

Efectos agudos de fenantreno y benzo[a]pireno en *Aequidens metae* (Pisces: Cichlidae)

Acute effects of phenanthrene and benzo[a]pyrene in *Aequidens metae* (Pisces: Cichlidae)

Yohana María Velasco-Santamaría*, Jessica Cardenas-Camacho**, Manuel Mauricio Peñuela-Díaz***, Dumar Alexander Jaramillo-Hernández****, Wilson Corredor-Santamaría*****

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v26n1.101879

RESUMEN

Los organismos acuáticos pueden estar expuestos a efluentes industriales que con frecuencia contienen hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs). Muchos de sus efectos pueden pasar desapercibidos, por lo que, la valoración de biomarcadores permite evaluar los riesgos que pueden generar daños a la salud asociados a su metabolismo. Se evaluaron distintos biomarcadores en *Aequidens metae* expuesto a HAPs. Se utilizaron adultos de $6,3 \pm 1,2$ cm y $5,5 \pm 1,6$ g. Los peces fueron expuestos vía intraperitoneal a 1, 10 y 50 $\mu\text{g/g}$ de fenantreno (PHE), 0,1, 1; y 10 $\mu\text{g/g}$ de benzo[a]pireno (B[a]P) y 50 $\mu\text{g/g}$ β -naftoflavona. Se realizaron muestreos a los 0, 3 y 10 días. Se tomaron muestras de hígado y sangre periférica para su procesamiento. Se evaluó la actividad 7-etoxiresorufina-O-deetilasa (EROD), histometría de hepatocitos y frecuencia de micronúcleos y otras anomalías en sangre. Encontrando incremento en la actividad EROD al día 3 de exposición para B[a]P de 10 $\mu\text{g/g}$ ($11,82 \pm 2,27$ pmol/mg/min) y BNF ($9,11 \pm 3,04$ pmol/mg/min) con relación al control negativo ($p < 0,05$). También, se presentó respuesta tisular y genotóxica con PHE, B[a]P y BNF a las concentraciones medias y altas. Podemos concluir que, bajo las condiciones de este estudio, benzo[a]pireno es un fuerte inductor que activa la vía de biotransformación de CYP1A en comparación a PHE, además que la actividad EROD, las anomalías nucleares y las características histométricas de los hepatocitos son dependientes del tiempo de exposición, la concentración del HAP y de las características del inductor en *A. metae*.

Palabras clave: Ecotoxicología, EROD, Genotoxicidad, HAP, Histometría.

ABSTRACT

Aquatic organisms may be exposed to industrial effluents that often contain polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Many of their effects may go unnoticed, therefore, the assessment of biomarkers allows the evaluation of the risks that may generate health damage associated with their metabolism. Different biomarkers were evaluated in *Aequidens metae* exposed to PAHs. Adults of $6,3 \pm 1,2$ cm and $5,5 \pm 1,6$ g were used. Fish were exposed intraperitoneally to 1, 10 and 50 $\mu\text{g/g}$ phenanthrene (PHE), 0,1, 1; and 10 $\mu\text{g/g}$ benzo[a]pyrene (B

* PhD en Biología. Grupo de investigación en Biotecnología y Toxicología Acuática y Ambiental-BioTox, Escuela de Ciencias Animales, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Col, email: ymvelascos@unillanos.edu.co, <https://orcid.org/0000-0002-6845-1663>.

** Bióloga. Grupo de investigación en Biotecnología y Toxicología Acuática y Ambiental-BioTox, Escuela de Ciencias Animales, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Col, email: jessica.cardenas@unillanos.edu.co, <https://orcid.org/0000-0001-9671-6609>.

*** Biólogo. Grupo de investigación en Biotecnología y Toxicología Acuática y Ambiental-BioTox, Escuela de Ciencias Animales, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Col, email: manuel.penuela@unillanos.edu.co, <https://orcid.org/0000-0002-9067-4839>.

**** Doctor en Inmunología. Escuela de Ciencias Animales, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Col, mail: dumar.jaramillo@unillanos.edu.co, <https://orcid.org/0000-0003-1377-1747>.

***** Doctor en Ciencias Biológicas. Grupo de investigación en Biotecnología y Toxicología Acuática y Ambiental-BioTox, Escuela de Ciencias Animales, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Col, email: wcorredor@unillanos.edu.co, <https://orcid.org/0000-0003-3155-5458>.

[a]P) and 50 µg/g β-naphthoflavone. Sampling was performed at 0, 3 and 10 days. Liver and peripheral blood samples were taken for processing. 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity, hepatocyte histometry and frequency of micronuclei and other abnormalities in blood were evaluated. We found an increase in EROD activity at day 3 of exposure for B[a]P of 10 µg/g ($11,82 \pm 2,27$ pmol/mg/min) and BNF ($9,11 \pm 3,04$ pmol/mg/min) in relation to the negative control ($p < 0.05$). Also, tissue and genotoxic response was presented with PHE, B[a]P and BNF at medium and high concentrations. We can conclude that, under the conditions of this study, B[a]P is a strong inducer that activates the CYP1A biotransformation pathway compared to PHE, furthermore, EROD activity, nuclear abnormalities and histometric characteristics of hepatocytes dependent on exposure time, PAH concentration and the PAH characteristics in *A. metae*.

Keywords: Ecotoxicology, EROD, Genotoxicity, PAH, Histometry.

Recibido: febrero 23 de 2023

Aprobado: mayo 15 de 2024

INTRODUCCIÓN

La industria petrolera, ha contribuido con el desarrollo económico de muchos países desde finales del siglo XIX hasta el presente (Craig *et al.*, (2018)), y desde hace muchas décadas los combustibles fósiles como los hidrocarburos (petróleo y gas) y carbono, se convirtieron en un recurso no renovable fundamental para la sociedad (Speight, 2020). Asimismo, diversos estudios demuestran su impacto subletal, con implicaciones ecológicas que son desconocidas en especies acuáticas (Calderón-Delgado *et al.*, 2019; Corredor-Santamaría *et al.*, 2019), ya que la degradación de los componentes tóxicos de los combustibles derivados del petróleo puede generar metabolitos solubles en agua, que consiguen tener mayor toxicidad (Salvo *et al.*, 2016). Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), han sido ampliamente descritos como contaminantes importantes del medio ambiente por sus propiedades fisicoquímicas que los convierten en sustancias tóxicas muy estables, persistentes y perjudiciales para el medio acuático (Haritash & Kaushik, 2009).

Para la mayoría de los organismos acuáticos, los HAPs de bajo peso molecular formados por dos o tres anillos aromáticos como el naftaleno y el fenantreno (PHE), respectivamente, presentan una alta toxicidad aguda, genotoxicidad y un bajo potencial carcinogénico (Manzetti, 2013). Sin embargo, compuestos de alto peso molecular, que van desde cuatro o más anillos como el benzo[a]pireno (B[a]P), presentan una baja toxicidad aguda, pero un mayor potencial carcinogénico (Costa *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2018). Los organismos pueden absorber estos contaminantes orgánicos (Almeda *et al.*, 2013). Los peces pueden metabolizar estos compuestos, a su vez los metabolitos reaccionan con moléculas intracelulares como el ADN desencadenando procesos de oxidación, es por ello, que la toxicidad de los HAPs es dependiente de sus formas secundarias y de la generación de las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Peters *et al.*, 1996). Debido al predominio de los hidrocarburos en la composición del petróleo, son utilizados como indicadores de contaminación ambiental (Correia *et al.*, 2007).

Los biomarcadores se han empleado en estudios y programas de monitoreo para determinar la biotransformación de xenobióticos en peces (Van der Oost *et al.*, 2003). Bioquímicamente, la mayoría de estas respuestas provienen del hígado, órgano que contiene una variedad de enzimas de biotransformación, como el glutatión S-transferasa (GST), superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y las citocromo P 450, entre otras, utilizadas para evaluar cambios en el metabolismo. Por ejemplo, la actividad 7-etoxiresorufina-O-deetilasa (EROD) es una actividad enzimática de la subfamilia CYP1A, que participa en las reacciones de catálisis en la fase I del metabolismo, por lo que es un biomarcador común y ampliamente empleado para detección de HAPs y otros compuestos planares (Van der Oost *et al.*, 2003; Santana *et al.*, 2018). Igualmente, los estudios a nivel histológico han evidenciado cambios en la estructura y composición como respuesta a la exposición a xenobióticos (Raibeemol & Chitra, 2020) y estos van acompañados de respuestas bioquímicas o genéticas, dado que la respuesta de un solo tipo de biomarcador puede no dar resultados concluyentes (Esmailbeigi *et al.*, 2021).

En especies ícticas como *Fundulus heteroclitus* y *Anguilla anguilla* se han reportado efectos de genotoxicidad asociados al daño en el ADN como consecuencia de la unión covalente de los metabolitos de B[a]P con el ADN, con formación de aductos (Nogueira *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2009). En estudios *in situ*, se ha reportado que aguas con presencia de PHE y otros HAPs se asociaron con la disminución del recuento de eritrocitos y linfocitos, concentración de hemoglobina y porcentaje de hematocrito, y con el aumento del recuento de trombocitos y neutrófilos en *Aequidens metae* Eigenmann (Corredor-Santamaría *et al.*, 2016).

A. metae en un pez cíclido endémico del río Meta en la cuenca del río Orinoco, Colombia, que por sus características de sus hábitos alimentarios (omnívora), tamaño pequeño, con ciclos reproductivos dinámicos y que habita en cuerpos de agua con presencia de contaminación se considera una especie indicada para ser bioindi-

cadora de contaminación (Corredor-Santamaría *et al.*, 2021; Pahí-Rosero and Velasco-Santamaría, 2022); que al igual que sus congéneres *Aequidens*, es una especie apetecible en la pesca de uso ornamental y de consumo (DoNascimento *et al.*, 2018). *A. metae* habita el río Meta, uno de los departamentos con mayor producción de petróleo, convirtiéndose en los últimos años en una especie de interés para el estudio de biomarcadores de perturbación endocrina (Velasco-Santamaría and Navarro-Martin, 2014) y estudios de evaluación de alteración bioquímica e histológica como indicador de contaminación de fuentes hídricas (Corredor-Santamaría *et al.*, 2019; Corredor-Santamaría *et al.*, 2021). Por lo que sería importante profundizar en el estudio de esta especie a nivel de laboratorio con respecto a la exposición a hidrocarburos. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar a partir de biomarcadores bioquímicos e histológicos la respuesta de *A. metae* ante la exposición aguda de concentraciones conocidas de hidrocarburos aromáticos policíclicos en tejido hepático y sanguíneo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Concentraciones de HAPs

Se utilizaron dosis subletales de PHE y B[a]P. Las dosis fueron seleccionadas de acuerdo con ensayos preliminares y reportes en la literatura para otras especies de carácidos como *Oreochromis niloticus* y *Prochilodus lineatus* (Costa *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2018). Para este experimento se emplearon concentraciones de 0,1, 1 y 10 µg/g para B[a]P y de 1, 10 y 50 µg/g para PHE. Además, se utilizó como hidrocarburo modelo β-naftoflavona (BNF) de 50 µg/g y aceite de canola como vehículo y control solvente (Corredor-Santamaría *et al.*, 2023).

Peces

Se utilizaron especímenes adultos de *A. metae* (Pisces: Cichlidae) de 6,3±1,2 cm y 5,5±1,6 g, clínicamente sanos (aletas definidas, ausencia de úlceras, manchas, hemorragias, ojos claros y sin abultamientos); obtenidos del Caño El Cajui ubicado a 4°05'23.46" N, 73° 35'79.15" O, alejado de centros urbanos, en el departamento del Meta, Colombia, con precipitación media anual entre los 2000 a 6000 mm y temperatura que oscila entre los 18 y 26 °C (IDEAM, 2018).

Diseño experimental y mantenimiento de peces

Previo a los experimentos, los peces se aclimataron a las condiciones de laboratorio, durante un periodo de 7 días en acuarios de vidrio de 20 L en la unidad de bioensayos del laboratorio de Toxicología y Biotecnología de la Universidad de los Llanos, se emplearon 12 peces por tratamiento distribuidos aleatoriamente, 9 tratamientos con tres réplicas cada uno. La vía de exposición fue in-

yección intraperitoneal, con muestreos a los 0, 3 y 10 días. Se realizó un sistema semi-estático con recambio de agua del 50 % día de por medio en todos los acuarios, los peces fueron alimentados dos veces al día (en la mañana 8-9 am y tarde 4-5 pm) al 3% de peso; así como toma de parámetros fisicoquímicos (nitritos, amonio, oxígeno disuelto, pH y temperatura). Los individuos se anestesiaron con 2-fenoxietanol disueltos en agua (400 µL/L) en el momento de la exposición (inyección) y en los días de la toma de muestras. Después del proceso de exposición los animales fueron reanimados por oxigenación directa, que consistió en colocar los ejemplares directamente al lado de la piedra difusora de la oxigenación en el agua hasta que este recuperara el eje de nado, para ser devueltos a los acuarios. En cada uno de los muestreos, los animales fueron anestesiados siguiendo la metodología previamente enunciada e insensibilizados a través de corte medular. Posteriormente se realizó una incisión de forma transversal en el borde ventral, anterior al ano, entre este y las aletas pélvicas, posteriormente se realizan dos cortes, el primero en la pared abdominal en dirección craneal hasta la línea de la branquia y el segundo desde la incisión inicial en dirección cráneo-dorsal (parábola semicircular) hasta llegar al opérculo para realizar el corte de la pared dorsolateral de la musculatura que cubre la cavidad abdominal, y por último se unieron estos cortes para visualizar los órganos (ventana de observación). Se extrajo el tejido hepático y fue dividido en viales, una alícuota se conservó en vapores de nitrógeno líquido (-80 °C), mientras que la otra se mantuvo en formaldehído tamponado al 4%, hasta su procesamiento en el laboratorio mencionado. Todos los procedimientos que implicó el manejo de animales se llevaron a cabo siguiendo los estándares y procedimientos para el uso de animales de laboratorio aprobados por el comité de Bioética de la Universidad de los Llanos.

Análisis de la actividad EROD

La medición de la actividad EROD se realizó según la metodología propuesta por Valdehita *et al.* (2012), con adaptaciones realizadas por el grupo de investigación BioTox. Se tomaron aproximadamente 100 mg de hígado, se homogeneizó con pistilos a 4 °C en 1 mL de tampón de homogeneización (tampón con inhibidores de proteasas + EDTA 1 mM, sacarosa 0,25 M, KCl 150 mM y glicerol al 20 %), se centrifugó a 6000 y 16000 gravedades durante 10 min y 60 min, respectivamente. El sedimento resultante se suspendió en tampón de homogeneización y se midió el contenido de proteína según Burke *et al.* (1974). Se realizó una curva estándar con resorufina de 0 a 100000 pmol/pocillo durante una cinética de 30 min y una curva de albúmina de suero de bovino (BSA). Las mediciones de fluorescencia se ejecutaron en un espec-

trofotómetro de microplaca (CYTATION 3, BioTek) en placas transparentes de 96 pozos (excitación 580 nm y emisión 532 nm) expresando los valores como pmol de resorufina/min/mg de proteína.

Histometría

La porción de tejido hepático fue fijada en formaldehído tamponado al 4% (pH 7,2) durante cinco días a 4 °C, posteriormente, fue deshidratada utilizando concentraciones crecientes de etanol (70-100 %) para realizar su inclusión en parafina (MERCK®, punto de fusión 52-54 °C), y posterior corte a 3 µm con micrómetro de rotación (SLEE Medical GmbH, Alemania). Por último, se realizó la tinción con hematoxilina y eosina (H&E). Para la visualización del tejido se utilizó un microscopio óptico (Zeiss), con captura de imagen a partir de cámara (AxiocamERC5s) adaptada al PC.

En 30 campos fotográficos por hígado de cada individuo se empleó una región de interés (ROI) de 10000 µm² con el fin de determinar los diámetros (µm) y el área (µm²) y el número de los núcleos de los hepatocitos (que corresponden al número de hepatocitos en el campo fotográfico observado). Para las mediciones se utilizó el software ImageJ (NIH versión 1.53, EE. UU.).

Respuesta de genotoxicidad

Se extrajo sangre periférica de cada pez de la vena caudal con jeringa heparinizada. Posteriormente, se realizó la tinción con Wright-metanol durante 10 minutos. La frecuencia de micronúcleos (MN) se determinó analizando 2000 eritrocitos maduros de cada pez y se expresó como el número total de MN por cada 1000 células. La frecuencia de MN y otras anomalías nucleares como eritrocitos con una pequeña invaginación de la membrana (blebbed), lobulados (lobed), con invaginación profunda (notched) y binucleados se evaluaron siguiendo los criterios de Grisolia *et al.* (2002), y Carrasco *et al.* (1990), respectivamente.

Análisis estadístico

Se realizó estadística descriptiva para expresar los resultados como media ± error estándar de la media (SEM). Se aplicaron las pruebas de Kolmogórov-Smirnov y de Levene's para comprobar los supuestos de normalidad y de homogeneidad de los datos, respectivamente. Al no cumplir los supuestos de normalidad, se realizó la transformación de los datos por raíz cuadrada (sqrt) y posteriormente, se aplicó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA), donde el factor 1 correspondía a la concentración del HAP y el factor 2 al tiempo de exposición (Wolińska *et al.*, 2013), con un pos-test de Tukey. Un valor de p<0,05 se utilizó como criterio para considerar diferencias estadísticas significativas. Los análisis estadísticos se realizaron con el software estadístico SAS v. 9.2 y GraphPad v.5.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parámetros fisicoquímicos

Se midieron los parámetros fisicoquímicos, no se encontraron diferencias significativas con el control negativo (nitritos 0,25±0,07 mg/L, amonio 0,56±0,16 mg/L, oxígeno disuelto (OD) 7,5±0,1 mg/L, pH 6,41±0,09 y temperatura 25,71±0,10 °C. Los valores registrados están en los rangos acordes a las especies de peces que habitan zonas del trópico que se reportan en otros estudios (Wunderlich *et al.*, 2015).

Actividad EROD

La actividad EROD registrada en *A. metae* durante el tiempo evaluado en este estudio tuvo un comportamiento variable tanto en dosis como en el tiempo de evaluación. A los 3 días de exposición se observó un aumento significativo (p<0,05) en el tratamiento de 50 µg/g de BNF (4,58 veces mayor al control negativo). Igualmente, se obtuvo respuesta en la concentración de 10 µg/g de B[a]P en comparación con el control negativo aumentando la inducción 5,94 veces el mismo día (Tabla 1). El

Tabla 1. Actividad EROD (pmol/min/mg de proteína) en *A. metae* sometidos a diferentes concentraciones de HAPs evaluados a los 3 y 10 días de exposición. Los datos se expresan como la media ± el error estándar de la media (SEM).

Tratamiento	Día 0	Día 3	Día 10
Control Negativo	2,78±0,96	1,99±0,33 ^c	2,24±0,80
Control Solvente	---	3,00±0,49 ^{bc}	4,30±0,85
β-naftoflavona (µg/g)	50	9,11±3,04 ^{ab}	4,55±1,31
Benzo[a]pireno (µg/g)	0,1	2,69±0,11 ^{bc}	3,16±0,95
	1,0	4,90±0,96 ^{abc}	4,60±0,75
	10	11,82±2,27 ^{a*}	4,69±1,11
Fenantreno (µg/g)	1,0	3,54±0,86 ^{abc}	4,17±1,03
	10	5,15±2,02 ^{abc}	4,09±0,59
	50	5,00±1,58 ^{abc}	4,20±0,66

* Medias con diferencias significativas con respecto al control negativo basal (Día 0). ^{abc} Medias con superíndices diferentes indican diferencias significativas con respecto al control negativo, para un mismo tiempo de muestreo.

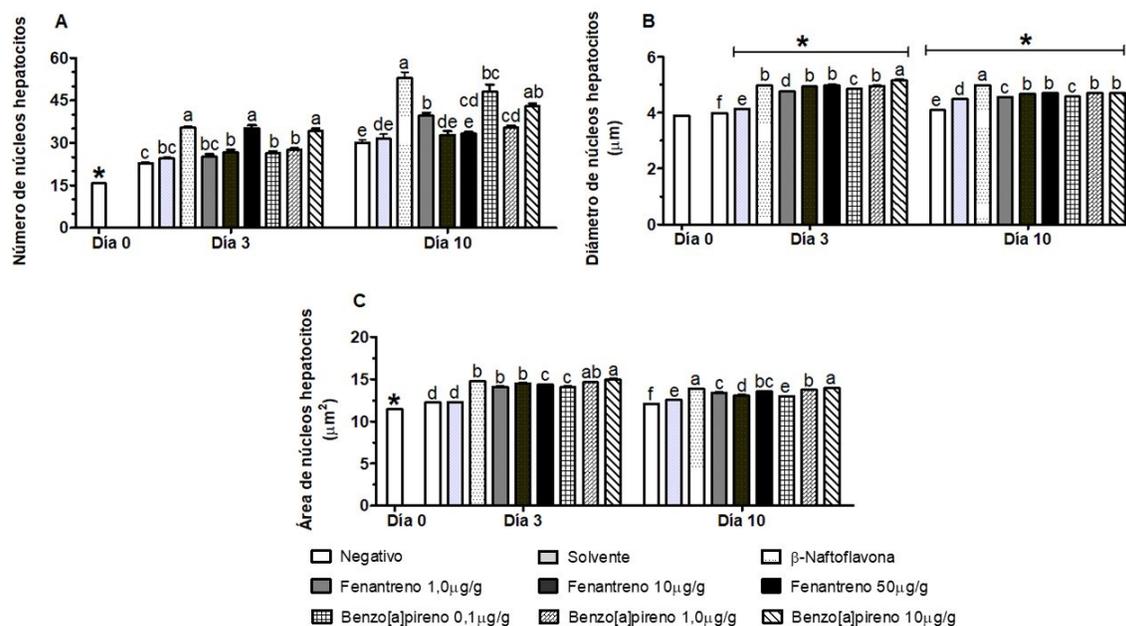


Figura 1. Evaluación histométrica de *A. metae* expuesta a B[a]P, PHE y BNF por 10 días. A) Número de núcleos de hepatocitos; B) diámetro de núcleos de hepatocitos (μm); C) área de núcleos de hepatocitos (μm^2). * Barras con letras diferentes indican diferencias significativas en un mismo tiempo de muestreo, con respecto al control negativo basal (día 0).

aumento de la actividad EROD pasadas las 72 horas refleja la inducción del sistema CYP como mecanismo de biotransformación de compuestos xenobióticos que pueden ser fácilmente metabolizados por los peces o como es el caso de los HAP desencadenar la generación de metabolitos secundarios más tóxicos y generar efectos carcinogénicos (Shirmohammadi *et al.*, 2018). Una respuesta similar se evidencia en el aumento de la actividad EROD en el día 3 con respecto al control negativo basal (día 0), en peces expuestos a B[a]P 10 $\mu\text{g}/\text{g}$ (4,25 veces, $p=0,0030$) y β -naftoflavona (2,28 veces, $p=0,2630$). Aunque la respuesta de los peces expuestos a BNF no fue estadísticamente significativa, si refleja una alta tasa de metabolización en relación con los demás tratamientos. Estos hallazgos son similares a los reportados en otros estudios, donde se reportó un aumento de actividad EROD en concentraciones de 18 μg y 1800 $\mu\text{g}/\text{día}$ de B[a]P (Sadauskas-Henrique *et al.*, 2017), lo que indica que la actividad máxima de EROD es afectada por concentraciones críticas (altas) o por dosis no letales (dosis subletales-bajas). Aunque, hay que tener presente que se ha reportado respuesta a concentraciones menores de 10 $\mu\text{g}/\text{g}$ de B[a]P (Grimard *et al.*, 2020), este contraste en la respuesta de la actividad EROD, puede deberse a que el proceso de metabolización puede depender de la especie evaluada, en el momento de la transcripción de los genes diana y en última instancia de las proteínas de CYP1A responsables del metabolismo hepático de xenobióticos por la vía de señalización del

receptor de hidrocarburos de arilo (AhR), induciendo una mayor o menor respuesta a diferentes concentraciones (Incardona *et al.*, 2005).

Por el contrario, durante el mismo periodo de exposición no se observó inducción significativa con PHE, contrario a lo reportado en otras especies. Se puede inferir que la respuesta de los HAPs especialmente con compuestos que tienen menos de 4 anillos aromáticos fusionados en su estructura como fenantreno, naftaleno, entre otros y que se han definido como débiles inductores de la actividad EROD (Gagnon & Rawson, 2017), no es uniforme entre especies ni dentro de la misma especie. Específicamente, en este estudio la especie *A. metae* perteneciente a la familia Cichlidae, presenta respuestas diferentes entre especies relacionadas filogenéticamente, e.g. en *Oreochromis mossambicus* se observó un incremento en la respuesta de la actividad EROD a medida que aumentó la concentración de PHE, sin embargo, al compararlo con *Oreochromis niloticus*, esta especie presentó una inhibición de la actividad EROD en concentraciones más altas (Wenju *et al.*, 2009). Por lo tanto, la respuesta de *A. metae* puede ser el resultado de las variaciones intrínsecas en la afinidad del AhR de las especies de peces a compuestos HAPs de bajo peso molecular.

En contraste *A. metae* mostró un descenso al día 10 en la actividad EROD de BNF y B[a]P 10 $\mu\text{g}/\text{g}$, siendo estas dos las más evidentes (Tabla 1). Este comportamiento de

la actividad EROD, probablemente se debe a un punto máximo en el proceso de biotransformación en el hígado, siendo el tiempo de exposición un factor clave, ya que el metabolismo para asimilación y degradación de compuestos menos complejos es rápida, pero que también se produce una variación de una especie a otra, como lo sugieren distintos trabajos con resultados similares, encontrado que entre 2 a los 14 días después de la exposición hay una disminución en la actividad EROD regresando a niveles similares a los del tiempo cero (Banni *et al.*, 2009).

Histometría

El análisis histométrico reveló cambios significativos en el número de núcleos de hepatocitos (Figura 1a). El control negativo basal ($p < 0,05$) difiere de todos los grupos experimentales en los dos tiempos de muestreo (3 y 10 días), que puede ser indicativo del aumento de actividad metabólica ante el estrés por inyección de xenobióticos, incluyendo al vehículo (aceite de canola) usado en este estudio. En el día 3 de exposición tanto el control negativo como solvente presentan diferencias con las concentraciones más altas usadas de B[a]P 10 $\mu\text{g/g}$, PHE 50 $\mu\text{g/g}$ y BNF 50 $\mu\text{g/g}$, al igual que al día 10 para B[a]P 10 $\mu\text{g/g}$ y PHE. No obstante, se presenta el comportamiento opuesto para el día 10 donde las concentraciones bajas de B[a]P y PHE son las que muestran diferencias con el solvente y control negativo, exceptuando BNF que sigue la misma tendencia del tercer día.

Otra variable evaluada fue el cambio en el diámetro de los núcleos de hepatocitos, el cual tuvo un comportamiento similar al número de hepatocitos donde el control negativo basal fue significativamente menor comparado con los demás grupos, salvo por el tratamiento negativo del día 3 ($p = 0,82$). De igual modo, el área celular al estar relacionada con el diámetro de los núcleos de hepatocitos presentó el mismo comportamiento en

el día 3. Sin embargo, para el día 10 solamente el control negativo presenta esta tendencia, ya que el solvente no difiere de la concentración de B[a]P 0,1 $\mu\text{g/g}$ ($p = 1,0$) (Figura 1c).

Los cambios relacionados anteriormente (número, diámetro y área de núcleos de hepatocitos), en los diferentes tratamientos se relacionan considerablemente con los resultados obtenidos en la actividad EROD en donde los tratamientos con las dosis más altas tanto de B[a]P como de BNF ejercen un efecto directo en dicha variable, esta relación nos indica que efectivamente pasados tres días de inyección hay una alta tasa de metabolización de los compuestos, este comportamiento se encuentra reportado por Marcon *et al.* (2017). Así mismo, Corredor-Santamaría *et al.* (2021), además de relacionar esta respuesta con una mayor actividad metabólica, la correlaciona como una respuesta ante un estímulo estresante frente a condiciones adversas que en este caso estaría relacionada con la exposición a compuestos xenobióticos que desencadenan en el organismo de *A. metae* la activación de rutas de biotransformación y con ello procesos de detoxificación en donde se generan moléculas que interfieren con el metabolismo normal del organismo.

Genotoxicidad

La frecuencia de micronúcleos fue significativamente mayor en los peces expuestos a BNF y la concentración media y alta de PHE y B[a]P en el día 3 en comparación con la medición basal ($p < 0,05$), mientras que para el día 10 no hubo diferencias con la concentración media (1 $\mu\text{g/g}$) de B[a]P ($p > 0,05$). Para el décimo día se puede observar en la Figura 2a una disminución en la frecuencia de micronúcleos, pero aún persiste un aumento significativo en relación con el control solvente y negativo para las concentraciones más altas de B[a]P, PHE y BNF. Esta disminución en la frecuencia se puede deber a los procesos de reparación

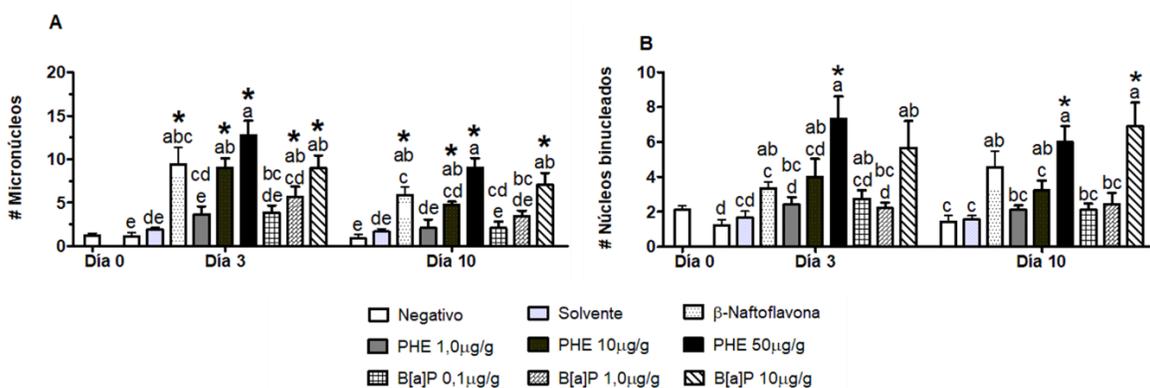


Figura 2. Respuesta de genotoxicidad en micronúcleos de *A. metae* expuesto a B[a]P, PHE y BNF por 10 días. A) Número de micronúcleos; B) Anormalidad nuclear binucleada. * Barras con letras diferentes indican diferencias significativas en un mismo tiempo de muestreo, con respecto al control negativo basal (Día 0).

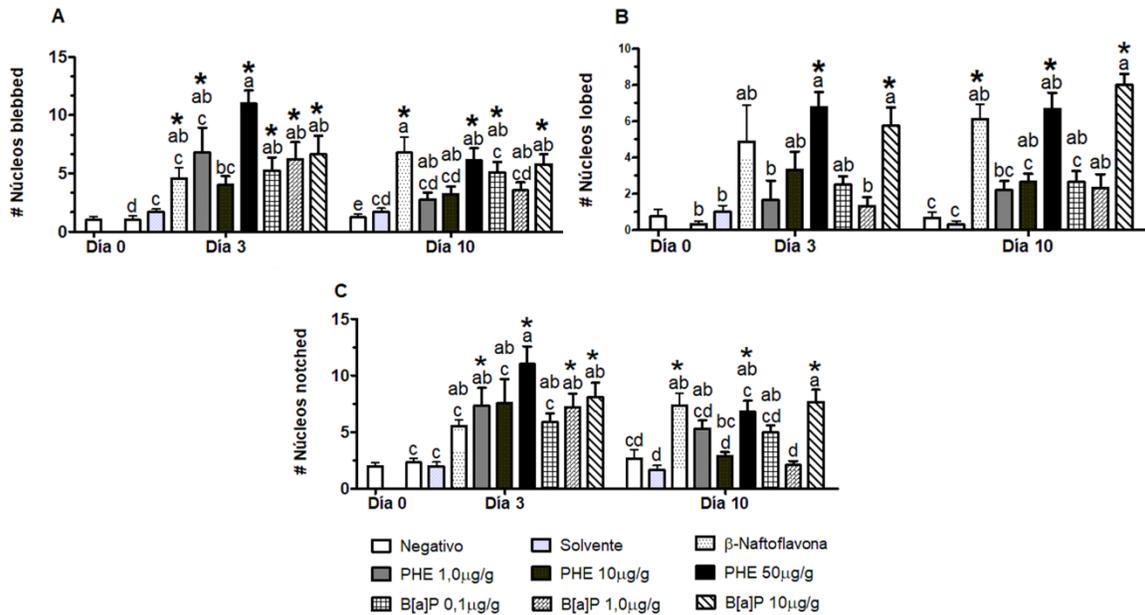


Figura 3. Respuesta de genotoxicidad en micronúcleos de *A. metae* expuesto a B[a]P, PHE y BNF por 10 días. A) Anormalidad nuclear blebbed; B) Anormalidad nuclear lobed, C) Anormalidad nuclear notched. * Barras con letras diferentes indican diferencias significativas en un mismo tiempo de muestreo, con respecto al control negativo basal (Día 0).

del ADN. Entre las anomalías nucleares se observaron núcleos blebbed, que tuvo una gran incidencia en todos los tratamientos si se compara con la medida basal del control negativo (día 0) ($p < 0,05$), para todas las concentraciones de B[a]P, concentración baja y alta de PHE y BNF en el tercer día. Para el día 10 disminuye, sin embargo, aún se presentan diferencias con BNF, PHE 50 µg/g y B[a]P de 0,1 y 10 µg/g.

Si bien, se esperaba que entre el control negativo y solvente no se presentaran diferencias, tanto para el día 3 y 10 estos fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$), y comparándolos, el control negativo presentó diferencias en todos los tratamientos a diferencia del solvente (Figura 3a). Tanto para día 3 como el día 10, la frecuencia de núcleos lobed fue mucho mayor en las concentraciones altas de PHE, B[a]P y BNF para el día 10, en comparación con el control negativo basal. A diferencia de la anterior anomalía, el control negativo y solvente de los días 3 y 10, no mostraron diferencias entre sí ($p > 0,05$). Se observó un aumento de la frecuencia en algunos tratamientos entre los días 3 y 10; lo cual indica que aun pasados los 10 días después de la exposición, estas anomalías persisten (Figura 3b).

De forma similar, los núcleos notched tuvieron una alta frecuencia en las concentraciones mayores de HAPs con relación al control basal negativo ($p < 0,05$) en todos los días de muestreo. Mientras que entre los tratamientos de un mismo día el control solvente y negativo pre-

senta el mismo comportamiento para el día 3, pero con una clara disminución para el día 10, excluyendo a BNF que aumentó su frecuencia para el día 10 (Figura 3c). Al igual que las dos últimas anomalías descritas, la frecuencia de núcleos binucleados aumentó con relación a las concentraciones más altas de los HAPs ($p < 0,05$), y se observó el mismo comportamiento para la dosis única de BNF utilizada entre el día 3 y la subsecuente depuración o metabolización del compuesto para el día 10 (Figura 2b).

La presencia, frecuencia y aumento de micronúcleos y otras anomalías nucleares en los eritrocitos de *A. metae* expuestos a la dosis de BNF, así como a dosis medias y altas de PHE y B[a]P, reflejan la compleja respuesta genotóxica (Salvo *et al.*, 2016), especialmente cuando se presenta una respuesta dosis dependiente. Respuestas similares han sido reportadas en estudios en *A. latus* (Shirmohammadi *et al.*, 2017), donde la frecuencia de micronúcleos aumentó paralelamente con las dosis de PHE suministradas. En el presente estudio no se observó una disminución en las variables de genotoxicidad a los 10 días de exposición, lo que permite inferir que el efecto de los HAPs en *A. metae* se mantiene a lo largo del tiempo generando una respuesta fisiológica. Bacolod *et al.* (2017) reportan que la correlación existente entre biomarcador y genotoxicidad evidencian un estrés oxidativo ocasionado por la acumulación del compuesto que puede generar daño en el ADN por aumento del estrés oxidativo, esto a causa de la oxida-

ción producida por los radicales libres entre estos las ERO, por medio de ataque a las bases nitrogenadas del ADN, lo que puede conducir a la alteración de la estructura y afectar la función del mismo; por medio de la rotura de una o de las dos hebras de ADN, lo que nuevamente lleva una alteración a su estructura; por medio de la inducción para la formación de productos secundarios de oxidación del ADN, que pueden afectar los procesos de replicación y reparación, lo que potencia el riesgo de mutaciones y por último en la inactivación de las enzimas que se involucran en la reparación del ADN, lo que conlleva todas estas opciones a la acumulación del daño en el ADN (Dizdaroglu *et al.*, 2002, p. 2).

En cuanto a lo relacionado con las alteraciones morfológicas registradas, los tratamientos de PHE y B[a]P ejercen un efecto genotóxico sobre el organismo de *A. metae*. Según Caramello *et al.* (2019) dichas anomalías morfológicas nucleares se presentan como resultado de interacción con contaminantes ambientales y químicos con acciones citotóxicas y mutagénicas; del mismo modo; Corredor-Santamaría *et al.*, (2012) consideran que dichas alteraciones pueden estar relacionadas con un efecto clastogénico ocasionado por PHE, sumado a esto el efecto de citotoxicidad producto del bloqueo de la citocinesis durante la división celular anormal, en donde se genera un desequilibrio genético celular el cual puede generar carcinogénesis.

CONCLUSIONES

La dosis única de 50 µg/g de BNF y 50 µg/g B[a]P generaron un aumento en los procesos de biotransformación que fueron evidenciados mediante la determinación de la actividad EROD hepática. Además de esto se evidencia que estos compuestos son inductores de genotoxicidad en adultos de *A. metae*. Aunque PHE no indujo un aumento significativo en la actividad EROD, si generó alteraciones histométricas de los hepatocitos y anomalías en micronúcleos en la mayor concentración. Por lo anterior, se sugiere evaluar el rango de dosis intermedias entre 1 y 10 µg/g para B[a]P, y dosis más altas de PHE con el fin de determinar su efecto en estos rangos, así como aumentar el tiempo de exposición y muestreos más frecuentes que permitan identificar con mayor claridad los procesos de regulación metabólica.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a los estudiantes y auxiliares de investigación del grupo de investigación BioTox por su valiosa participación durante los procedimientos de muestreo. Este estudio fue financiado por Colciencias, ANH y la Universidad de los Llanos a través del

proyecto No 112272151869, contrato 162-2016 "Convocatoria 721-2015 para la formación de recurso humano en Colombia en el área de hidrocarburos, a través de proyectos de investigación".

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeda, R., Wambaugh, Z., Wang, Z., Hyatt, C., Liu, Z., & Buskey, E. J. (2013). Interactions between Zooplankton and Crude Oil: Toxic Effects and Bioaccumulation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *PLOS ONE*, 8(6), e67212. doi:10.1371/journal.pone.0067212
- Bacolod, E. T., Uno, S., Villamor, S. S., & Koyama, J. (2017). Oxidative stress and genotoxicity biomarker responses in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to environmental concentration of 1-nitropyrene. *Marine Pollution Bulletin*, 124(2), 786-791. doi:https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.01.077
- Banni, M., Bouraoui, Z., Ghedira, J., Clerandau, C., Guerbej, H., Narbonne, J. F., & Boussetta, H. (2009). Acute effects of benzo[a]pyrene on liver phase I and II enzymes, and DNA damage on sea bream *Sparus aurata*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(2), 293-299. doi:10.1007/s10695-008-9210-9
- Burke, M. D., & Mayer, R. T. (1974). Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metabolism and Disposition*, 2(6), 583-588.
- Calderón-Delgado, I. C., Mora-Solarte, D. A., & Velasco-Santamaría, Y. M. (2019). Physiological and enzymatic responses of *Chlorella vulgaris* exposed to produced water and its potential for bioremediation. *Environmental Monitoring and Assessment*, 191(6), 399. doi:10.1007/s10661-019-7519-8
- Caramello, C., Cowper, C., Jorge, M., Pérez, J., & Jorge, L. (2019). Anomalías morfológicas nucleares en hematíes del pez *Prochilodus linneatus* expuesto al clorpirifos. *Revista veterinaria*, 30(2), 64-72.
- Carrasco, K. R., Tilbury, K. L., & Myers, M. S. (1990). Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ Biological indicator of Chemical Contaminant Effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47(11), 2123-2136. doi:10.1139/f90-237
- Corredor-Santamaría, W., Mora-Romero, C. C., Escobar-Buitrago, P. S., Cruz-Casallas, P. E., & Velasco-Santamaría, Y. M. (2012). Inducción de micronúcleos y otras anomalías nucleares en *Astyanax gr. bimaculatus* (Pisces: Characidae) expuestas a fenantreno. *Orinoquia*, 16, 237-247.
- Corredor-Santamaría, W., Serrano Gómez, M., & Velasco-Santamaría, Y. M. (2016). Using genotoxic and haematological biomarkers as an evidence of envi-

- ronmental contamination in the Ocoa River native fish, Villavicencio—Meta, Colombia. *SpringerPlus*, 5 (1), 351. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1753-0>
- Corredor-Santamaría, W., Mora-Solarte, D. A., Arbeli, Z., Navas, J. M., & Velasco-Santamaría, Y. M. (2021). Liver biomarkers response of the neotropical fish *Aequidens metae* to environmental stressors associated with the oil industry. *Heliyon*, 7(7), e07458.
- Corredor-Santamaría, W., Torres-Tabares, A., & Velasco-Santamaría, Y. M. (2019). Biochemical and histological alterations in *Aequidens metae* (Pisces, Cichlidae) and *Astyanax gr. bimaculatus* (Pisces, Characidae) as indicators of river pollution. *Science of the Total Environment*, 692, 1234-1241. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.187>
- Corredor-Santamaría, W., Calderón-Delgado, I. C., Arbeli, Z., Navas, J. M., & Velasco-Santamaría, Y. M. (2023). Acute effects on hepatic biomarkers in the freshwater native fish *Aequidens metae* exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Global Journal of Environmental Science and Management*, 9(1), 1-14. Scopus. <https://doi.org/10.22034/gjesm.2023.01.01>
- Correia, A. D., Gonçalves, R., Scholze, M., Ferreira, M., & Henriques, M. A.-R. (2007). Biochemical and behavioral responses in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to phenanthrene. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 347(1), 109-122. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jembe.2007.03.015>
- Costa, J., Ferreira, M., Rey-Salgueiro, L., & Reis-Henriques, M. A. (2011). Comparison of the waterborne and dietary routes of exposure on the effects of Benzo(a)pyrene on biotransformation pathways in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chemosphere*, 84 (10), 1452-1460. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.04.046>
- Craig, J., Gerali, F., MacAulay, F. & Sorkhabi, R. (2018). The history of European oil and gas industry (1600s-2000s). Geological Society, Special Publications, 465, 1-24. doi:<https://doi.org/10.1144/SP465.23>
- DoNascimento, C., Herrera Collazos, E., & Maldonado-Ocampo, J. A. (2019). Lista de especies de peces de agua dulce de Colombia/Checklist of the freshwater fishes of Colombia. Version 2.14. (Asociación Colombiana de Ictiólogos. Dataset/Checklist.
- Esmailbeigi, M., Kalbassi, M. R., Seyedi, J., Tayemeh, M. B., & Moghaddam, J. A. (2021). Intra and extracellular effects of benzo [α] pyrene on liver, gill and blood of Caspian White fish (*Rutilus frissi* kutum): Cytogenotoxicity and histopathology approach. *Marine Pollution Bulletin*, 163, 111942. doi:<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111942>
- Gagnon, M. M., & Rawson, C. A. (2017). Bioindicator species for EROD activity measurements: A review with Australian fish as a case study. *Ecological Indicators*, 73, 166-180. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.09.015>
- Grimard, C., Mangold-Döring, A., Schmitz, M., Alharbi, H., Jones, P. D., Giesy, J. P., . . . Brinkmann, M. (2020). *In vitro-in vivo* and cross-life stage extrapolation of uptake and biotransformation of benzo[a]pyrene in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology*, 228, 105616. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105616>
- Grisolia, C. K. (2002). A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 518(2), 145-150. doi:[https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00086-4](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00086-4)
- Haritash, A. K., & Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, 169 (1), 1-15. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.137>
- IDEAM. (2018). Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales, Atlas climatológico de Colombia. Bogotá (Colombia).
- Incardona, J. P., Carls, M. G., Teraoka, H., Sloan, C. A., Collier, T. K., & Scholz, N. L. (2005). Aryl Hydrocarbon Receptor-Independent Toxicity of Weathered Crude Oil during Fish Development. *Environmental Health Perspectives*, 113(12), 1755-1762. <https://doi.org/10.1289/ehp.8230>
- Jung, D., Cho, Y., Collins, L. B., Swenberg, J. A., & Di Giulio, R. T. (2009). Effects of benzo[a]pyrene on mitochondrial and nuclear DNA damage in Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) from a creosote-contaminated and reference site. *Aquatic Toxicology*, 95(1), 44-51. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.08.003>
- Manzetti, S. (2013). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Environment: Environmental Fate and Transformation. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 33(4), 311-330. <https://doi.org/10.1080/10406638.2013.781042>
- Marcon, L., Thomé, R. G., Mounteer, A. H., Bazzoli, N., Rizzo, E., & Benjamin, L. d. A. (2017). Immunohistochemical, morphological and histometrical analyses of follicular development in *Astyanax bimaculatus* (Teleostei: Characidae) exposed to an organochlorine insecticide. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 143, 249-258. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.05.029>
- Nogueira, P. R., Lourenço, J., Mendo, S., & Rotchell, J. M. (2006). Mutation analysis of ras gene in the liver of European eel (*Anguilla anguilla* L.) exposed to benzo[a]pyrene. *Marine Pollution Bulletin*, 52(12), 1611-1616. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.05.017>

- Pahí-Rosero, A., & Velasco-Santamaría, Y. (2022). Efecto del 17 α -etinilestradiol (EE2) como perturbador endócrino reproductivo en el pez. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 38, 249-259. <https://doi.org/10.20937/RICA.54038>
- Peters, L., O'hara, S., & Livingstone, D. (1996). Benzo [a] pyrene metabolism and xenobiotic-stimulated reactive oxygen species generation by subcellular fraction of larvae of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 114(3), 221-227.
- Raibeemol, K. P., & Chitra, K. C. (2020). Induction of immunological, hormonal and histological alterations after sublethal exposure of chlorpyrifos in the freshwater fish, *Pseudotroplus maculatus* (Bloch, 1795). *Fish & shellfish immunology*, 102, 1-12. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.04.005>
- Sadauskas-Henrique, H., Duarte, R. M., Gagnon, M. M., & Almeida-Val, V. M. F. (2017). Validation of a suite of biomarkers of fish health in the tropical bioindicator species, tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Ecological Indicators*, 73, 443-451. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.10.010>
- Salvo, L. M., Severino, D., Silva de Assis, H. C., & da Silva, J. R. M. C. (2016). Photochemical degradation increases polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) toxicity to the grouper *Epinephelus marginatus* as assessed by multiple biomarkers. *Chemosphere*, 144, 540-547. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.013>
- Santana, M. S., Sandrini-Neto, L., Filipak Neto, F., Oliveira Ribeiro, C. A., Di Domenico, M., & Prodocimo, M. M. (2018). Biomarker responses in fish exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Systematic review and meta-analysis. *Environmental Pollution*, 242, 449-461. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.004>
- Santos, C., de Oliveira, M. T., Cólus, I. M. d. S., Sofia, S. H., & Martinez, C. B. d. R. (2018). Expression of cyp1a induced by benzo(A)pyrene and related biochemical and genotoxic biomarkers in the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 61, 30-37. doi:<https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.05.008>
- Shirmohammadi, M., Salamat, N., Ronagh, M. T., Movahe-dinia, A., & Hamidian, G. (2017). Effect of Phenanthrene on the Tissue Structure of Liver and Aminotransferase Enzymes in Yellowfin Seabream (*Acanthopagrus latus*). *IJT*, 11(4), 33-41. <https://doi.org/10.29252/araku.11.4.33>
- Shirmohammadi, M., Salamat, N., Ronagh, M. T., Movahe-dinia, A., & Hamidian, G. (2018). Using cell apoptosis, micronuclei and immune alternations as biomarkers of phenanthrene exposure in yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*). *Fish & shellfish immunology*, 72, 37-47. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.10.039>
- Speight, J. (2020) Handbook of Industrial Hydrocarbon Processes.Sources of hydrocarbons. In: Speight JG (Second Edition). Boston (Estados Unidos) Gulf Professional Publishing, 45-93.
- Valdehita, A., Fernández-Cruz, M. L., Torrent, F., Sericano, J. L., & Navas, J. M. (2012). Differences in the induction of cyp1A and related genes in cultured rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Additional considerations for the use of EROD activity as a biomarker. *Journal of Fish Biology*, 81(1), 270-287. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2012.03338.x>
- Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2), 57-149. doi:[https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
- Velasco-Santamaría, Y., Navarro-Martin, L. (2014). Clonación y secuenciación del gen de la aromataasa cerebral (cyp19a1b) y gonadal (cyp19a1a) en *Aequidens metae* como biomarcador de perturbación endocrina (Villavicencio, Colombia, 2014). *Memorias, Villavicencio (Colombia)*, 103.
- Wenju, X., Yuanyou, L., Qingyang, W., Shuqi, W., Huai-ping, Z., & Wenhua, L. (2009). Effects of phenanthrene on hepatic enzymatic activities in tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂). *Journal of Environmental Sciences*, 21(6), 854-857. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62352-9](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62352-9)
- Wolińska, L., Brzuzan, P., Woźny, M., Łuczyński, M. K., & Góra, M. (2013). CYP1A expression in liver and gills of roach (*Rutilus rutilus*) after waterborne exposure to two phenanthrene derivatives, 1-methylphenanthrene and 4-methylphenanthrene. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(7), 1604-1610. doi:<https://doi.org/10.1002/etc.2225>
- Wunderlich, A. C., Silva, R. J., Zica, É. O. P., Rebelo, M. F., Parente, T. E. M., & Vidal-Martínez, V. M. (2015). The influence of seasonality, fish size and reproductive status on EROD activity in *Plagioscion squamosissimus*: Implications for biomonitoring of tropical/subtropical reservoirs. *Ecological Indicators*, 58, 267-276. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.05.063>