. (2009). Application of the comet assay in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* (Pisces):

A methodological comparison. *Genetics and Molecular Biology*, 32, 155-158.

Da Silva-Souza, T., & Fontanetti, C.S., (2006). Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutations Research*, 605, 87–93.

Ergene, S., Çavaş, T., Celik, A., Köleli, N., Kaya, F., & Karahan, A. (2007). Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. *Ecotoxicology*, 16, 385-391.

Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (2017). *Comité para la Actualización de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio*. Institute for Laboratory Animal Research Division on Earth and Life Studies. Ediciones UC.

Gustavino, B., Scornajenghi, K.A., Minissi, S., & Ciccotti, E. (2001). Micronuclei induced in erythrocytes of *Cyprinus carpio* (teleostei, pisces) by X-rays and colchicine. *Mutation Research*, 494, 151-159.

Guzmán-Delgado, N. E., Carranza-Torres, I. E., Delgado-Aguirre, H., Zambrano-Ortíz, J. O., & Morán-Martínez, J. (2021). Transgenerational effects in DNA methylation, genotoxicity and reproductive phenotype by chronic arsenic exposure. *Scientific reports*, 11, 8276.

Hallauer, J., Geng, X., Yang, H. C., Shen, J., Tsai, K. J., & Liu, Z. (2016). The effect of chronic Arsenic exposure in zebrafish. *Zebrafish*, 13, 405–412.

Kumaravel, T.S., Vilhar, B., Faux, S.P., Jha, A.N. (2009). Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biology and Toxicology*, 25, 53-64.

Nava-Rivera, L. E., Betancourt-Martínez, N. D., Lozoya-Martínez, R., Carranza-Rosales, P., Guzmán-Delgado, N. E., Carranza-Torres, I. E., Delgado-Aguirre, H., Zambrano-Ortíz, J.O., & Morán-Martínez, J. (2021). Transgenerational effects in DNA methylation, genotoxicity and reproductive phenotype by chronic arsenic exposure. *Scientific reports*, 11, 8276.

- Pandrangi, R., Petras, M., Ralph, S., & Vrzoc, M. (1995). Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. *Environmental and molecular mutagenesis*, 26, 345-356.
- Ramírez, P., & Mendoza, A. (2008). *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas de suelo y agua*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat), Instituto Nacional de Ecología, México, D.F., 428 p.
- Scotto, C., Rondón, R., & Arriola, C. (2019). Determinación de la concentración letal media (CL₅₀) producida por el sulfato de cobre pentahidratado en diez especies de peces dulceacuícolas bioindicadores utilizados en el Perú. *Ciencia y Desarrollo*, 22(4), 49-57.
- STATGRAPHICS Centurion XVIII (2016). *Programa estadístico Probit*, www.statgraphics.net
- Tanguay, R. L. (2018). The rise of zebrafish as a model for toxicology. *Toxicological Sciences*, 163, 3-4.

Received February 19, 2023.

Accepted April 10, 2023.