

UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS PUEBLA

Escuela de Ciencias

Departamento de Ciencias Químico-Biológicas



Caracterización histológica del erizo de mar *Diadema antillarum* afectado durante el evento de mortalidad masiva en 2022 en el Caribe

Tesis que, para completar los requisitos del Programa de Honores presenta el estudiante

Diego Barrera Del Angel

ID: 172088

Licenciatura en Biología

Director de Tesis

Alejandro Arias del Razo

Codirectora

Jenny Carolina Rodríguez Villalobos

San Andrés Cholula, Puebla.

Otoño 2024

Tesis que, para completar los requisitos del Programa de Honores presenta el estudiante
Diego Barrera Del Angel ID: 172088

Alejandro Arias del Razo

Director

Jenny Carolina Rodríguez Villalobos

Codirectora

Sinodales

Paul Michael Ramsay

Kenia López García

Tabla de contenido

Dedicatoria	4
Agradecimientos	5
Resumen	6
1. Introducción	8
2. Justificación	12
3. Marco Teórico	13
3.1 Ecología	13
3.2 Biología general	14
3.3 Histología	18
4. Antecedentes	20
5. Objetivo general y específicos	26
a. Objetivo general	26
b. Objetivos específicos	26
6. Hipótesis	27
7. Método	28
7.1 Área de Estudio	28
7.2 Trabajo de campo	29
7.3 Recolección de muestras	29
7.4 Procesamiento de muestras para histología	30
7.5 Frotis de heces	31
7.6 Análisis microscópico de las muestras	31
8. Resultados	33
8.1 Descripción histológica de individuos sanos	33
8.1.1 Sistema tegumentario	33
8.1.2 Sistema gastrointestinal	37
8.1.3 Sistema reproductivo	42
8.2 Hallazgos histopatológicos en los individuos	43
8.3 Frotis heces	54
9. Discusión	56
10. Conclusiones	65
11. Referencias	67

Dedicatoria

A mis padres, quienes han sido mi pilar más sólido, les debo todo lo que soy y todo lo que he logrado. Gracias por su amor, por enseñarme a perseverar y por ser mi refugio en los momentos difíciles. Sin su apoyo y su fe inquebrantable en mí, este sueño no habría sido posible. Sus sacrificios y su ejemplo me han dado la fuerza para seguir adelante, y este logro es tanto mío como suyo.

Además, un agradecimiento muy especial a mis amigos, quienes me acompañaron a lo largo de la carrera. A ustedes, gracias por su compañía, su alegría y por los momentos compartidos que hicieron que este camino fuera más llevadero. Su amistad ha sido invaluable, y cada uno de ustedes ha dejado una huella imborrable en mi vida.

A todos ustedes, gracias por ser parte de este viaje. Este logro es el resultado de su apoyo, su amor y su confianza.

Agradecimientos

A lo largo de este viaje académico, he tenido la fortuna de contar con el apoyo, la guía y el cariño de personas que han dejado una huella profunda en mi vida y en este trabajo.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis mentores, el Dr. Alejandro Arias del Razo y la Dra. Jenny Carolina Rodríguez Villalobos. Su paciencia, conocimiento y apoyo incondicional han sido fundamentales para mi desarrollo académico y personal. Gracias por compartir su experiencia y por siempre brindarme palabras de aliento y orientación en cada paso de este proceso. Su dedicación y compromiso con la ciencia son una fuente constante de inspiración para mí.

También quiero agradecer al CICIMAR por abrirme sus puertas y brindarme las instalaciones necesarias para realizar mi trabajo. Este centro se ha convertido en un lugar muy especial para mí, y agradezco a cada persona que me recibió y me apoyó durante mi estancia.

Resumen

Las mortalidades masivas del erizo *Diadema antillarum* en el Caribe como las ocurridos desde hace algunas décadas, han generado una gran preocupación por su impacto en los ecosistemas arrecifales. Este estudio utiliza la histología para caracterizar las probables causas de eventos de mortalidad masiva en esta especie clave, a través de la descripción de las alteraciones anatómicas experimentadas por organismos afectados en el Caribe Mexicano. Para ello, se recolectaron 27 individuos de *D. antillarum* en junio de 2022, cuatro meses después de los primeros registros de erizos enfermos, en diferentes localidades, incluyendo Xahuayxol, Xcalak, Mahahual y Cozumel. La recolecta incluyó 12 erizos sanos de los sitios control (Xahuayxol, Xcalak y Mahahual) y 15 erizos de los sitios con reporte de enfermedad (Xahuayxol y Cozumel): 12 aparentemente sanos y tres en las etapas iniciales de la enfermedad. Las muestras fueron procesadas histológicamente y analizadas bajo el microscopio para caracterizar comparativamente individuos sanos y enfermos, y para identificar daño tisular asociados a potenciales agentes patógenos. Además, se hicieron frotis de heces en búsqueda de parásitos. Se encontró que 74% de los individuos presentaron algún tipo de anormalidad en sus tejidos. El 59% (n = 81 frotis analizados) de los individuos presentaron ciliados en sus heces. Histológicamente se comprobó la presencia de ciliados, necrosis del tejido, pigmentos cafés que suelen indicar procesos de daño celular, inflamación, así como colonias bacterianas y aglomeración de celomocitos en tejidos reproductivos, digestivos y tejido ambulacral-interambulacral, con mayor frecuencia en este último. Dado que, los signos de enfermedad en los erizos infectados pueden avanzar rápidamente, y la muerte puede ocurrir pocos días después de que aparecen los síntomas. Lo que sugiere un impacto directo en la capacidad de recuperación de las poblaciones. La interpretación de estos resultados permitirá una mejor comprensión del papel de las enfermedades en la dinámica poblacional de *D. antillarum* y aportará información crucial para el diseño de estrategias de conservación.

Tabla de figuras

Figura 1. Diadema antillarum en fondo rocoso. Fotografía de Kimani Kitson-Walters.....	14
Figura 2. Anatomía de erizo negro Diadema antillarum, vista interna del cuerpo. (tomado y modificado de Reis, 2020).	16
Figura 3. Signos de enfermedad en <i>D. antillarum</i> durante el evento de mortalidad en 2022. (Hylkema et al., 2023).	22
Figura 4. Sitios de muestreo en las localidades de Xahuayxol, Xcalak, Mahahual y Cozumel.....	29
Figura 5. A. Sección ambulacral-interambulacral oral. Se observa pedicelario (a). B. Corte transversal de glándulas de pedicelario. Epidermis (b) y tejido conectivo (c). CRA = canal radial de agua, ES = espina....	34
Figura 6. Espinas (a) y ámpulas (b) en sección ambulacral. Estructuras similares a podios señalados con flechas.	35
Figura 7. Espinas primarias (a) y pies ambulacrales (b). Se señala epidermis con flecha, tejido nervioso (d), fibras musculares (e) y lumen (f) de los podios.	36
Figura 8. Espinas secundarias (a) y pies ambulacrales (b). Se señala epidermis con flecha, y estructura central (c) de las espinas.	36
Figura 9. Faringe (a), músculos interpiramidales (b).	37
Figura 10. Boca (a), ligamentos (b), y músculo protactor (c). MI = músculo interpiramidal	38
Figura 11. Sección de intestino delgado (a) con materia orgánica en su interior e intestino grueso (b). Se aprecia gónada en esquina inferior derecha (c).....	39
Figura 12. Intestino grueso. epitelio columnar = EC, tejido conectivo = TC, capa basal = CB.....	39
Figura 13. Intestino delgado. Microvellosidades señaladas en recuadros.....	40
Figura 14. Recto.....	41
Figura 15. Conformación trilaminar del recto, tejido conectivo (a), microvellosidades de los enterocitos no glandulares (b).	41
Figura 16. Ovarios (a) y testículos (b).	42
Figura 17. Oocitos (a) y espermátidas (b). Epitelio de revestimiento = ER.....	42
Figura 18. Sección histopatológica pedicelario que presenta necrosis licuefactiva (NL).	44
Figura 19. A. Sección histopatológica de tejido ambulacral-interambulacral aboral (AIA) con necrosis en espina. B. Magnificación a 200 micras. C. NP = nucleos picnóticos.	45
Figura 20. A. Sección histopatológica de tejido ambulacral-interambulacral oral (AIO) con colonias bacterianas en espina. B. Magnificación a 200 micras. C. Magnificación a 50 micras.	46
Figura 21. Sección histopatológica de tejido ambulacral-interambulacral oral (AIO) con necrosis en espina señalada con flecha (A). NP = nucleos picnóticos.	47
Figura 22. Sección histopatológica de intestino con presencia de ciliados.	48
Figura 23. A. Sección histopatológica de intestino con presencia de ciliado. B. Huecos en microvellosidades. C. Huecos y acumulación de de celomocitos.....	49
Figura 24. Sección histopatológica de intestino que presenta necrosis. NL = Necrosis licuefactiva.	50
Figura 25. A-F. Sección histopatológica de diferentes zonas del recto con inflamación, pigmentos cafés, y colonias bacterianas señaladas con un cuadro. I = inflamación, PC = pigmentos cafés.	51
Figura 26. Sección histopatológica de recto con acumulación de celomocitos.	52
Figura 27. Sección histopatológica de gónada con pigmentos cafés.	53
Figura 28. Sección histopatológica de gónada con ciliado. CA = células germinales atrésicas.....	53
Figura 29. Escuticocilio similar a <i>Philaster apodigitiformis</i> encontrado en frotis de heces. Magnificación a 40x.....	54
Figura 30. Ciliado similar a <i>Parametopidium circumlabens</i> encontrado en frotis de heces. Magnificación a 40x.....	55
Figura 31. Escuticocilio similar a <i>Entorhipidium triangularis</i> encontrado en frotis de heces. Magnificación a 40x.....	55
Figura 32. Ciliados con morfologías similares a las descritas para <i>Philaster sp.</i> En A se muestra el ciliado en este estudio; mientras que en B se muestra el ciliado reportado por Hewson et al. (2023.)	63

1. Introducción

Diadema antillarum es un erizo de mar negro de espinas largas, grande y llamativo; de aguas poco profundas del Atlántico occidental tropical, entre las Bermudas y Brasil. Perteneció al filo Echinodermata, que comprende, entre otros, la clase Echinoidea (Equinoideos) donde se encuentran los erizos de mar, junto con los erizos de corazón (Spatangoida) y dólares de mar (Hyman, 1956). La clase Echinoidea está dividida en dos subclases, Cidaroidea y Euechinoidea, esta última comprende a los erizos regulares e irregulares y está compuesta por catorce órdenes, entre los que se destaca, el orden de erizos regulares Diadematoidea, al que pertenece *D. antillarum* (Pérez, *et. al.*, 2014). Los erizos de mar regulares son esféricos y simétricos, con un caparazón duro y cubiertos de espinas largas que les proporcionan protección. Se alimentan de algas y otros organismos marinos usando una estructura llamada Linterna de Aristóteles y se encuentran en arrecifes y fondos marinos (Hyman, 1956). Se alimentan de partículas orgánicas y microorganismos utilizando pedicelos. Ambos grupos son importantes en sus ecosistemas, pero presentan adaptaciones distintas a sus hábitats (Cavey, y Märkel, 1994). *D. antillarum* habita en comunidades de arrecifes de coral, aunque puede encontrarse en entornos rocosos, raíces de manglares, pozas de marea, praderas marinas y fondos arenosos (Randall *et al.*, 1964).

Diadema antillarum es un erizo nocturno muy activo que tiene una alta reactividad y sensibilidad a los cambios de luz y a las perturbaciones del agua, dada su sensibilidad a la luz, permanece en zonas más oscuras, como las grietas del arrecife, durante el día, y emerge por la noche para alimentarse (Muthiga, y McClanahan, 2013). Ecológicamente es fundamental dentro de los arrecifes, pues es un consumidor clave de las algas bentónicas que compiten con los corales por el espacio en estos ecosistemas (Banister y Campbell, 1985; Bodmer *et al.* 2015; Cabanillas-Terán *et al.*, 2019).

Debido a sus hábitos de herbivoría, durante la noche, dedican la mayor parte de su tiempo a la remoción de la superficie dura del arrecife, mientras se mueven a través de las estructuras coralinas buscando alimentarse de algas (Muthiga, y McClanahan, 2013). *D. antillarum* también es un carnívoro facultativo que puede ingerir tejidos de coral y otros invertebrados sésiles de arrecife y macroalgas (Bak y van Eys, 1975; Grzimek, 1972; Bak *et al.*, 1984; Hendler, *et al.*, 1995 Williams, 2022), por lo que afectan a la diversidad y abundancia de las comunidades bentónicas en arrecifes poco profundos (Sammarco, 1980).

La importancia de *D. antillarum* en el control de la proliferación de algas se hizo notoria con el evento de mortalidad masiva de 1983-1984 y posteriormente, con un evento similar ocurrido durante 2022 (Hylkema *et al.*, 2023). La ausencia de este erizo en los arrecifes coralinos trae consigo cambios en las relaciones de competencia por espacio y alimento entre corales y algas bénticas, lo que reduce la colonización de los corales por falta de reclutas (Edmund y Carpenter, 2001; Arnold *et al.*, 2010). Dado que la causa del evento de mortalidad de los ochentas nunca fue determinada, y que no existen ejemplares, ni muestras de tejido en colecciones (Hewson *et al.*, 2023), resulta relevante tratar de identificar los factores que afectaron a este erizo en el Atlántico occidental y el Caribe durante el último evento, y en caso de que algún agente patógeno sea el causante de estos niveles de mortalidad tan altos, tratar de identificarlo. Sin embargo, no es una tarea fácil, por lo que un buen punto de partida consiste en examinar los factores que intervienen en la enfermedad, incluyendo sus principales características y los efectos que produce en *D. antillarum*.

Relacionado con lo anterior, la histología es una herramienta crucial para el estudio de enfermedades animales, proporcionando información sobre la patobiología y los cambios en los tejidos en condiciones tanto espontáneas como inducidas (Schofield *et al.*, 2016; Slaoui y Fiette, 2011). Este proceso implica el muestreo, fijación, inclusión, corte y tinción de tejidos, siendo la tinción con hematoxilina y eosina (H-E) la más utilizada (Slaoui y Fiette, 2011). Los métodos histológicos son útiles en el diagnóstico de enfermedades en animales acuáticos, permitiendo clasificar parásitos y evaluar sus efectos en los tejidos del huésped (Purivirojkul, 2012). El examen histopatológico es valioso para detectar y diferenciar enfermedades parasitarias, confirmando a menudo su presencia y ayudando a determinar la causa principal (Sołtysiak *et al.*, 2014)

Respecto a su distribución, *D. antillarum* se encuentra en aguas poco profundas prefiriendo áreas más superficiales (alredor de los 5m), complejas y productivas del arrecife en comparación con las intermedias y profundas (Tuohy *et al.*, 2020) del Atlántico occidental desde Florida, el Golfo de México hasta la Península de Yucatán, y las Indias Occidentales, a lo largo de la costa norte de Sudamérica hasta Surinam. También está presente en el Atlántico oriental y se encuentra en Madeira, Bermudas, el Golfo de Guinea, las Azores y las islas Canarias, Cabo Verde y Annabon (Ogden y Carpenter, 1987; Hendler, *et al.*, 1995; Hernández *et al.*, 2008).

Desde los eventos de mortalidad de 1983, las densidades poblacionales de *D. antillarum* se han recuperado moderadamente, y actualmente comprenden aproximadamente el 12% de las que había antes de la mortandad (Lessios *et al.*, 2016). Esta recuperación no ha sido homogénea en el área de su distribución, por lo que varía significativamente entre diferentes regiones del Caribe y el Atlántico (Hernández *et al.*, 2008; Tuohy *et al.*, 2020). Mientras que algunas áreas como Puerto Rico, Cayos de Florida y México muestran signos de recuperación parcial, otras como Curaçao, St. Eustatius, y Saba continúan enfrentando desafíos significativos debido a la baja densidad de adultos reproductores y la falta de complejidad del hábitat (Hylkema *et al.*, 2022). La implementación de estrategias de restauración, como la creación de refugios artificiales y la propagación *ex situ*, puede ser crucial para facilitar la recuperación de esta especie clave y, en consecuencia, la salud de los arrecifes de coral (Delgado *et al.*, 2021; Pilnick *et al.*, 2021).

La sobrepesca de peces herbívoros durante el último siglo ha alterado la estructura de los grupos funcionales de herbívoros en muchos arrecifes; en respuesta, la herbivoría ha pasado de estar dominada por peces a estar dominada por equinoideos. Esta es la razón por la que *D. antillarum* era el herbívoro más abundante en los arrecifes de coral del Caribe antes de 1983, año en el que se suscitó el primer evento de mortalidad masiva (Jackson *et al.*, 2001; Pandolfi *et al.*, 2003; Bellwood *et al.* 2004). La ausencia de *D. antillarum*, un herbívoro clave, y su presión de pastoreo (alimentación a base de algas marinas) en muchos sistemas arrecifales donde los corales eran los principales ingenieros biológicos, ha conducido a la dominancia de macroalgas en muchas de estas comunidades arrecifales (Hughes, 1994; Edmunds y Carpenter 2001; Bielmyer *et al.*, 2005).

Las enfermedades en el medio marino han sido ampliamente estudiadas en arrecifes coralinos, principalmente en especies de coral afectadas por numerosas patologías (Lesser *et al.*, 2007). El abordaje inicial en los estudios de enfermedades es crucial para su manejo y resolución. La histología permite examinar detalladamente las estructuras celulares y tisulares, proporcionando información esencial sobre el estado de salud de los organismos y la presencia de alteraciones internas que no son evidentes externamente (Pichat *et al.*, 2018). Los análisis histológicos en animales son fundamentales para evaluar la salud, diagnosticar enfermedades, y detectar anomalías a nivel celular (Floyd *et al.*, 2020). También juegan un papel crucial en estudios ecológicos, permitiendo entender el impacto de factores ambientales

en la salud de las especies y guiando esfuerzos de conservación (Medina-Vogel, 2010). Además, estos análisis ayudan a estudiar el crecimiento y desarrollo de los animales, así como a evaluar los efectos de sustancias químicas o fármacos en los tejidos, lo que es esencial para determinar su seguridad tanto para humanos como para el medio ambiente (Kabu *et al.*, 2015).

Por lo anterior, como un punto de partida comparativo entre individuos sanos y afectados, esta tesis utiliza la histología ya que estas técnicas ofrecen una oportunidad para describir tejidos a detalle, y de esta manera se pueden denotar anomalías en dichos tejidos, para tratar de entender las causas que provocaron la mortandad de erizos de mar en la zona del Caribe mexicano en 2022. Para ello, se realizará una descripción de individuos sanos en comparación con individuos enfermos y sus alteraciones, a través de un análisis histopatológico.

2. Justificación

El estudio de los erizos de mar, particularmente *Diadema antillarum*, es fundamental debido a su papel crucial en los ecosistemas de arrecifes de coral. Estos erizos desempeñan un rol ecológico importante al controlar el crecimiento de algas, permitiendo que los corales mantengan un espacio competitivo y contribuyendo así al equilibrio y sostenibilidad de los arrecifes. La reciente disminución drástica de sus poblaciones, debido a brotes de enfermedades y otros factores ambientales, ha provocado un desequilibrio ecológico en varias regiones del Caribe, resultando en un incremento de la cobertura de algas que compiten con los corales por espacio y recursos.

Realizar un estudio exhaustivo de estos erizos en áreas afectadas y sanas es esencial para comprender los patrones de enfermedad, identificar agentes patógenos potenciales y analizar los efectos de estos sobre la morfología y fisiología de los individuos. Además, esta tesis contribuye a entender mejor cómo los factores antropogénicos y los cambios ambientales impactan en la salud de los organismos marinos.

El conocimiento adquirido a partir del análisis histopatológico de los tejidos puede ayudar a identificar daños específicos asociados con la enfermedad, lo cual es clave para proponer estrategias de conservación y recuperación. La información obtenida puede ser utilizada para mejorar las prácticas de manejo de ecosistemas de arrecifes y servir como base para futuros estudios que busquen implementar métodos de conservación más efectivos para *Diadema antillarum* y los arrecifes de coral en general.

3. Marco Teórico

3.1 Ecología

Diadema antillarum es una especie habitante común de los arrecifes, puesto que la complejidad estructural del hábitat dado el dominio de los corales escleractinios, proporciona una fuente alternativa de refugio ante depredadores (Grande *et al.*, 2020; Bodmer *et al.*, 2021). En estos ecosistemas ésta es una especie clave en el Atlántico occidental y el Caribe, ya que altera la microestructura del sustrato debido a sus hábitos alimenticios, controlando principalmente la abundancia de algas, que pueden destruir los arrecifes al reemplazar los corales escleractinios, impidiendo el asentamiento de otros organismos sésiles (Liddell y Ohlhorst 1986; Carpenter, 1988; Lessios, 1988; Edmunds y Carpenter, 2001).

Respecto a sus preferencias alimenticias, por medio del análisis de los contenidos intestinales de las especies, se ha observado que éstos suelen reflejar el tipo de alimento de mayor disponibilidad en el hábitat en el que se encuentran. Por ejemplo, *D. antillarum* recolectados de praderas de pasto marino tienen contenidos intestinales que en su mayoría contienen el pasto marino *Thalassia* spp., con menores cantidades de limo fino (Muthiga, y McClanahan, 2013). En contraste, los intestinos de individuos recolectados de áreas de arrecife suelen contener algas y detritos (Randall *et al.*, 1964). Además de la herbivoría, los erizos son bioerosionadores en el arrecife, desarrollando una actividad antagonista al crecimiento de los arrecifes puesto que los erizos al alimentarse, raspan el sustrato removiendo carbonato de calcio (Ogden, 1976; Bak *et al.*, 1984; Ogden y Carpenter, 1987).

La dinámica poblacional de *D. antillarum* ha sido moldeada tanto por factores naturales como antropogénicos. La evidencia genética sugiere que esta especie era abundante en el Caribe mucho antes del impacto humano, con una expansión poblacional que ocurrió hace al menos 100,000 años (Lessios *et al.*, 2001). Sin embargo, un registro subfósil de 3,000 años en el Caribe panameño indica que *Diadema* comenzó a disminuir hace más de un milenio, posiblemente debido a interacciones complejas con comunidades de corales y peces damisela (Cramer *et al.*, 2018). Esta tendencia a la baja culminó en una mortandad catastrófica en la década de 1980, que redujo drásticamente sus poblaciones (Lessios *et al.*, 2001). Además, en las Islas Canarias, se ha observado que densidades de *D. antillarum* superiores a 2 individuos/m² han reducido significativamente la cobertura de macroalgas, y

se ha encontrado que factores antropogénicos están correlacionados positivamente con la abundancia de erizos (Hernández *et al.*, 2008).

Estos erizos preservan la condición óptima de los arrecifes de coral al disminuir la cobertura de algas y crear un sustrato limpio. Se ha calculado que las densidades óptimas para cumplir con este rol ecológico son de aproximadamente 5 individuos/m², promoviendo así el crecimiento de algas coralinas crustosas y varias especies de corales, mejorando el desarrollo de la comunidad coralina (Macintyre *et al.*, 2005; Olmeda-Saldaña *et al.*, 2021).

3.2 Biología general

Diadema antillarum es un erizo regular (esférico) que presenta el pentamerismo típico de los equinodermos, que es de simetría radial y disposición quíntuple. Posee un esqueleto corporal interno llamado testa que es rígido, cubierto de largas espinas móviles y alberga una cantidad reducida de tejido blando en la pared corporal, (Hyman, 1956). Los adultos pueden alcanzar hasta 12 cm de diámetro, con espinas largas, afiladas como agujas y delgadas que se rompen con facilidad y tienen hasta 30 cm de longitud (Nichols y Cooke, 1971). La testa y las espinas de un adulto maduro suelen ser negras, pero pueden entremezclarse espinas de colores más claros (Figura 1), mientras que las de los juveniles presentan bandas alternas blancas y moradas (Randall *et al.*, 1964).



Figura 1. *Diadema antillarum* en fondo rocoso. Fotografía de Kimani Kitson-Walters.

El cuerpo también está cubierto en su base, de tentáculos ramificados llamados pies tubulares o ambulacrales, que sirven dependiendo del tipo, para alimentarse, producir mucosa, locomoción, o respiración (Randall *et al.*, 1964; Hendler, *et al.*, 1995). En cuanto a la anatomía del erizo, para este trabajo, debido que se tomaron muestras de estos tejidos para el diagnóstico histológico e histopatológico, resultan relevantes seis estructuras: aparato bucal (Linterna de Aristóteles), intestino y recto, tejido ambulacral-interambulacral aboral (AIA), tejido ambulacral-interambulacral oral (AIO), y gónadas.

El aparato bucal, conocido como la Linterna de Aristóteles, está formado por cinco dientes surge de un labio formado por un tejido ligamentoso en la abertura del esqueleto en la superficie oral llamado peristoma, (Figura 2). Debajo de la membrana peristomial se forma un anillo de placas ambulacrales e interambulacrales modificadas creando una faja perignática que sostiene la linterna (Hyman, 1956). Los principales elementos estructurales de la linterna son cinco placas triangulares orientadas verticalmente llamadas pirámides, las cuáles están situadas en espacios interambulacrales y están unidas entre sí por músculos cominadores, que proporcionan el movimiento de balanceo de las pirámides, el borde aboral de cada pirámide es una barra engrosada llamada epífisis (Hyman, 1956; Brusca, y Brusca, 1990). Cada pirámide tiene un canal dentro del cual se encuentra un diente, el extremo afilado del diente se extiende desde el extremo oral de la pirámide hacia la región bucal, un saco dental blando de origen celómico cubre el extremo aboral no endurecido de cada diente de donde emerge en la parte superior de la pirámide.

Encima de la estructura principal de la linterna, en la superficie bucal, hay cinco compases y cinco rótulas, una de cada una a lo largo de cada radios ambulacral, los compases y sus músculos asociados regulan la presión hidrostática dentro de las branquias (Brusca, y Brusca, 1990). Los dientes se protraen empujando toda la linterna oralmente mediante la contracción de músculos protractores en forma de lámina que se originan alrededor de la boca, en las zonas interambulacrales del esqueleto interno, y se insertan en las epífisis, cerca del extremo aboral de cada pirámide, su acción también sirve para separar los dientes cuando se produce la protracción (Hyman, 1956). Los músculos retractores se originan en unas gruesas placas ambulacrales llamadas auriculares y se insertan en el extremo bucal de la linterna (Cavey, y Märkel, 1994).

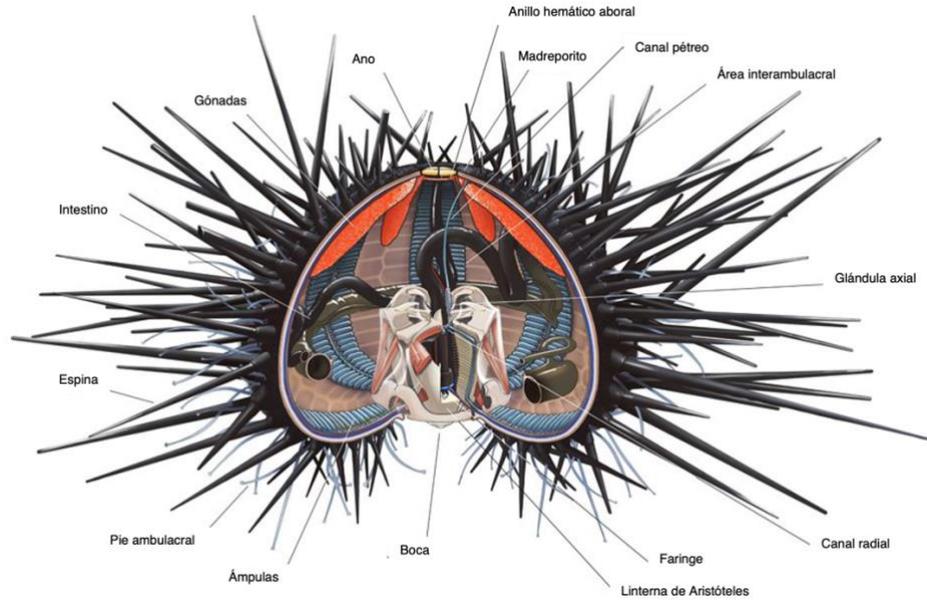


Figura 2. Anatomía de erizo negro *Diadema antillarum*, vista interna del cuerpo. (tomado y modificado de Reis, 2020).

El sistema digestivo comienza en la cavidad bucal, debajo de la Linterna de Aristóteles. A través de ésta pasa la faringe seguida del esófago, que se conecta con el intestino, que se divide en intestino delgado (estómago) e intestino grueso, este último está conectado con el recto que está unido al periprocto, y finalmente termina en el ano (Figura 2). La faringe, de sección pentagonal y unida por membranas a los bordes internos de las pirámides, emerge de la parte superior de la linterna y pasa de inmediato al esófago (Brusca, y Brusca, 1990). El esófago desciende hacia la zona oral, a menudo formando una curva considerable, y entra en el intestino (Hyman, 1956; Cavey, y Märkel, 1994). El intestino suele estar dispuesto en la superficie interna de la testa. Primero, se curva alrededor del interior de la testa en sentido contrario a las agujas del reloj visto desde la superficie aboral; después de completar casi una vuelta completa en el interior, gira sobre sí mismo y realiza otra vuelta casi completa en el sentido de las agujas del reloj, terminando en posición aboral a su primera vuelta (Muthiga, y McClanahan, 2013). La parte terminal del intestino o recto asciende hasta la parte inferior del periprocto y se abre allí a través del ano, rodeado por los celomas perianal y periproctal (Cavey, y Märkel, 1994). Los dos circuitos del intestino son llamados estómago e intestino por algunos autores, intestino inferior y superior por otros, aunque tal vez sea preferible designarlos como intestino delgado e intestino grueso (Hyman, 1956).

Los tejidos ambulacral-interambulacral aboral (AIA) y tejido ambulacral-interambulacral oral (AIO), son parte del sistema integumentario, en la parte exterior de la testa. Este sistema está conformado por la pared corporal, que se divide en tres secciones, 1) la epidermis externa, compuesta por células de soporte, secretoras y sensoriales, y plexo nervioso; debajo de la epidermis está 2) la dermis de tejido conectivo donde en ocasiones podemos encontrar células glandulares, que pueden ser granulares o no granulares, por último, 3) un revestimiento celómico (Hyman, 1956; Cavey, y Märkel, 1994). La división de las placas ambulacrales e interambulacrales surge en la testa de carbonato de calcio del erizo, este esqueleto está formado por 10 columnas dobles de placas calcáreas entrelazadas, llamada corona o testa, que convergen en las superficies oral y aboral (Cavey, y Märkel, 1994). Los pies ambulacrales emergen de aberturas dentro de las placas ambulacrales; otros apéndices como espina y pedicelarios pueden encontrarse tanto en las placas ambulacrales como en las interambulacrales.

Las espinas pueden ser primarias, generalmente más grandes, secundarias, más pequeñas en comparación, y las más pequeñas suelen ser llamadas terciarias o miliarias (Randall *et al.*, 1964). Todas las espinas suceden en filas desde el periprocto hasta el peristoma, y están hechas de carbonato de calcio (calcita) con sustancias orgánicas (Hyman, 1956). Los erizos poseen, además, estructuras llamadas pedicelios que son tridentados, esta estructura consiste en una cabeza compuesta por tres mandíbulas movibles montada sobre un “tallo”, las mandíbulas tienen una serie de músculos que les permiten abrir y cerrar, sirven principalmente para defensa (Lewis y Saluja, 1967). Poseen hasta tres tipos de podios o pies ambulacrales, siendo los más comunes para la locomoción, que se extienden desde el peristoma hasta el periprocto en cinco hileras dobles sobre las placas ambulacrales, su extremo apical tiene forma de disco que ayuda a la locomoción y sujeción en diferentes superficies; también presentan podios que no terminan en forma de disco sino en forma redonda o globular, estos son podios papilados que tienen funciones sensoriales y por último, los podios bucales, que se localizan al rededor del peristoma (Hyman, 1956; Cavey, y Märkel, 1994).

Los erizos de mar son estrictamente dióicos, es decir, que los sexos están separados, su sistema reproductivo consiste en cinco gónadas sostenidas por filamentos mesentéricos a lo largo de la capa interna de las placas ambulacrales. Son cuerpos lobulados,

que cuando maduran, son bastante voluminosos, ocupando el espacio disponible entre los dobleces intestinales llegando casi a la altura de la linterna (Figura 2). En el extremo aboral, cada gónada se estrecha en un gonoducto corto que sale por el gonoporo en la placa genital correspondiente; los gonoductos están estrechamente asociados con el anillo nervioso y el anillo hemático aboral (Hyman, 1956).

3.3 Histología

Entre los métodos de diagnóstico utilizados para *Diadema antillarum* con la intención de mejorar la comprensión de la estructura normal y detectar anomalías en tejidos, así como patógenos, se encuentra el procesamiento histológico. La histología es el estudio microscópico de las células y tejidos en plantas y animales, enfocado en su estructura, desarrollo y función (Betyna *et al.*, 2018; Tamizhazhagan y Pugazhendy, 2017). Esta herramienta está estrechamente relacionada con la biología celular y la anatomía, proporcionando una base estructural para comprender los procesos fisiológicos (Tamizhazhagan y Pugazhendy, 2017). El campo abarca la citología, embriología e histopatología, que examina tejidos enfermos (Betyna *et al.*, 2018). La histología utiliza principalmente la microscopía como su herramienta de evaluación principal, siendo los microscopios de luz y electrónicos instrumentos comunes (Betyna *et al.*, 2018; Ganjali, 2012). El procesamiento de tejidos para el examen histológico implica el corte y tinción de muestras para crear láminas microscópicas para su análisis (Ganjali, 2012). El campo abarca la citología, embriología e histopatología, que examina tejidos enfermos (Betyna *et al.*, 2018).

Así también, es una herramienta valiosa para el estudio de tejidos y enfermedades en animales, especialmente en entornos acuáticos. Permite detectar la presencia de contaminantes y la degradación ambiental a través del examen de tejidos de peces (Lopes, 2021). Esta técnica es fundamental para identificar y clasificar parásitos en animales acuáticos, ya que permite detectar parásitos ocultos en lo profundo de los órganos, que podrían no ser observables mediante métodos diagnósticos simples (Purivirojkul, 2012). El análisis histológico también es esencial en la investigación de tumores, facilitando su reconocimiento y clasificación en función de sus patrones característicos en los tejidos (Foulds, 1940). Este enfoque ayuda a diferenciar el crecimiento tumoral de tejidos normales

o enfermos y permite estudiar sus propiedades en una amplia variedad de muestras humanas y animales (Foulds, 1940).

La investigación histopatológica es esencial para diagnosticar enfermedades parasitarias tanto en humanos como en animales, proporcionando información importante para el diagnóstico diferencial y la determinación de la causa principal de la enfermedad (Sołtysiak *et al.*, 2014). Además, la histopatología desempeña un papel crítico en la caracterización y validación de modelos animales, ya que puede proporcionar un contexto morfológico a los datos *in vivo*, moleculares y bioquímicos, ayudando a los investigadores a comprender la patobiología normal y los fenotipos únicos en estos modelos (Knoblauch *et al.*, 2018).

Ahora bien, los estudios histológicos de *Diadema antillarum* han proporcionado información valiosa sobre su biología y ecología. La histología del tracto digestivo revela la presencia de enzimas para la digestión de carbohidratos y proteínas, con secreciones que ocurren en el ciego y el intestino anterior (Lewis, 1964). La morfología de las espinas ha demostrado ser útil para la diferenciación de especies dentro del género *Diadema*, con *D. antillarum* mostrando estructuras internas de espinas distintivas (Coppard y Campbell, 2005). Además, el análisis histológico de los pedicelarios claviformes de *D. antillarum* revela glándulas en el tallo que secretan mucopolisacáridos ácidos no sulfatados tras la estimulación (Lewis y Saluja, 1967).

4. Antecedentes

En enero de 1983 las poblaciones de *D. antillarum* en el Caribe y el Atlántico occidental sufrieron una mortalidad masiva, se cree que se originó en Punta Galeta, Panamá y duró más de 13 meses hasta febrero de 1984 (Lessios *et al.*, 1984a). Desde la disminución masiva de la población a principios de la década de 1980, con mortalidades de hasta el 87-100 %, de este erizo, las poblaciones no se han recuperado completamente y la dinámica de los ecosistemas de arrecifes de coral en el Caribe ha cambiado enormemente. Por ejemplo, se observó que dentro de los cinco días después de que las poblaciones de *D. antillarum* sucumbieran, las comunidades de algas bentónicas aumentaron un 20% en biomasa y su productividad primaria se desplomó (Carpenter, 1988; Bielmyer *et al.*, 2005; Kissling *et al.* 2014; Lessios, 2016). Se creyó que el agente causante de la mortalidad era específico de *D. antillarum*, ya que otras especies no se vieron afectadas (Lessios *et al.* 1984); además, la progresión de la mortandad, que se desplazaba en la dirección de las corrientes predominantes por todo el Caribe a grandes distancias, hizo pensar que se trataba de un patógeno transmitido por el agua; más tarde, utilizando datos de satélite, quedó claro que no solo las corrientes eran responsables de la propagación del patógeno, sino que probablemente el tráfico de embarcaciones también contribuía a la dispersión (Lessios *et al.* 1984; Phinney *et al.*, 2001).

Después de este suceso, algunos eventos de mortalidad menores de *D. antillarum* fueron reportados en áreas limitadas de Florida, St. Croix, y Panamá (Lessios, 1988; Forcucci, 1994). En décadas posteriores a estos eventos, *D. antillarum* comenzó a desempeñar de nuevo sus importantes funciones ecológicas en varias zonas arrecifales someras, gracias a la recuperación de hasta un 12% en sus poblaciones (Edmunds and Carpenter, 2001; Carpenter y Edmunds, 2006; Myhre y Acevedo-Gutiérrez, 2007; Idjadi *et al.*, 2010; Lessios, 2016).

A pesar de esto, años más tarde, a mediados de febrero de 2022, se produjo un suceso de mortalidad similar en St. Thomas, Islas Vírgenes de EE.UU, cuando un buzo local informó de la muerte de docenas de *D. antillarum* en un punto de inmersión popular, y posteriormente, a mediados de marzo, comenzaron a circular reportes informales de *D. antillarum* muertos y moribundos procedentes de islas caribeñas separadas geográficamente (Hylkema *et al.*, 2023). Por el momento, se desconoce el alcance total de este evento de mortalidad del erizo

que inició en 2022. Aunque es posible que algunas poblaciones de *D. antillarum* permanezcan intactas durante la actual mortandad, estas especies pueden volver a estar funcionalmente extintas en muchas islas del Caribe debido a la elevada tasa de mortalidad observada (Hylkema *et al.*, 2023); aunado a que la recuperación de las poblaciones de *Diadema* en el Caribe ha sido desigual y moderada (Lessios, 2015). Dado que nunca se identificó un patógeno responsable del evento de mortalidad masiva de 1983-1984 (DeFilippo *et al.*, 2018), la principal prioridad de investigación para la mortandad masiva de 2022 debería ser determinar su causa.

Tras un periodo de observación, se determinó que los signos macroscópicos en los erizos afectados comenzaron con el desprendimiento de las superficies verticales, la pérdida de movimiento/reacción de las espinas a los estímulos, la pérdida de control de los pies ambulacrales, el uso de las espinas para la locomoción en lugar de los pies ambulacrales y la formación de una disposición estrellada de las espinas (Hylkema *et al.*, 2023). En cuestión de días, los erizos con estos signos perdieron las espinas, lo que provocó la pérdida de tejido epidérmico y la exposición de la testa subyacente, que progresó rápidamente (~2 días) hasta la muerte (Hewson *et al.*, 2023; Hylkema *et al.*, 2023).

Para finales de agosto de 2022, gracias a esfuerzos en conjunto de miembros de la comunidad local, buceadores recreativos y la comunidad científica, se tenían 582 reportes y 426 fotografías registrados en la base de datos Diadema Health Tracking (Hylkema *et al.*, 2023). Todos los reportes debían cumplir ciertos requisitos para poder ser registrados en la base de datos, ya que para poder determinar el estado de salud de los erizos se siguieron una serie de criterios basados en categorías de evaluación de comportamiento incluyendo comportamientos de Categoría Uno (por ejemplo, adhesión al sustrato y evaluación de la posición de las espinas) y comportamientos de Categoría Dos (por ejemplo, respuesta a la luz, respuestas de tacto y defensa y actividad de los pies ambulacrales), así como signos evidentes de lesiones epidérmicas, espinas desprendidas o mortalidad (Francis-Floyd *et al.*, 2020).

A pesar de que el proceso de dispersión y las locaciones fueron diferentes, las afecciones parecen ser muy similares en ambos eventos de mortandad siendo estas: falta de control de los pies ambulacrales (Figura 3. A, B), lenta reacción de las espinas seguida de su pérdida (Figura 3.D), y necrosis de la epidermis (Figura 3. C), estas fueron observadas tanto

en erizos de laboratorio como silvestres (Hylkema *et al.*, 2023). La velocidad inicial de propagación y el amplio rango geográfico del evento de mortandad de *D. antillarum* de 2022 también llevaron a creer que eventualmente alcanzaría todas las áreas del Caribe como en el evento de 1983-1984, pero la evidencia apunta al hecho de que algunas poblaciones pueden permanecer sin impacto por este evento de mortandad (Hylkema *et al.*, 2023).

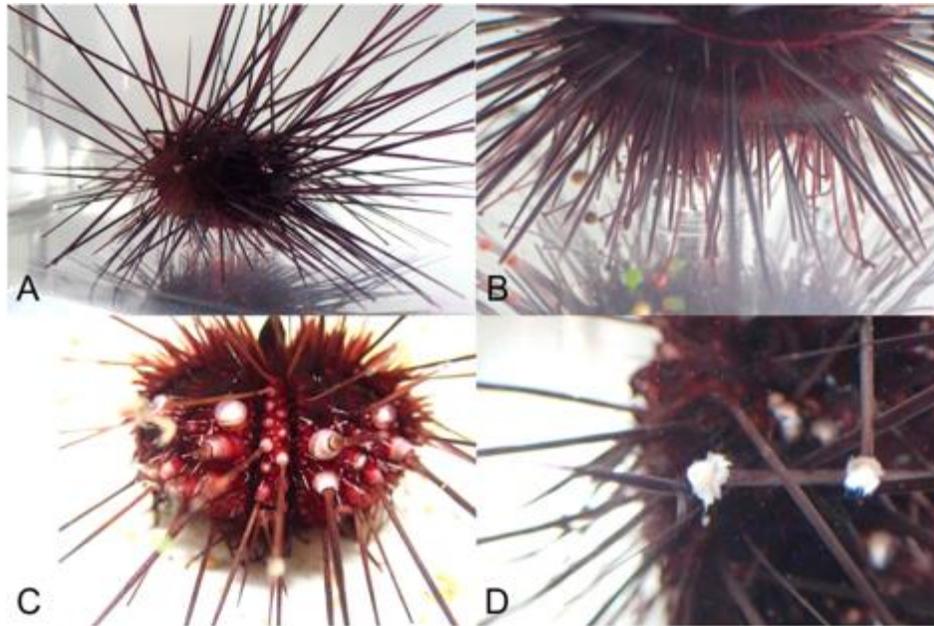


Figura 3. Signos de enfermedad en *D. antillarum* durante el evento de mortalidad en 2022. (A) Los pies ambulacrales carecen de poder de succión. (B) No se pueden utilizar los pies ambulacrales. (C) Necrosis de la epidermis y pérdida de espinas. (D) El tejido alrededor de las espinas rotas se desprende. (Hylkema *et al.*, 2023).

Así como se tienen diferentes criterios y categorías de evaluación para monitorear, recolectar datos en campo y hacer muestreos, se deben tener métodos y criterios establecidos para evaluar y caracterizar un erizo en buen estado de salud, para que de esta manera podamos hacer un análisis comparativo cuando tengamos individuos en condiciones de enfermedad y/o anormales.

Existen pocos trabajos histológicos que describan de manera detallada los tejidos de *Diadema antillarum*, el trabajo más detallado es el de Francis-Floyd *et al.* (2020). Su trabajo hace descripciones anatómicas que son fundamentales para el análisis histológico del erizo porque proporciona referencias clave para identificar estructuras normales y reconocer posibles anomalías o lesiones patológicas.

Conocer la anatomía normal es esencial para diferenciar entre tejido sano y afectado, lo que resulta de gran relevancia para esta tesis, por lo que, en la presente sección se hace una descripción dicho trabajo a fin de facilitar la interpretación de los hallazgos del presente estudio.

En el sistema tegumentario se encuentra la testa, que está compuesta por una epidermis y osículos (trabéculas calcáreas ricas en magnesio). Durante la descalcificación, se eliminan estos minerales, lo que deja huecos visibles en las secciones histológicas. En la epidermis, encontraron células pigmentadas, como iridóforos y cromatóforos, tanto en la superficie externa como interna del caparazón. Los apéndices osificados, como las espinas, pedicelarios y esferidios, también fueron destacados; las espinas, que se presentan en varias formas (primarias y secundarias), poseen un núcleo hueco, mientras que los pedicelarios, con función en la defensa y alimentación, se componen de una cabeza, cuello y un tallo.

En cuanto al sistema vascular de agua, se describió cómo el madreporito conecta el canal de piedra con el canal anular, que rodea el esófago. Este canal distribuye fluidos a través de cinco canales radiales ubicados alrededor de la linterna de Aristóteles. Estos canales radiales se dividen en canales laterales que llevan el fluido a las ampollas de los pies ambulacrales. Este sistema está revestido en toda su extensión por un epitelio ciliado aplanado de naturaleza celómica. A este le sigue una capa de tejido conectivo, cubierta externamente por peritoneo. En las ampollas, además, existe una capa de fibras musculares circulares entre el epitelio de revestimiento y el tejido conectivo; y haces de estas fibras musculares, cubiertos por epitelio, también atraviesan el lumen de la ampolla. El sistema es esencial para la locomoción y la manipulación de alimentos, controlada mediante las ampollas y los pies tubulares, cuyo funcionamiento también contribuye a la respiración a través de la circulación de fluidos.

El sistema hemático presentó cuatro tipos principales de celomocitos, que son las células encargadas de la defensa inmune en estos invertebrados: fagocitos, esferulocitos rojos y blancos, y células vibrátiles. Los fagocitos, siendo los más abundantes, juegan un papel crucial en la eliminación de materiales extraños. El órgano axial, rico en pigmentos de melanina, mostró la producción de celomocitos en los vasos hemales. Asimismo, se presentan cuerpos de Tiedemann y cuerpos de Polian en la linterna de Aristóteles, aunque su

función exacta sigue sin estar clara, pero se presume que podrían estar relacionados con la hematopoyesis.

El sistema digestivo, está revestido por un epitelio mayormente ciliado de células largas y delgadas, seguido por una capa de tejido conectivo y luego una fina capa muscular compuesta principalmente por fibras circulares; en el lado celómico, el tracto digestivo está cubierto por peritoneo flagelado; el esófago y el intestino mostraron abundantes células mucosas y microvellosidades en su epitelio, asociadas a una fuerte capacidad de absorción y secreción. El intestino delgado tiene una pared más gruesa que el intestino grueso y exhibe microvellosidades más largas, lo que sugiere una mayor capacidad de absorción. El recto y el periprocto, ubicados al final del tracto gastrointestinal, también fueron analizados. Sus hallazgos indicaron que la cantidad de células mucosas disminuye a medida que se avanza hacia el intestino grueso y el recto, donde se observaron estructuras indicativas de procesos de absorción final y eliminación de desechos.

En el sistema reproductivo, tanto en los testículos como en los ovarios, se encuentran distintos tipos de epitelio que cumplen funciones específicas. El epitelio de revestimiento del somatoceloma constituye el elemento más externo de la pared gonadal, en contacto con el tejido conectivo colágeno subyacente, el cual contiene miocitos no estriados. Las gónadas de los erizos fueron evaluadas para determinar el sexo y la madurez de los individuos. Observaron signos de degeneración en los ovarios de algunas hembras recolectadas en primavera, con fagocitosis de ovocitos atrésicos, mientras que los machos presentaban testículos completamente maduros con abundantes espermátides. En especímenes juveniles recolectados en otoño, las gónadas eran inmaduras, lo que les permitió inferir sobre los ciclos reproductivos de la especie.

El sistema respiratorio principalmente conformado por las branquias y los pies ambulacrales, donde la función principal de las branquias pareció ser excretora más que respiratoria. Observaron melanocitos asociados con objetos en forma de aguja en los vasos hemales de las branquias, lo que sugiere un papel importante en la eliminación de desechos y partículas extrañas.

En el sistema nervioso, encontraron que el cordón nervioso radial se localiza en la capa más externa de la testa, compuesto por tejido nervioso ectoneural en la epidermis y tejido hiponeural debajo de la dermis. Además, identificaron un anillo nervioso que rodea la

boca, lo que sugirió un control centralizado sobre las funciones de alimentación y locomoción.

Finalmente, su análisis también reveló diversas condiciones patológicas, como la presencia de objetos en forma de aguja (posiblemente espículas) en los vasos hemáticos, basófilos agregados celulares en las branquias, y colonias bacterianas gramnegativas en el hemisferio oral de la testa. Sus observaciones sugirieron respuestas inmunológicas activas en los erizos, especialmente en las branquias y el sistema digestivo, donde también se encontraron ciliados y amebas. Las amebas se asociaron con erosión epitelial en el intestino, indicando una posible infección parasitaria.

Además, estas descripciones facilitan la realización de necropsias y la recolección precisa de muestras, al detallar la disposición de órganos y sistemas internos como el sistema vascular, el hemal y el órgano axial. La comprensión del estado anatómico normal también ayuda a evaluar la salud general del organismo, permitiendo identificar infecciones, parásitos u otras condiciones que puedan comprometer su bienestar.

5. Objetivo general y específicos

a. Objetivo general

Caracterizar histológicamente los individuos de *Diadema antillarum* del Caribe mexicano e identificar posibles agentes bióticos asociados a lesiones histológicas.

b. Objetivos específicos

- Describir la anatomía histológica de individuos sanos de *D. antillarum*.
- Analizar de manera comparativa las características histológicas de los individuos de *D. antillarum* afectados por el evento de mortalidad masiva durante 2022 en el caribe mexicano, describiendo las lesiones observadas en sus tejidos.
- Estimar la prevalencia de lesiones histológicas dentro de los individuos afectados.

6. Hipótesis

En consideración a los hallazgos recientes en erizos de *Diadema antillarum* en arrecifes del Caribe, se espera que los individuos recolectados en campo con lesiones macroscópicas evidentes presenten señales de daño en por lo menos uno de sus tejidos y una asociación constante con ciliados en cercanía a las zonas de daño. De igual manera, se espera encontrar señales de daño en individuos aparentemente sanos colectados en sitios considerados enfermos, y ausencia de anormalidades en los individuos considerados sanos colectados en sitios control.

7. Método

7.1 Área de Estudio

El estudio se llevó a cabo en cuatro localidades: Xahuayxol, Xcalak, Mahahual y Cozumel, ubicadas en la sección norte del Sistema Arrecifal Mesoamericano en el Caribe Mexicano (Figura 4). Estas áreas presentan una estructura compleja de arrecifes con lagunas y terrazas características, influenciadas por corrientes marinas y con diversidad en su biodiversidad marina. En el sur del Caribe Mexicano, Xahuayxol y Xcalak presentan complejos sistemas de crestas y canales, más desarrollados que en las zonas norteñas de la región (Ruiz-Zárate *et al.*, 2003; Argüelles-Jiménez *et al.*, 2020). Xahuayxol, ubicado en 18°30'21.78"N, 87°45'24.84"O, tiene una cresta arrecifal semicontinua y una laguna poco profunda de entre 250 y 800 metros de ancho y menos de 4 metros de profundidad (Acevedo-Ramirez *et al.*, 2021; Ruiz-Zárate *et al.*, 2000). Xcalak, el sitio más al sur en 18°14'7.68"N, 87°50'1.46"O, se encuentra dentro del Parque Nacional Arrecifes de Xcalak (PNAX), delimitando el límite marítimo del Caribe Mexicano. Su laguna arrecifal, de hasta 1700 metros de ancho y 5 metros de profundidad, es la más amplia entre las áreas estudiadas (Hernández-Arana *et al.*, 2010).

Tanto Xahuayxol como Xcalak sostienen lagunas arrecifales con parches de macroalgas, corales escleractinios, hidrocorales, octocorales y praderas de pastos marinos en sustratos arenosos (Hernández-Arana *et al.*, 2010; Schmitter-Soto *et al.*, 2018). Al norte, Mahahual (18°42'16.96"N, 87°42.619"O) ha sufrido degradación de arrecifes debido a la actividad humana en las últimas dos décadas (Martínez-Rendis *et al.*, 2016). Cuenta con una laguna arrecifal más estrecha, de entre 230 y 450 metros de ancho. Al sur de Mahahual, Xahuayxol tiene una laguna más amplia, que se extiende entre 300 y 500 metros desde la costa hasta la cresta arrecifal (Cabanillas-Terán *et al.*, 2019).

El suroeste de Cozumel presenta una disposición estructural única, con una serie de tres terrazas, frecuentemente cubiertas de sedimento y delimitadas por escalones donde se desarrollan formaciones arrecifales (Muckelbauer, 1990). A aproximadamente 5, 10 y 20 metros bajo el nivel del mar, se encuentran formaciones arrecifales discontinuas que siguen los contornos de las terrazas (Pérez-Posada *et al.*, 2023). Estos arrecifes marginales muestran un gradiente norte-sur de creciente complejidad estructural y diversidad de hábitats (Muckelbauer, 1990). Influenciado por la Corriente de Yucatán, que fluye de sur a norte, el área también experimenta corrientes costeras inducidas por mareas y vientos estacionales. La

costa occidental de Cozumel, protegida desde 1980 y declarada Parque Nacional en 1996, se beneficia de esfuerzos de conservación gestionados por la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP), cubriendo 11,987.87 hectáreas (Chávez et al., 2003).

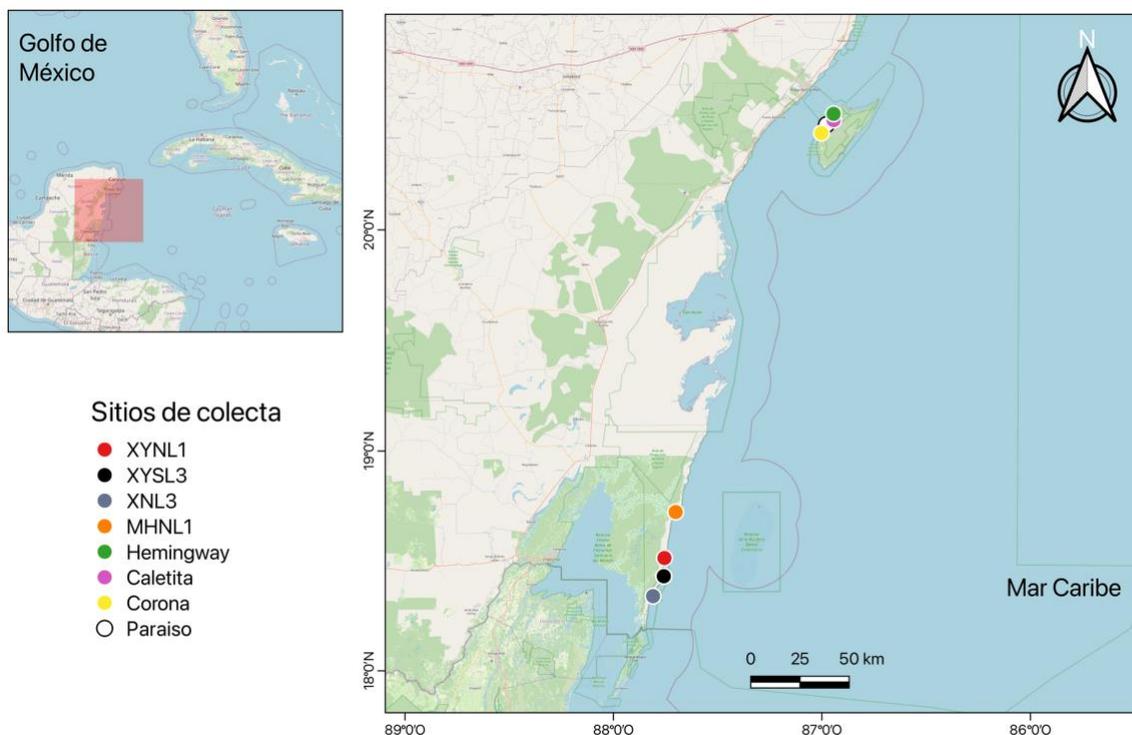


Figura 4. Sitios de muestreo en las localidades de Xahuayxol, Xcalak, Mahahual y Cozumel. Mapa base obtenido de OpenStreetMap.

7.2 Trabajo de campo

Los muestreos aleatorios se enfocaron en la especie de erizo negro *Diadema antillarum*, por lo que cada sitio fue evaluado para localizar áreas con alta densidad de individuos, así como posibles signos de enfermedad en los organismos, tales como pérdida de espinas o pérdida de consistencia en las mismas. Estos sitios se dividieron en áreas de control (sin signos de enfermedad) y áreas enfermas que presentaban erizos que mostraban síntomas iniciales de la patología, en dónde se recolectaron individuos aparentemente sanos y enfermos.

7.3 Recolección de muestras

En la recolección de muestras, se obtuvieron 12 erizos sanos en el sitio de control. Los erizos se manipularon con herramientas como rastrillos de mano o alambres doblados y se colocaron

en bolsas Ziploc numeradas. En el sitio enfermo, se recolectaron 15 erizos: 12 aparentemente sanos y tres con síntomas iniciales de enfermedad, siguiendo el mismo procedimiento de manejo y almacenamiento. Las muestras recolectadas en los diferentes sitios (Tabla I) fueron clasificadas de manera organizada y específica, asignándoles códigos únicos que permitieron una identificación precisa durante el proceso de análisis. Esta clasificación detallada facilitó el manejo y análisis de las muestras, garantizando que cada espécimen pudiera ser rastreado con precisión a su sitio de origen. El sistema de organización se detalla en la tabla a continuación:

Tabla I. Información de las muestras de *Diadema antillarum* recolectadas en el Caribe mexicano para el análisis histopatológico.

Localidad	Sitio de Muestreo	No. De muestras	
		sanas	enfermas
Xahuayxol	XYNL1	3	0
	XYSL3	3	3
Xcalak	XNL3	3	0
Mahahual	MHNL1	3	0
Cozumel	Hemingway	3	0
	Caletita	3	0
	Corona	3	0
	Paraíso	3	0
Total		24	3

7.4 Procesamiento de muestras para histología

Para la fijación de muestras, los erizos recolectados se sumergieron en formalina al 10% diluida en agua de mar. Luego, se transportaron al laboratorio en hieleras con temperatura controlada para evitar su degradación. En el laboratorio, las muestras se sometieron a descalcificación y a una serie de deshidrataciones con alcohol etílico de concentraciones crecientes, seguidas de aclaramiento con xilol y una infiltración con parafina a temperaturas entre 56 y 62 °C. La tinción histológica incluyó la aplicación de Hematoxilina de Gill y Eosina-Floxina mediante un protocolo estándar de desparafinación, hidratación, tinción, deshidratación y aclaramiento final con Citrisolv ®. El desparafinado se realizó en tres

soluciones de xilol sucesivas (5 minutos en Xilol I, y 15 baños o 5 minutos en Xilol II y III). La hidratación se efectuó mediante baños en alcoholes de concentración decreciente y un enjuague final en agua destilada. Los cortes se hicieron con un grosor de 5 micras, utilizando un micrótomo.

En la tinción con Hematoxilina de Gill, las muestras se sumergieron durante 10 minutos, se enjuagaron con agua corriente y se diferenciaron en agua acidificada al 1%. Luego, se realizó un enjuague en bicarbonato de sodio hasta obtener una coloración azulada. Para la tinción con Eosina-Floxina, las muestras se sumergieron en la solución durante 3 minutos para resaltar estructuras acidófilas. La deshidratación final incluyó inmersiones en alcohol etílico y alcohol isopropílico al 95% y 100%, y el aclaramiento final se realizó en Citrisolv en tres etapas. Por último, las laminillas teñidas se montaron en medio permanente Cytoseal XYL para su conservación y protección.

7.5 Frotis de heces

Se hicieron tres frotis de heces de cada erizo, tomando una muestra del contenedor donde se encontraba cada individuo con una pipeta de plástico, colocándola en un portaobjetos cubierta con cubreobjetos y se observó en el microscopio a 10 y 40x. Este proceso se repitió tres veces con cada uno de los 27 individuos, dando un total de 81 frotis realizados con el objetivo de identificar posibles agentes patógenos como son los ciliados.

7.6 Análisis microscópico de las muestras

Después de clasificar las placas por tipo de tejido se hizo la evaluación histológica para describir los diferentes tejidos en erizos sanos y se buscó identificar señales de enfermedad en tejidos de erizos a través de la descripción de lesiones morfológicas, empleando microscopía de luz en el laboratorio. Se examinaron seis tejidos diferentes de 27 individuos (24 sanos y tres enfermos), aparato bucal (Linterna de Aristóteles; n = 17), intestino (n = 25) y recto (n = 25), tejido ambulacral-interambulacral aboral (AIA; n = 26), tejido ambulacral-interambulacral oral (AIO; n = 27), y gónadas (n = 27), con un total de 147 placas.

Este estudio es de naturaleza descriptiva y experimental, enfocado en la recopilación y análisis de muestras biológicas en los sitios de estudio seleccionados dentro del sistema de arrecifes del Caribe Mexicano. En esta tesis se hizo una caracterización histológica de erizos sanos y se investigaron las posibles causas de esta afección mediante enfoques histológicos

e histopatológicos, a través de la comparación de tres tipos de *D. antillarum*: individuos sanos de sitios enfermos, individuos con señales de enfermedad de sitios enfermos, e individuos sanos de sitios de control.

8. Resultados

8.1 Descripción histológica de individuos sanos

8.1.1 Sistema tegumentario

Tejido ambulacral-interambulacral aboral (AIA) y ambulacral-interambulacral oral (AIO).

En este tejido se encontraron estructuras pertenecientes a pedicelios (Figura 4), espinas (Figura 5a), pies ambulacrales, y ámpulas pertenecientes al canal de agua radial (Figura 5b). Estas estructuras junto con los epitelios epidérmico y celómico conforman la testa del erizo y están divididos en oral y aboral. En la placa ambulacral, los pies ambulacrales (podios) son más abundantes en el hemisferio oral (Figura 6b). Las espinas son abundantes en el interambulacro y los pies ambulacrales están presentes en la superficie externa, siendo estos últimos más abundantes en el hemisferio oral especialmente cerca de los tejidos branquiales (Figura 6).

Las glándulas están formadas por tres lóbulos (Figura 5), y recubiertas de una capa de tejido epitelial alrededor del pedicelio (Figura 5b), estas células suelen ser cilíndricas o prismáticas y están organizadas en una capa relativamente delgada; además de tejido conectivo (Figura 5c), que comunica, sostiene y organiza otros tejidos como las glándulas, proporcionando soporte y flexibilidad.

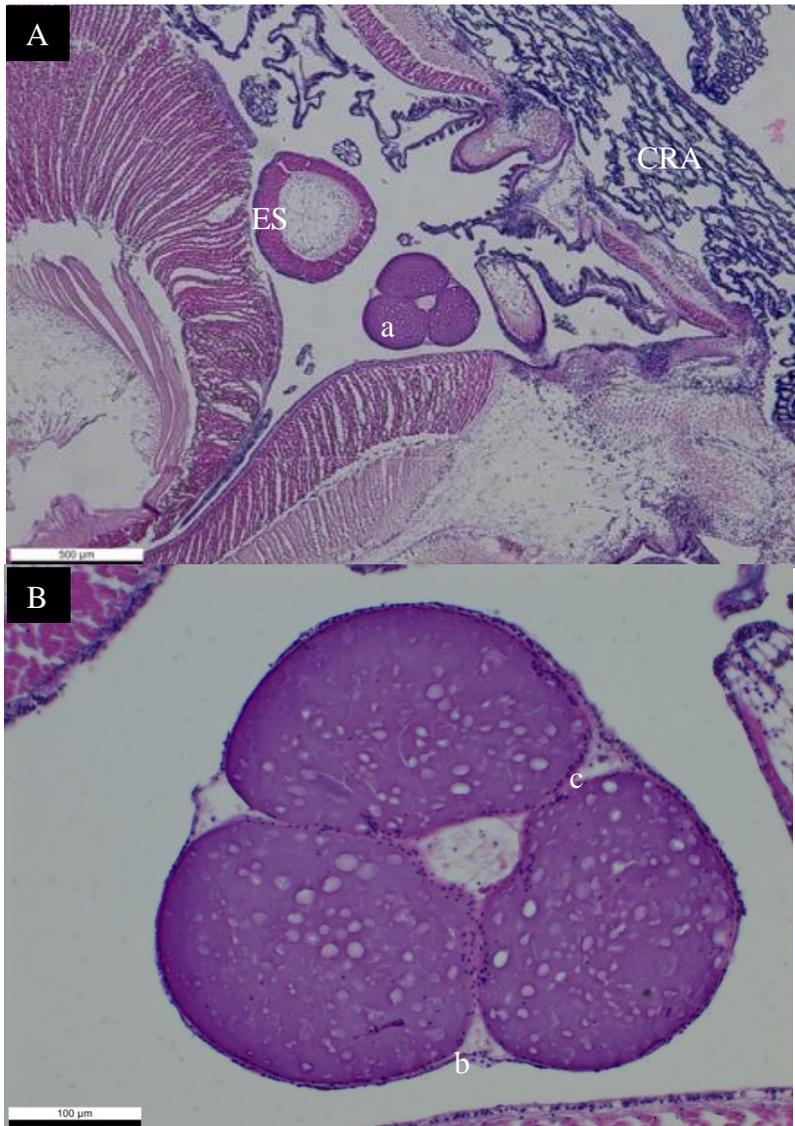


Figura 5. A, pedicelario (a) en la sección ambulacral- interambulacral oral; B, epidermis (b) y tejido conectivo (c) en corte transversal del pedicelario. CRA = canal radial de agua, ES = espina.

Desde el madreporito, el agua se desplaza por el canal de agua radial hacia los pies ambulacrales. En cada pie ambulacral, el agua llena una vesícula o ampulla que, al contraerse, genera presión para extender el pie y permitir el movimiento (Figura 6). En la sección ambulacral se señala una zona de tejido en el centro de la imagen que se encuentra distorsionada, esto podría deberse a que a la hora de montar en la placa el tejido se movió; el

tejido que aparece distorsionado está conectado a los vasos del canal radial de agua, por lo que podrían ser pies ambulacrales (Figura 6).

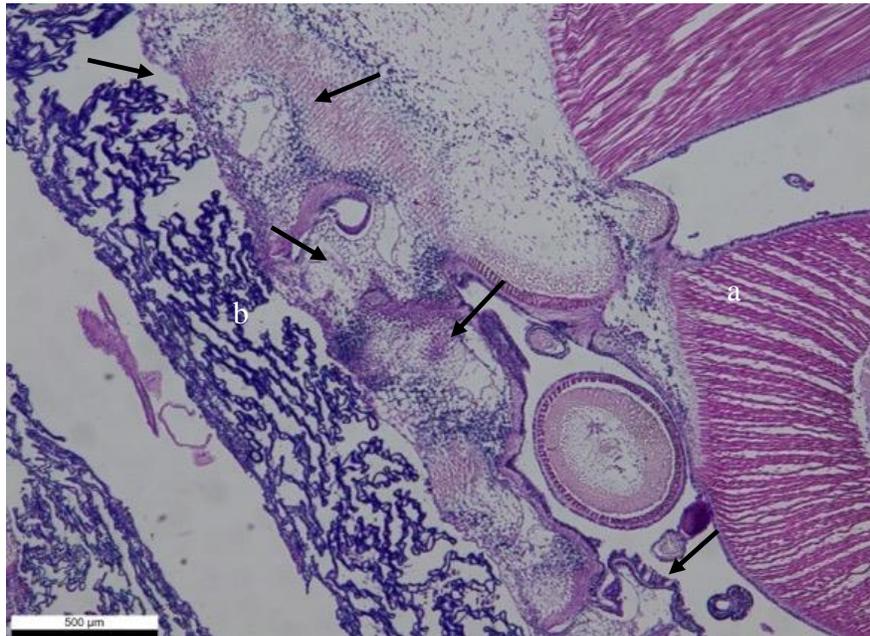


Figura 6. Espinas (a) y ámpulas (b) en sección ambulacral. Las flechas señalan estructuras similares a podios.

Los pies ambulacrales son estructuras tubulares con una anatomía compleja, que incluye varias capas histológicas. El revestimiento externo de cada pie está compuesto por un epitelio exterior con células columnares (Figura 7), debajo de esta epidermis se encuentra una capa de tejido nervioso que controla la función del pie (Figura 7). En el interior del pie ambulacral, se observa un lumen o cavidad central que está revestido por epitelio celómico y que funciona como cámara para el movimiento hidráulico (Figura 7). Este lumen está rodeado por fibras musculares longitudinales que se contraen para extender o retraer el pie, permitiendo que el erizo se mueva o se adhiera a superficies (Figura 7). Las espinas están cubiertas externamente por una capa de epidermis (Figura 8). La parte interna de la espina contiene una matriz de tejido conectivo (Figura 8c).

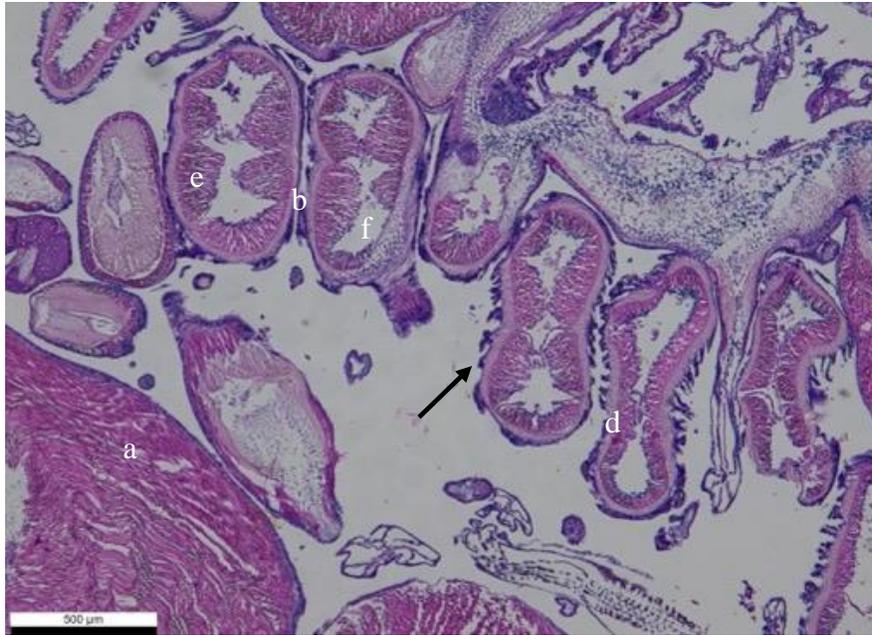


Figura 7. Espinas primarias (a) y pies ambulacrales (b). Se señala epidermis con flecha, tejido nervioso (d), fibras musculares (e) y lumen (f) de los podios.

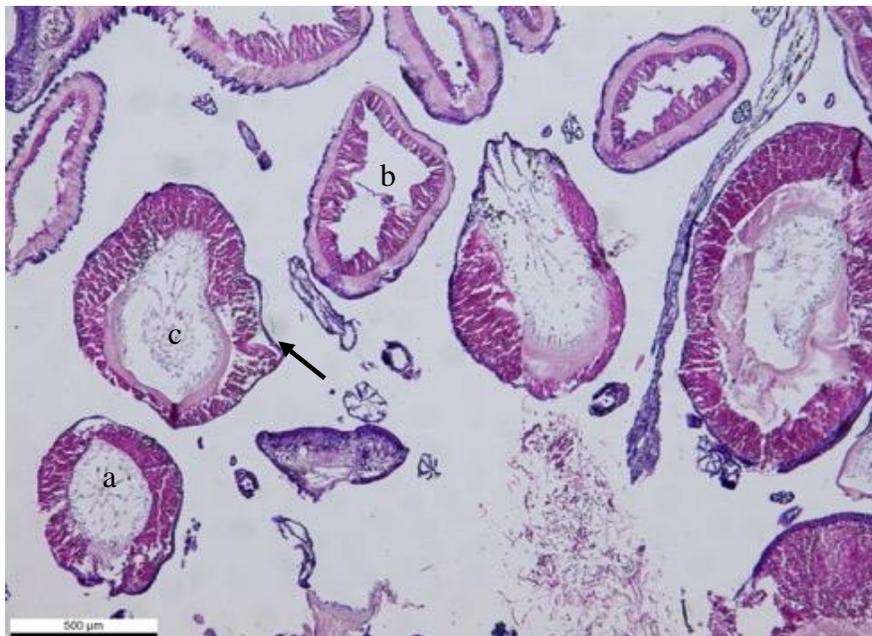


Figura 8. Espinas secundarias (a) y pies ambulacrales (b). Se señala epidermis con flecha, y estructura central (c) de las espinas.

8.1.2 Sistema gastrointestinal

Las características histológicas consideradas en esta sección caracterizan el sistema digestivo desde la boca hasta el ano.

Aparato bucal (Linterna de Aristóteles)

En las placas del aparato bucal se observaron estructuras como la faringe (Figura 9a) y la boca (Figura 10a) que contienen células mucosas en la capa epitelial y están ubicadas en el centro de la Linterna de Aristóteles. El músculo interpiramidal (Figura 9b) conecta la pirámide (tejido mandibular) y las rótulas a través de ligamentos y fibras colágenas (Figura 9b). Los dientes son proyectados mediante el empuje de toda la linterna hacia la región oral, un movimiento facilitado por la contracción de músculos protractores en forma de lámina (Figura 10c). Estos músculos se originan alrededor de la boca, en la zona interambulacral, y se insertan en las epífisis, cerca del extremo aboral de cada pirámide.

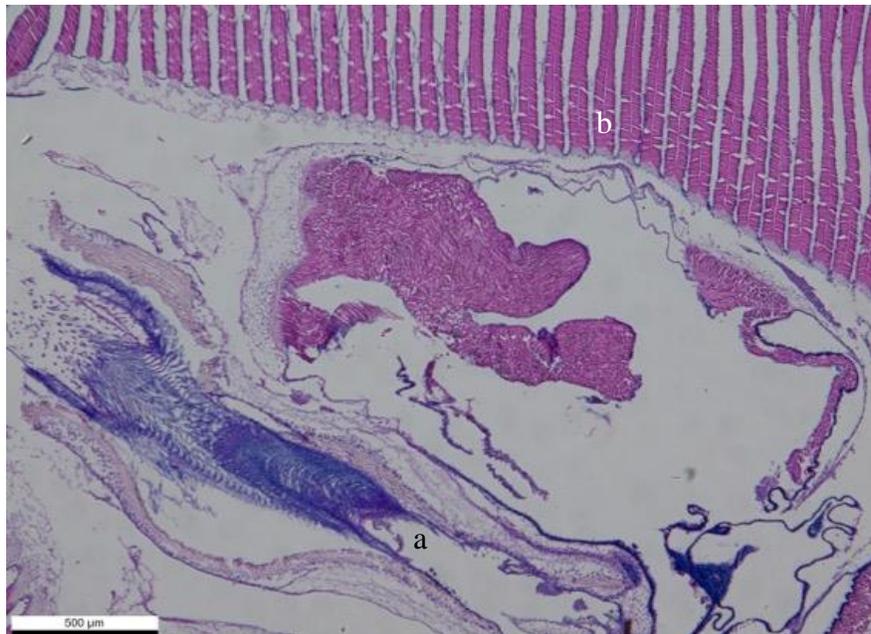


Figura 9. Faringe (a), músculos interpiramidales (b).

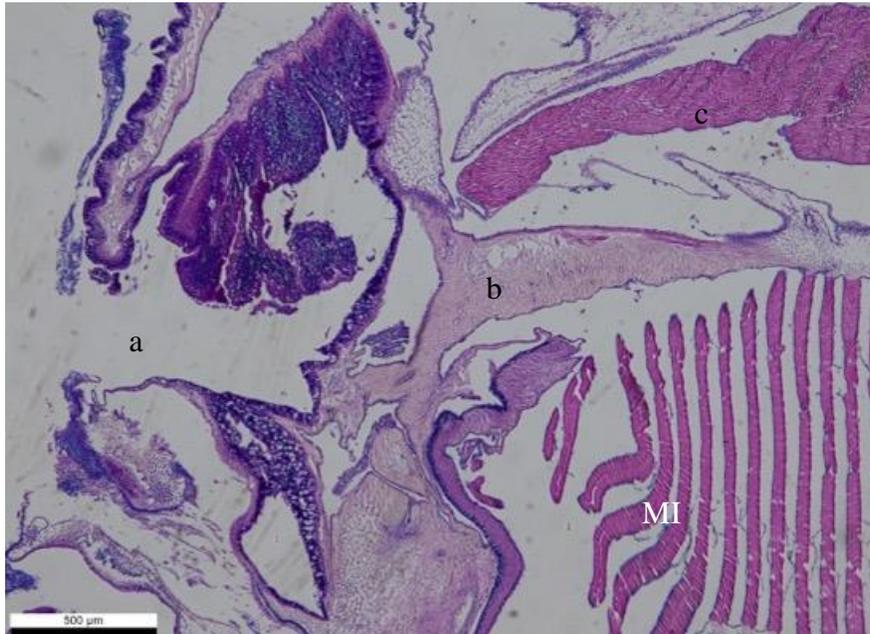


Figura 10. Boca (a), ligamentos (b), y músculo protector (c). MI = músculo interpiramidal

Intestino

Es posible identificar el intestino por su característica constitución ondulada en segmentos que tienden a enrollarse en sí mismos (Figura 11), aunado a su conformación trilaminar, donde se puede observar un epitelio columnar simple ciliado (Figura 12EC), seguido de tejido conectivo (Figura 12TC) que está sobre una capa basal mioepitelial (Figura 12CB); ambas secciones del intestino, delgado y grueso, se pueden diferenciar por las características morfofuncionales de su epitelio, ya que estas cambian según la zona en la que nos encontremos. Por ejemplo, las microvellosidades en general del intestino delgado tienden a ser más largas que las del intestino grueso (Figura 12), asimismo, podemos encontrar mayor cantidad de enterocitos glandulares (células secretoras de mucosa) que en el intestino grueso (Figura 13).



Figura 11. Sección de intestino delgado (a) con materia orgánica en su interior e intestino grueso (b). Se aprecia gónada en esquina inferior derecha (c).



Figura 12. Intestino grueso. epitelio columnar = EC, tejido conectivo = TC, capa basal = CB

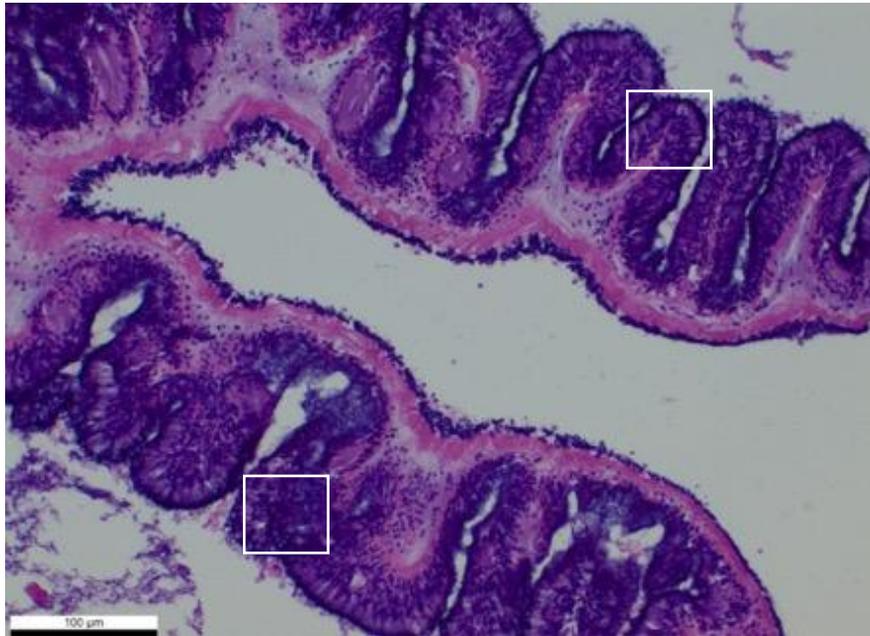


Figura 13. Intestino delgado. Microvellosidades señaladas en recuadros.

Recto

Es posible diferenciar el recto (Figura 14) del intestino porque a pesar de que su constitución es curva, no genera ondulaciones circulares, sino que tiene secciones más alargadas e irregulares; igualmente posee conformación trilaminar, donde se observa un epitelio ciliado columnar simple, seguido de tejido conectivo considerablemente más grueso que el del intestino (Figura 15a), que está sobre una capa basal mioepitelial, además, las microvellosidades de los enterocitos no glandulares tienden a ser más largas en comparación del intestino delgado (Figura 15b).

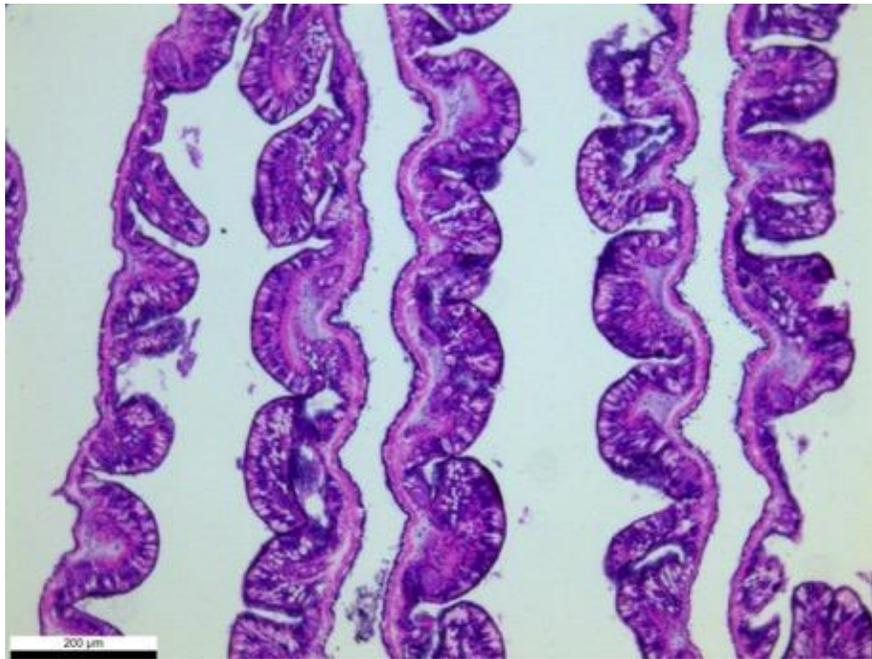


Figura 14. Recto

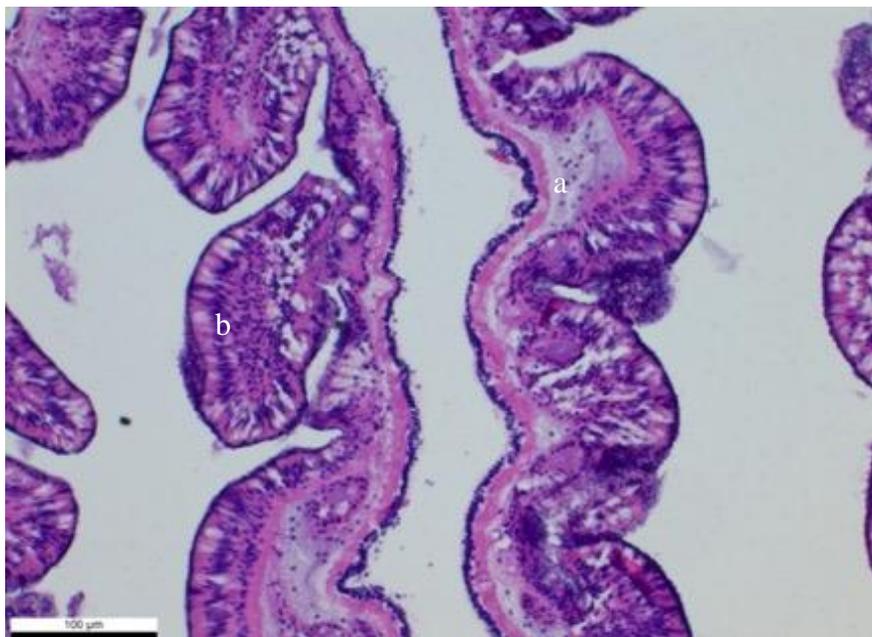


Figura 15. Conformación trilaminar del recto, tejido conectivo (a), microvellosidades de los enterocitos no glandulares (b).

8.1.3 Sistema reproductivo

Gónadas

Debido a que los erizos de mar son organismos dióicos, las gónadas están bien diferenciadas, y dependiendo del sexo producen espermátidas dentro de los testículos (Figura 16) u oocitos dentro de los ovarios (Figura 16), estas estructuras son órganos saculares grandes y ramificados. El epitelio de revestimiento (Figura 17) es el elemento más externo de la pared gonadal, mientras que las células germinales conforman estos órganos. Mediante el procesamiento histológico de las gónadas es posible sexar a los individuos, de los 27 individuos procesados en este estudio, 16 son hembras (Figura 17) y 11 son machos (Figura 17).

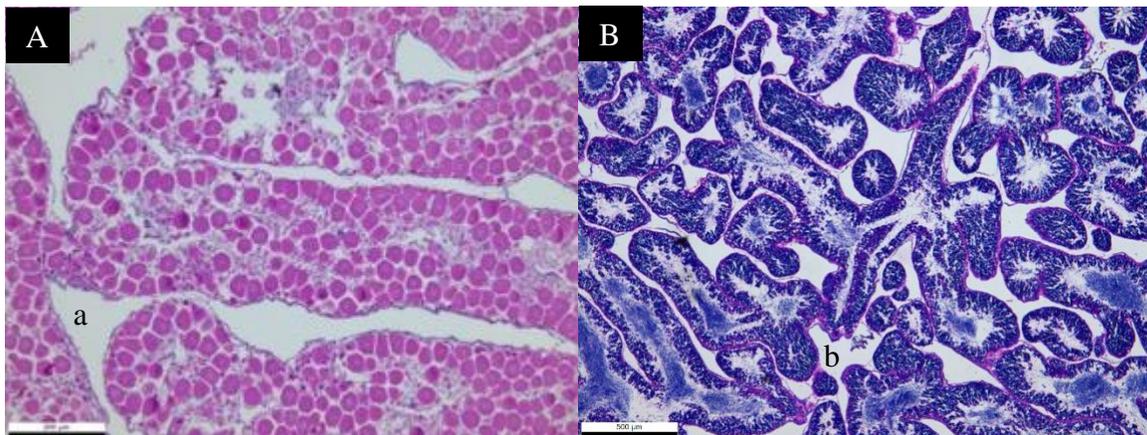


Figura 16. Ovarios (a) y testículos (b).

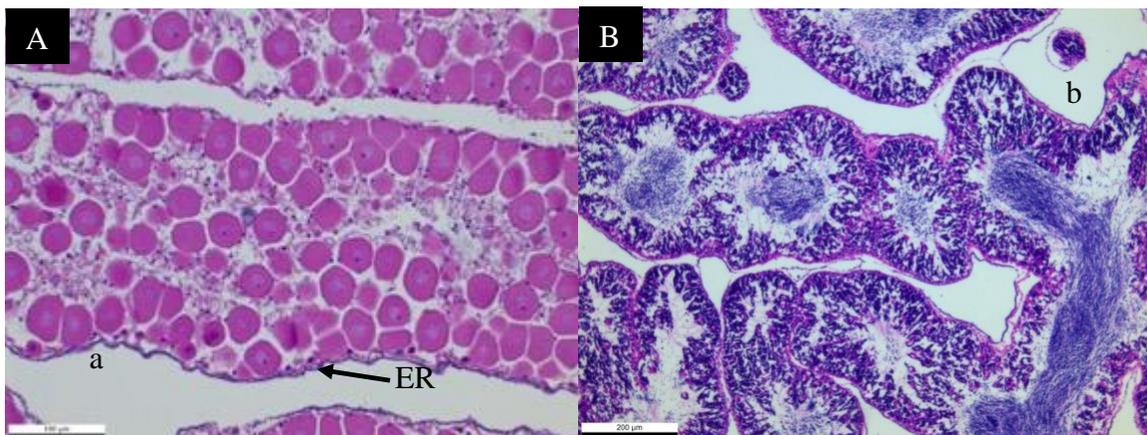


Figura 17. Oocitos (a) y espermátidas (b). Epitelio de revestimiento = ER

8.2 Hallazgos histopatológicos en los individuos

Del total de los 27 ejemplares colectados, se observaron anomalías en diferentes tejidos de 20 individuos. Es importante mencionar, que no sólo fue posible observar lesiones morfológicas en los tres individuos caracterizados en campo como enfermos, sino además en ocho sanos de los sitios control y en nueve aparentemente sanos de los sitios considerados enfermos. Dentro de las diferentes condiciones anormales encontradas en los tejidos destacan las señales de necrosis en diferentes tejidos (Figura 18), pigmentos cafés (Figura 24), colonias bacterianas (Figura 20) y aglomeraciones de celomocitos (Figuras 23, 25). Estas condiciones pueden o no estar relacionadas con la presencia de ciliados en los diferentes tejidos. En la presente sección se muestran las anomalías que se observaron en los seis diferentes tejidos examinados. Los tejidos con mayor prevalencia de anomalías fueron los del tegumento, es decir, Tejido ambulacral-interambulacral aboral (AIA) y ambulacral-interambulacral oral (AIO).

Tejido ambulacral-interambulacral aboral (AIA) y ambulacral-interambulacral oral (AIO).

En las muestras analizadas de este tejido, el 44.4% (n = 27, individuos totales) de los individuos presentaron anomalías sin importar el estado de salud ni el sitio de colecta. El 66.6% (n = 2) de los individuos enfermos presentaron anomalías, el 41.6% (n = 5) de los individuos sanos de los sitios de control y del mismo modo 41.6% (n = 5) de los individuos aparentemente sanos de los sitios considerados enfermos. La presencia de anomalías en la testa incluyó tanto la zona oral como la aboral con presencia de ciliados, así como señales de necrosis en espinas (Figura 19 y 21), pedicelario (Figura 18), y agregaciones celulares en espinas (Figura 20). Se identificó una sección de pedicelario con signos evidentes de necrosis licuefactiva, una alteración que no estaba presente en otras áreas del mismo tejido. En esta región específica, el pedicelario perdió completamente su estructura normal, transformándose en una masa de apariencia líquida y viscosa (Figura 18).

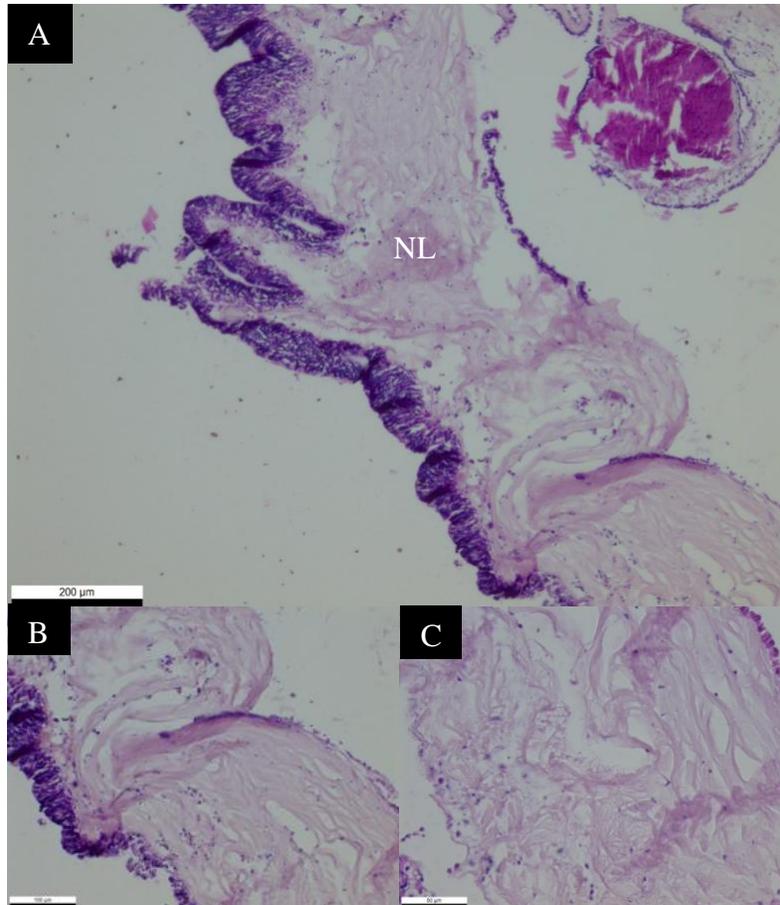


Figura 18. Sección histopatológica pedicelario que presenta necrosis licuefactiva (NL).

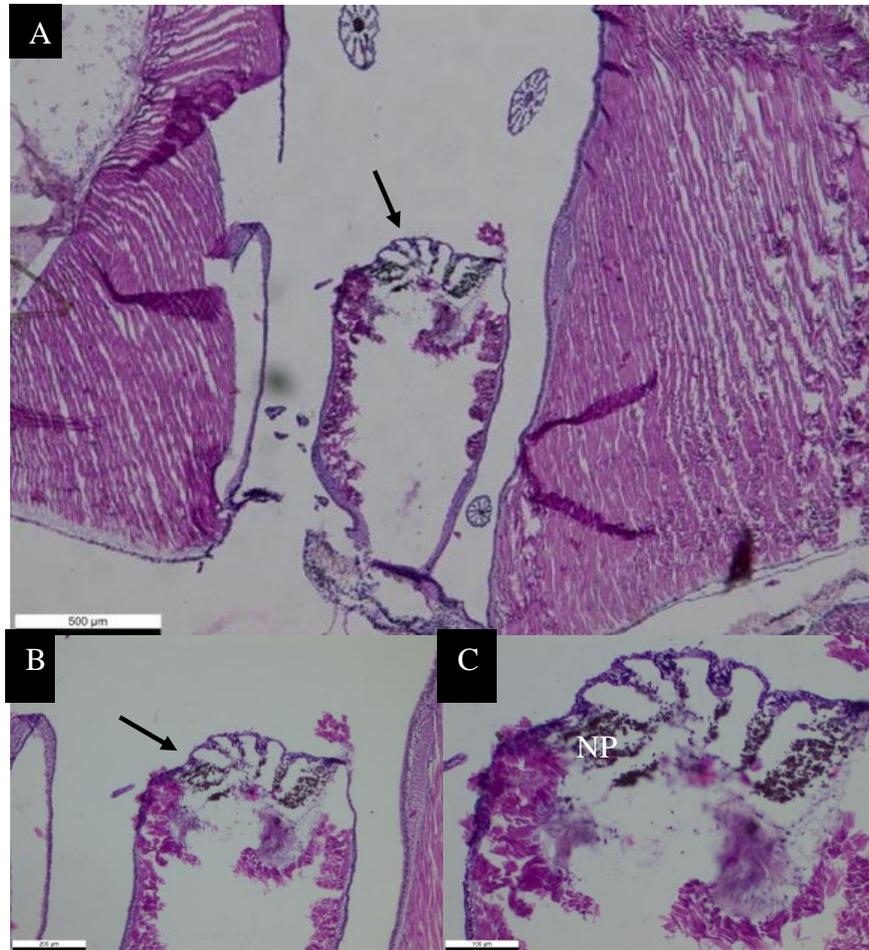


Figura 19. A. Sección histopatológica de tejido ambulacral-interambulacral aboral (AIA) con necrosis en espina. B. La flecha señala los núcleos picnóticos en la espina. C. NP = núcleos picnóticos.

Durante la evaluación de la testa, se detectó una espina con una morfología alterada. Al inspeccionarla con aumentos mayores en el microscopio, se identificaron colonias bacterianas adheridas a la superficie, que se distinguían por un tono púrpura que contrastaba con el tejido circundante. Estas colonias no solo estaban pegadas al epitelio de recubrimiento (Figura 20), sino que también alteraban la estructura normal de la espina (Figura 20). La presencia de las bacterias parecía interferir con la disposición habitual de estas estructuras, sugiriendo un posible impacto en la integridad estructural de la espina y evidenciando un proceso patológico activo en el tejido afectado (Figura 20).

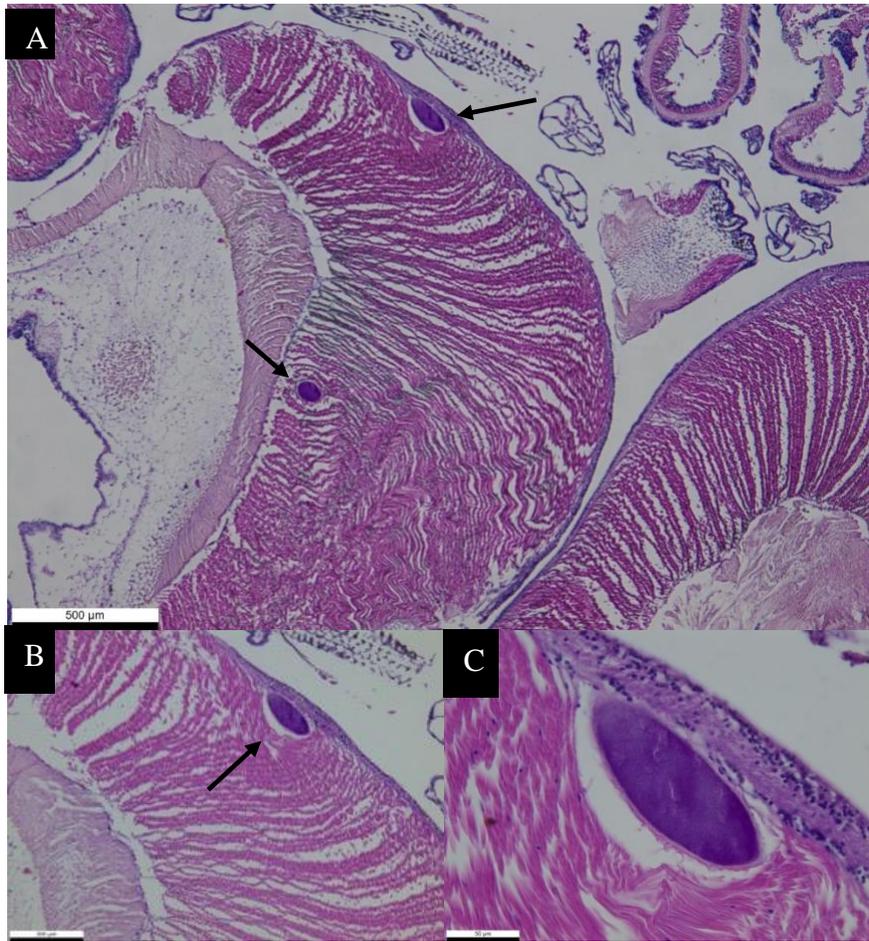


Figura 20. A. Sección histopatológica de tejido ambulacral-interambulacral oral (AIO) con colonias bacterianas en espina. B. La flecha señala colonia bacteriana. C. Magnificación a 50 micras.

Además, se identificó una espina con una morfología visiblemente anormal. Al observar esta irregularidad, se decidió inspeccionarla en detalle mediante aumentos en el microscopio para captar cualquier anomalía estructural que pudiera estar presente. Bajo una mayor magnificación, se localizaron núcleos picnóticos en el tejido (Figura 21), indicando signos de daño celular y posible apoptosis en la región afectada.

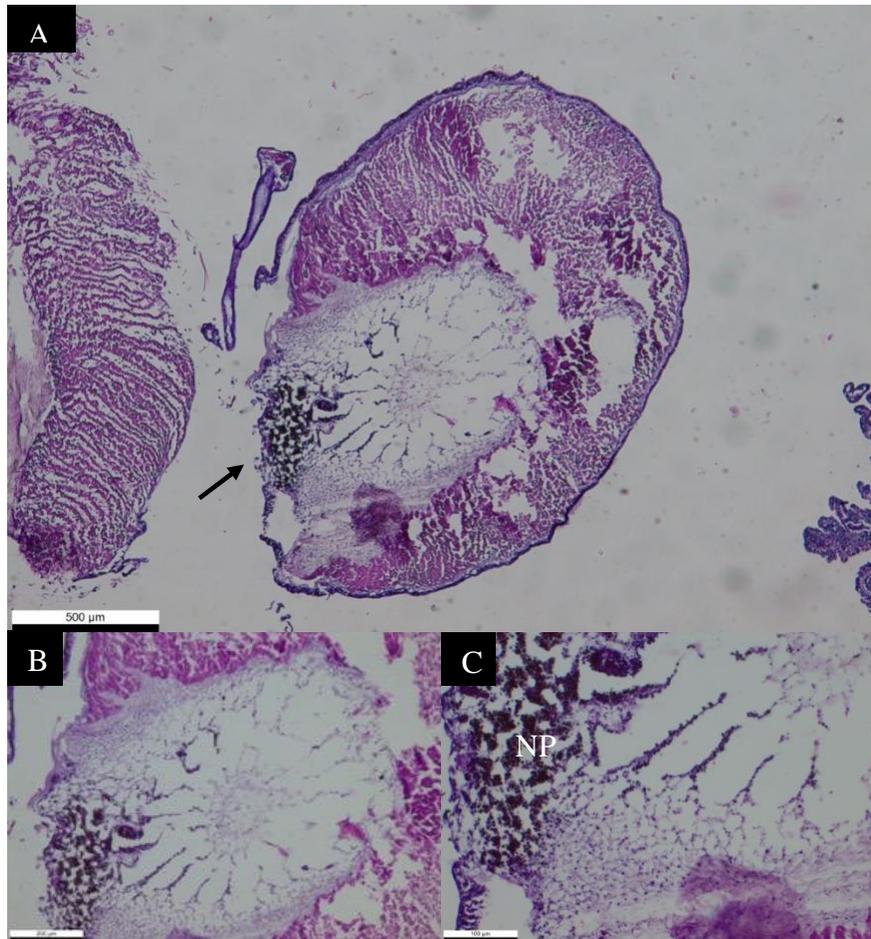


Figura 21. Sección histopatológica de tejido ambulacral-interambulacral oral (AIO) con necrosis en espina señalada con flecha (A). NP = nucleos picnóticos.

Aparato bucal (Linterna de Aristóteles)

En cuanto al aparato bucal se observaron ciliados en branquias y en los músculos interpiramidales, así como necrosis y señales de inflamación en músculos interpiramidales. Anormalidades que se identificaron en el 14.8% (n = 27, individuos totales) de los individuos sin importar el estado de salud ni el sitio de colecta. No se reportan en los individuos enfermos; pero sí hubo anomalías en 17.6% (n = 3) de los individuos sanos de los sitios de control y en el 8.3% (n = 1) de los individuos aparentemente sanos de los sitios considerados enfermos.

Intestino

En la sección de tejido intestinal se detectaron ciliados (Figura 22 y 23), así como necrosis licuefactiva no asociadas con los microorganismos mencionados (Figura 24); además se observaron espacios vacíos en las terminaciones de las microvellosidades, aunado con acumulación de celomocitos (Figura 23). Estas anomalías se identificaron en el 22.2% (n = 27, individuos totales) de los individuos sin importar el estado de salud ni el sitio de colecta. En el 33.3% (n = 1) de los individuos enfermos, en 8.3% (n = 1) de los individuos sanos de los sitios de control y en el 33.3% (n = 4) de los individuos aparentemente sanos de los sitios considerados enfermos.

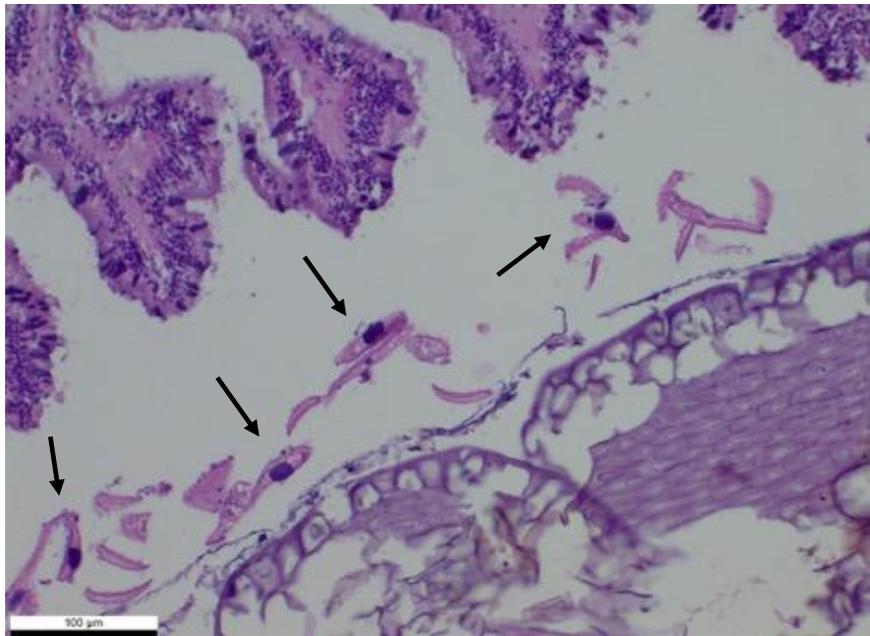


Figura 22. Sección histopatológica de intestino con presencia de ciliados.

La alteración anterior, lo indica una degradación o pérdida de estructura en la superficie de absorción intestinal. Estas anomalías podrían sugerir un proceso patológico localizado, ya que las demás regiones del intestino mantenían una estructura íntegra y sin signos de alteración.

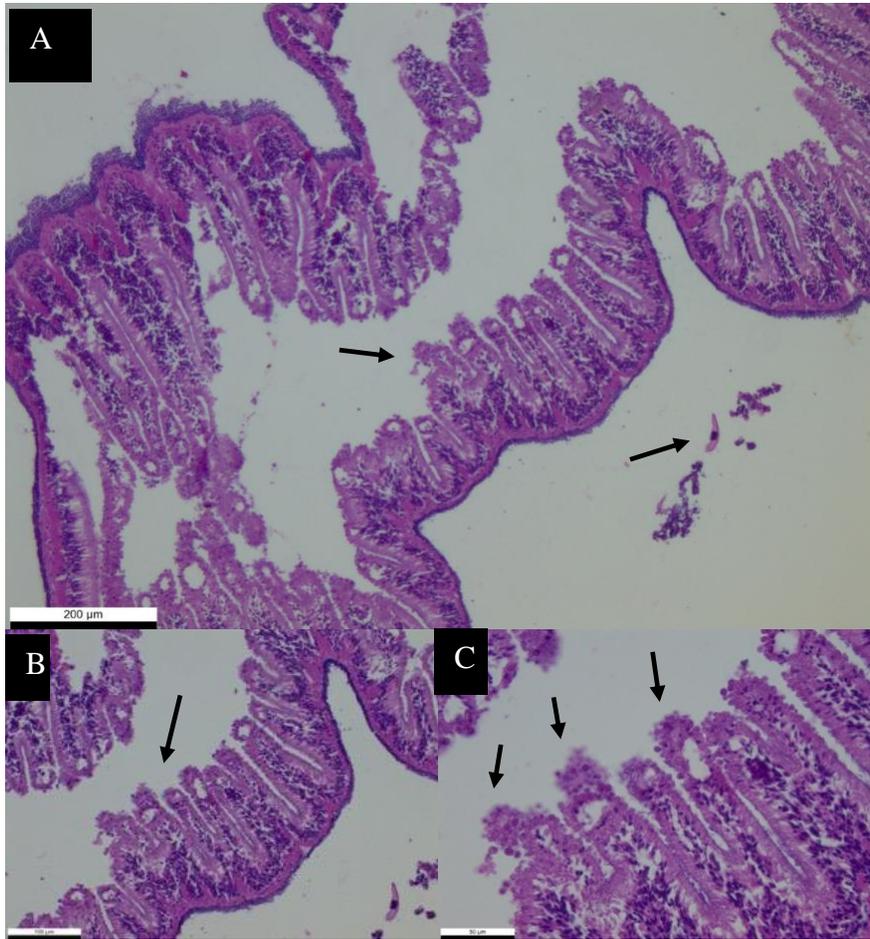


Figura 23. A. Sección histopatológica de intestino con presencia de ciliado. B. Huecos en microvellosidades. C. Huecos y acumulación de celomocitos.

También, se identificó una sección con signos evidentes de necrosis licuefactiva, un tipo de muerte celular en la que el tejido afectado se transforma en una masa de apariencia líquida y viscosa debido a la acción de enzimas digestivas; una alteración que no estaba presente en otras áreas del mismo tejido. En esta región específica, el intestino había perdido completamente su estructura trilaminar normal, transformándose en una masa líquida y viscosa (Figura 24) . Este daño significativo contrastaba con las secciones sanas del tejido, donde la estructura trilaminar se mantenía íntegra y organizada.

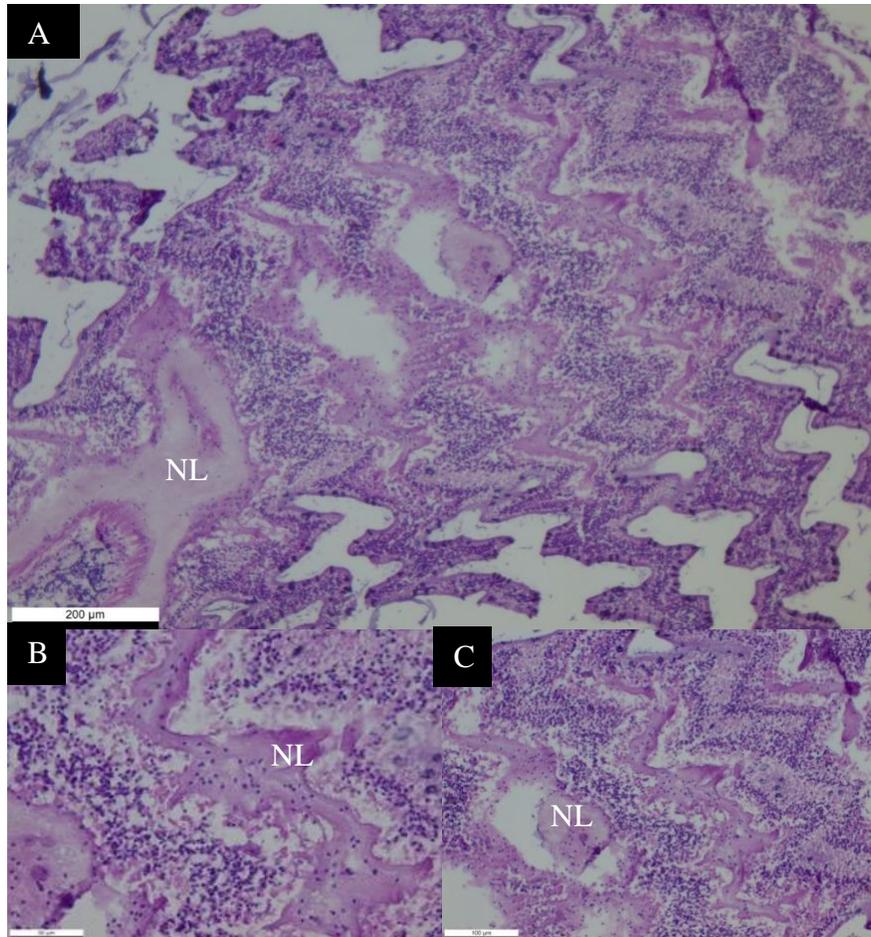


Figura 24. Sección histopatológica de intestino que presenta necrosis. NL = Necrosis licuefactiva.

Recto

Durante la evaluación de las placas de recto, se identificaron múltiples alteraciones patológicas que no estaban presentes en otras áreas del tejido. En estas secciones, se observaron colonias bacterianas (Figura 25) y la presencia de ciliados, ambos indicativos de posibles infecciones en la región. Además, se detectó la acumulación de pigmentos marrones (Figura 25b, d, f) que podrían estar relacionados con procesos de oxidación o daño tisular. También se observó una acumulación notable de celomocitos (Figura 26), células implicadas en la respuesta inmunitaria, lo que sugiere una reacción del organismo frente a los agentes invasores o al daño tisular. Estas alteraciones estructurales y celulares mostraban una respuesta patológica activa en estas secciones de recto, distinta a la apariencia normal del tejido en otras zonas analizadas. Anormalidades que se identificaron en el 14.8% (n = 27,

individuos totales) de los individuos presentaron anomalías sin importar el estado de salud ni el sitio de colecta. En el 66.6% (n = 2) de los individuos enfermos, en 8.3% (n = 1) de los individuos sanos de los sitios de control y en el 8.3% (n = 1) de los individuos aparentemente sanos de los sitios considerados enfermos.

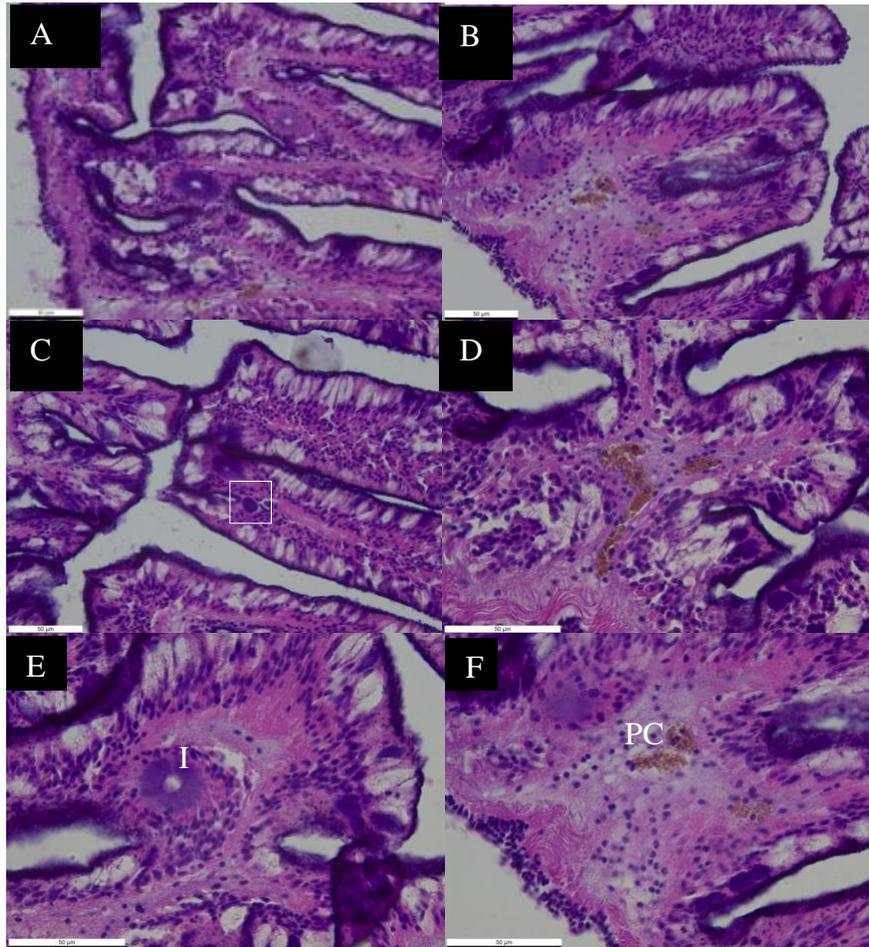


Figura 25. A-F. Sección histopatológica de diferentes zonas del recto con inflamación, pigmentos cafés, y colonias bacterianas señaladas con un cuadro. I = inflamación, PC = pigmentos cafés.

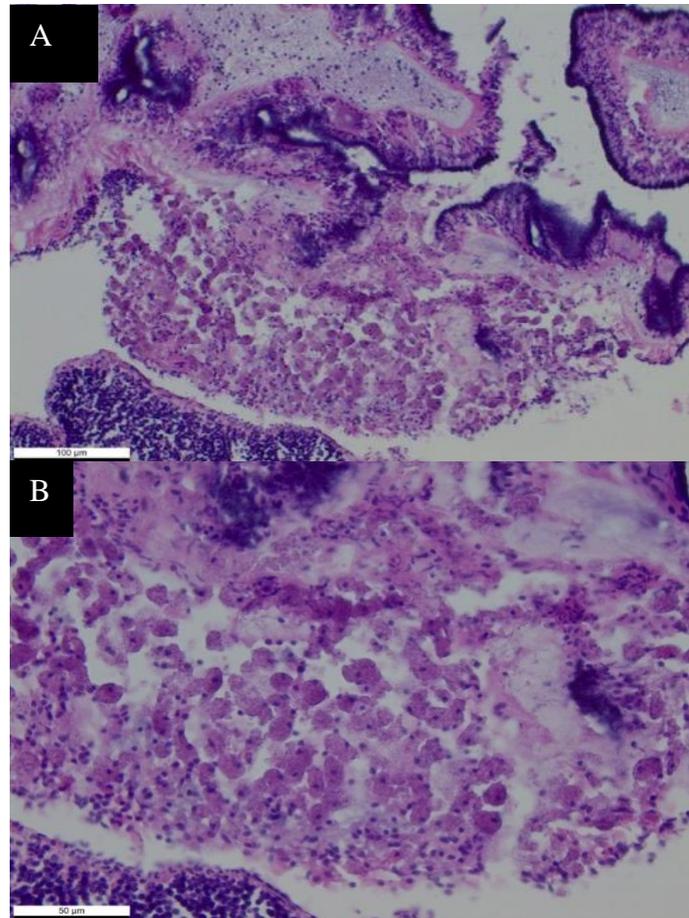


Figura 26. Sección histopatológica de recto con acumulación de celomocitos.

Gónadas

La presencia de anomalías en las gónadas incluyó pigmentos cafés (Figura 27), así como presencia de ciliados y células germinales atrésicas (Figura 28) en las que no se reconocen en las etapas de desarrollo. Estas anomalías se identificaron en el 11.1% ($n = 27$, individuos totales) de los individuos sin importar el estado de salud ni el sitio de colecta. Se identificaron en el 66.6% de los individuos enfermos ($n = 2$), en el 8.3% de los individuos aparentemente sanos de los sitios considerados enfermos ($n = 1$); mientras que en los individuos sanos de los sitios de control no se detectaron anomalías.

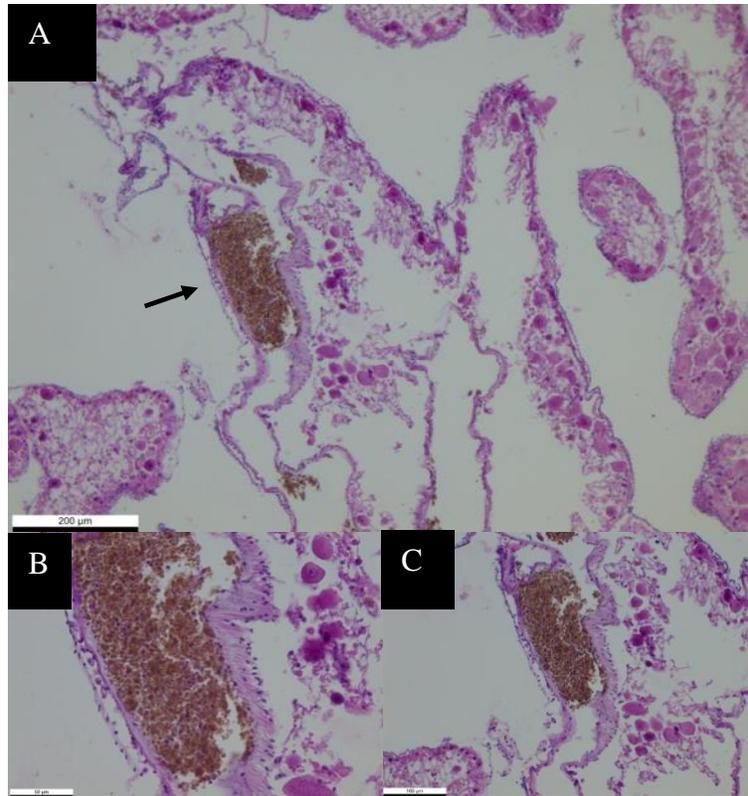


Figura 27. Sección histopatológica de gónada con pigmentos cafés.

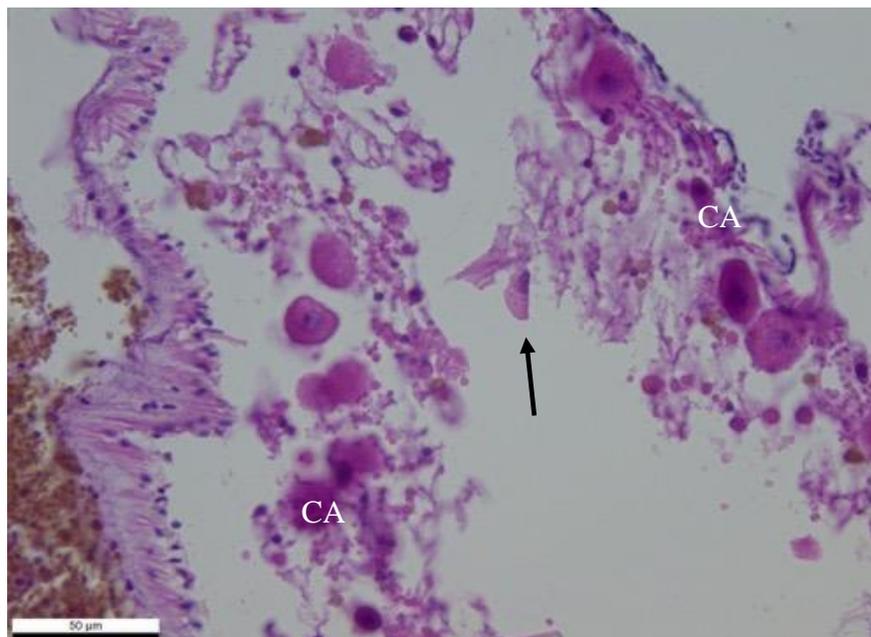


Figura 28. Sección histopatológica de gónada con ciliado (flecha). CA = células germinales atéricas.

8.3 Frotis heces

Se hicieron tres frotis de heces por individuo en búsqueda de ciliados, el contenido se caracterizó generalmente por materia orgánica siendo la mayoría restos de algas, se encontraron ~98 ciliados en 48 muestras de 81 frotis que se hicieron en total (tres por cada uno de los 27 individuos), así pues, 59% del total de los individuos colectados presentaron algún tipo de ciliado en sus heces. Se encontraron tres tipos de ciliados que aún no se logran identificar, pero cada uno muestra una morfología diferente, el primero tiene una forma alargada y presenta cilios en todo su margen externo (Figura 29), el segundo tiene forma de candado y la mayoría de los cilios los presenta en los bordes del “gancho” o curvatura que se forma en la parte superior (Figura 30), mientras que el último tiene una morfología ovalada con extremos puntiagudos, presentando siempre en un extremo un “cuerno” y los cilios en el extremo opuesto (Figura 31).



Figura 29. Escuticocilio similar a *Philaster apodigitiformis* encontrado en frotis de heces. Magnificación a 40x.



Figura 30. Ciliado similar a *Parametopidium circumlabens* encontrado en frotis de heces. Magnificación a 40x.



Figura 31. Escuticocilio similar a *Entorhipidium triangularis* encontrado en frotis de heces. Magnificación a 40x.

9. Discusión

Para comprender plenamente un evento de mortalidad masiva, se requieren estudios que proporcionen las piezas faltantes para resolver el enigma sobre su origen. Para esto, es necesario considerar muchas perspectivas y hacer análisis completos de distintos factores para poder llenar los vacíos de las interrogantes existentes. De acuerdo con las estimaciones iniciales se esperaba que los individuos recolectados en campo con lesiones macroscópicas evidentes (colectados en sitios enfermos) presentaran señales de daño en por lo menos uno de sus tejidos y una asociación constante con ciliados en cercanía a las zonas de daño. Así pues, los resultados obtenidos demostraron que el 100% de individuos enfermos colectados ($n = 3$) presentaron daño en alguno de sus tejidos; del mismo modo, 74% del total de individuos colectados ($n = 20$) presentaron daño en alguno de sus tejidos. Además, cinco de seis tipos de tejidos presentaron daño en los individuos que fueron recolectados en campo y que presentaban lesiones macroscópicas.

De igual manera, se esperaba encontrar señales de daño en individuos aparentemente sanos colectados en sitios considerados enfermos, y ausencia de anomalías en los individuos considerados sanos colectados en sitios control. Sin embargo, se reportaron lesiones en ocho individuos sanos de los sitios control y en nueve individuos aparentemente sanos de los sitios considerados enfermos. A pesar de esto, no se demostró una asociación constante con ciliados en cercanía a las zonas de daño, ya que las condiciones reportadas pueden o no estar relacionadas con la presencia de ciliados en los diferentes tejidos. Esto nos impide describir a los ciliados como patógenos principales de la enfermedad. Sin embargo su asociación con el daño merece atención

La magnitud total del evento de mortandad de *Diadema antillarum* que comenzó en enero de 2022 aún no se conoce por completo (Hylkema *et al.*, 2023). Comparado con el suceso de 1983-1984, las características de su propagación, los síntomas de la enfermedad y la letalidad varían entre similitudes y diferencias; sin embargo, los signos de enfermedad observados en *D. antillarum* durante el brote de 2022 reflejaron los del evento de mortalidad masiva anterior, incluyendo retraso en el movimiento de las espinas, pérdida de espinas y necrosis (Hylkema *et al.*, 2023).

En el estudio de una enfermedad, es fundamental llevar a cabo distintos tipos de investigaciones, como estudios epidemiológicos, microbiológicos, inmunológicos,

genéticos, ambientales y ensayos clínicos. Sin embargo, la investigación patológica, y en particular la histología, juega un papel clave (Betyna *et al.*, 2018). La histología permite examinar los tejidos afectados por la enfermedad a nivel celular, lo que facilita la identificación de cambios estructurales, como inflamaciones, necrosis o alteraciones en la morfología de las células (Soltysiak *et al.*, 2014). Esta información es esencial para comprender el desarrollo y el impacto de la enfermedad en los organismos, ya que revela los mecanismos internos que podrían estar causando los síntomas visibles y la progresión del daño (Knoblauch *et al.*, 2018). La capacidad de observar directamente los efectos de la enfermedad en los tejidos es una herramienta poderosa para diagnosticar correctamente y desarrollar intervenciones efectivas (Foulds, 1940). Es por esto, que la caracterización histológica de erizos sanos es vital para poder tener un punto de comparación cuando se presenta una enfermedad.

El análisis histopatológico de los tejidos arrojó señales de anormalidades como necrosis en diferentes tejidos Figura, pigmentos cafés Figura, colonias bacterianas y celomocitos. Estas condiciones pueden estar asociadas a la presencia de ciliados, ya que estos organismos están asociados con una respuesta celular del hospedador, indicada por la fagocitosis de objetos presuntamente extraños (Smith *et al.*, 2010). No se observaron ciliados asociados al daño de manera directa, por lo que no es posible confirmar su relación con la enfermedad. Sin embargo, se identificaron señales de daño a nivel microscópico que precedieron a las manifestaciones macromorfológicas en los erizos.

La necrosis, junto con estructuras rotas, fue la anormalidad más prevalente observada en los tejidos de los individuos de *D. antillarum* durante este estudio. Las implicaciones de la necrosis en los individuos pueden variar de acuerdo a la zona y al grado de daño que se presente; una de las implicaciones más comunes es la pérdida de función de las estructuras dañadas como se ha visto en los pies ambulacrales (Hylkema *et al.*, 2023). Este hallazgo coincide con investigaciones previas que han identificado la necrosis como un proceso patológico común en diversos organismos marinos, particularmente en aquellos expuestos a condiciones de estrés ambiental o infecciones (Bernet *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 2020). La necrosis es una forma de muerte celular asociada a procesos patológicos, caracterizada por un daño celular irreversible debido a estímulos nocivos (Adigun *et al.*, 2019). Presenta varios patrones microscópicos, incluidos los de necrosis liquefactiva, coagulativa, caseosa, grasa y

fibrinoide, cada uno con características macroscópicas e histológicas distintas (Tonnus *et al.*, 2019).

Histológicamente, la necrosis suele mostrar infiltrados inflamatorios, pérdida de la arquitectura celular y cambios tisulares específicos según el tipo (Adigun *et al.*, 2019; Guillen-Climent *et al.*, 2020). Por ejemplo, la necrosis licuefactiva observada en una sección histopatológica del recto y en un pedicelio (Figuras 17, 23) se caracterizó por la disolución y destrucción de las células y tejidos de las estructuras de estos tejidos, resultando en un líquido viscoso y una pérdida de la estructura normal del recto (Figura 14). La necrosis licuefactiva puede presentarse como una pérdida de la estructura celular original, donde se observa una sustancia homogénea, viscosa y frecuentemente teñida, lo que indica la presencia de componentes celulares destruidos, a menudo con una marcada infiltración de células inflamatorias, como neutrófilos, que contribuyen a la descomposición de los tejidos (Adigun *et al.*, 2019).

En este estudio, se observó la presencia de celomocitos en el tracto digestivo de algunos individuos colectados, lo que sugiere una posible respuesta inmune localizada en esta área. Los celomocitos son células inmunitarias presentes en invertebrados, que desempeñan roles cruciales en los mecanismos de defensa (Tahseen, 2009). Estas células participan en la fagocitosis, encapsulación e inflamación, así como en la síntesis de factores humorales en anélidos y equinodermos (Tahseen, 2009). En los equinodermos, los celomocitos son esenciales para las respuestas inmunitarias, trabajando junto a los componentes humorales para combatir patógenos (Xue *et al.*, 2023). Aunque estos se encuentran principalmente en el líquido celómico y no suelen reportarse en el tracto digestivo, su aparición en el recto podría indicar una reacción ante estrés o infecciones locales, como las que pueden derivarse de la exposición a patógenos en el entorno (Smith *et al.*, 2010).

Además, se reporta la presencia de pigmentos cafés en tejidos del tracto digestivo y reproductivos. La presencia de estos pigmentos suele indicar procesos de daño celular. Puede deberse a 1) melanina, que se acumula en respuesta a daños o exposición a radiación, 2) lipofuscina, un pigmento de envejecimiento celular que refleja estrés oxidativo crónico; o a la oxidación de lípidos y proteínas en tejidos dañados o necrosados (Shimizu, 1994). A pesar

de los diferentes posibles orígenes de estos pigmentos, se han reportado en las gónadas de erizos que atraviesan un proceso de enfermedad como resultado de degeneración de celomocitos (Shimizu, 1994). La aparición de estos pigmentos podría estar relacionada con procesos de acumulación de productos metabólicos derivados de una respuesta inmune o inflamatoria, ya que se ha sugerido que los pigmentos oscuros en los tejidos de equinodermos podrían ser indicadores de actividad de células inmunitarias como los celomocitos (Levitan, 1991; Smith *et al.*, 2010). Sin embargo, es necesario realizar estudios adicionales para determinar si estos pigmentos tienen un papel específico en la respuesta inmune de los erizos así como si son un subproducto de la exposición a patógenos o estrés ambiental.

Durante el análisis histológico de los tejidos, se observó la presencia de colonias bacterianas en algunas regiones, particularmente en el tegumento y en el intestino. Estas colonias fueron similares a las reportadas por Francis-Floyd *et al.* (2020), que demostraron mediante tinción Gram además de la tinción Hematoxilina-Eosina, las cuales se encontraron asociadas con áreas de daño tisular, sugiriendo una posible relación entre la infección bacteriana y la respuesta inflamatoria observada; pero en el caso de este estudio, no hay daño aparentemente asociado a ellas. Sin embargo, aunque las colonias bacterianas presentes en los tejidos pueden surgir por infección patógena, cuando las bacterias aprovechan una lesión o sistema inmunológico debilitado, también pueden ser parte de la microbiota normal o simbiótica que beneficia al animal sin causar daño (Proctor *et al.*, 2006). Además, los procesos de descomposición tras la muerte y factores como ambientes contaminados o estrés también favorecen la colonización bacteriana al reducir la eficacia del sistema inmunológico (Burcham *et al.*, 2019). Es importante destacar que, si bien estas bacterias no fueron observadas en todos los individuos, su presencia en tejidos específicos podría ser indicativa de infecciones secundarias relacionadas con desequilibrios en el ecosistema o con una mayor susceptibilidad del huésped debido a factores estresantes.

Se ha documentado que ciertos ecosistemas marinos, como los lechos de pastos marinos, actúan de manera efectiva para reducir la carga de patógenos en la columna de agua, contribuyendo así a la salud general de los ecosistemas coralinos (Lamb *et al.*, 2017). En áreas donde predominan especies como *Thalassia testudinum*, *Syringodium filiforme* y *Halophila stipulacea*, la presencia de estos pastos parece estar correlacionada con menores concentraciones de patógenos bacterianos en el agua, lo cual se asocia con una mejora en las

condiciones de salud para los corales y otras especies marinas (Lamb et al., 2017; Hewson et al., 2023). La acción filtradora de estos pastos marinos no solo captura sedimentos, sino que también ayuda a mitigar la proliferación de patógenos en el entorno, lo que podría reducir la carga de organismos dañinos para especies como *Diadema antillarum*.

Sin embargo, la degradación de los ambientes marinos, a menudo causada por factores como la contaminación y la sobreexplotación, puede llevar a un aumento de zonas sin cobertura de algas pero ricas en nutrientes (Godard et al., 2024). Las áreas con aguas tranquilas y cercanas a puertos suelen ser más propicias para el crecimiento de patógenos, especialmente en ambientes ricos en nutrientes (Godard et al., 2024). Estas condiciones crean un entorno favorable para el crecimiento rápido y descontrolado de microorganismos patógenos, que pueden dispersarse fácilmente en el ecosistema circundante, particularmente en condiciones de aguas estancadas o con poca circulación (Lamb et al., 2017; Godard et al., 2024). La concentración de nutrientes y el bajo movimiento de agua facilitan el establecimiento de estos patógenos, aumentando así el riesgo de enfermedades en la fauna marina cercana.

Además, los factores de estrés ambiental, tales como cambios en la temperatura del agua, salinidad, contaminación o desequilibrio en nutrientes, pueden afectar a las poblaciones de erizos incluso en sitios considerados sanos (Medina-Voguel, 2010). Este estrés crónico puede alterar la fisiología de los erizos, comprometiendo su sistema inmunológico y favoreciendo la aparición de daños tisulares debido a la reorientación de recursos hacia la supervivencia (Alonso et al., 2007).

Por otro lado, los patógenos que causaron la mortalidad masiva podrían haber persistido en el ambiente, afectando incluso a individuos en sitios no considerados directamente infectados. Este contacto con patógenos en el ambiente, aunque en menor cantidad o menos agresivos que en sitios más afectados, podría generar lesiones internas en los erizos aparentemente sanos. Se planteó la hipótesis de que el patógeno responsable de la mortalidad masiva de *Diadema antillarum* en 2022, se diseminó a través de corrientes marinas en toda la región del Caribe (Hewson et al., 2023). De hecho, el brote de 2022 se expandió rápidamente a través de distancias considerables, aproximadamente 1,300 km de norte a sur y 2,500 km de este a oeste, lo que apoya la idea de que el patógeno se movía a través de corrientes oceánicas (Lessios, 2016; Hylkema et al., 2023). Esto sugiere que,

aunque en ciertas áreas se redujo la exposición directa, las corrientes podrían haber llevado pequeñas cantidades del patógeno a sitios considerados controlados, causando efectos subclínicos en la fauna local.

Los microorganismos oportunistas también podrían haber jugado un papel, al aprovechar la debilidad de los erizos y causar infecciones secundarias. Dentro de las morfologías encontradas en los frotis de heces se observaron ciliados que han sido reportados como endosimbiontes en equinodermos (Lynn y Strüder-Kypke, 2005; da Silva-Neto *et al.*, 2016), como un ciliado similar al metópido *Parametopidium circumlabens* (Figura 29), y un escuticociliado similar a *Entorhipidium triangularis* (Figura 30). La relación entre los erizos de mar y los ciliados, como *Parametopidium circumlabens*, *Entorhipidium triangularis* y otros escuticociliados, es generalmente de tipo endosimbiótica, con estos microorganismos habitando en el tracto digestivo de los erizos, donde podrían contribuir al proceso digestivo o a la salud intestinal del huésped (Levine, 1972). Sin embargo, estos ciliados tienen un comportamiento oportunista y, bajo condiciones de estrés, pueden convertirse en patógenos (Hewson *et al.*, 2023). En situaciones de desequilibrio, como el estrés ambiental o una reducción en la inmunidad del erizo, estos organismos pueden proliferar descontroladamente y provocar daños en el tejido, inflamación e incluso afectar la función digestiva de su huésped (Lynn y Strüder-Kypke, 2005).

Dado que nunca se identificó un agente causante responsable de la mortandad de 1983-1984, la principal prioridad de investigación para la mortandad de 2022 debería ser identificar su causa. En este contexto, existen investigaciones que señalan varios factores como posibles causas detrás de la mortalidad masiva de *Diadema antillarum*. En primer lugar, se identificó un escuticocilio similar a *Philaster apodigitiformis* como el agente responsable de la mortandad, ya que este microorganismo fue consistentemente asociado con erizos anormales en sitios afectados, y se demostró que podía causar síntomas similares al ser inoculado en erizos sanos (Hewson *et al.*, 2023). Además, se observaron condiciones ambientales anormales en algunos sitios, como grandes masas de agua turbia y lluvias intensas que precedieron a la mortandad (Hylkema *et al.*, 2023); sin embargo, en otros lugares no se detectaron anomalías, lo que sugiere que los factores ambientales no fueron responsables en todos los casos.

También se han propuesto factores de estrés ambiental y disbiosis microbiana como desencadenantes, dado que estos pueden afectar la salud de los organismos y predisponerlos a infecciones (Ruiz-Barrionuevo *et al.*, 2024). Finalmente, la propagación del escuticocilio podría haber sido facilitada por corrientes de agua, balsas de *Sargassum*, peces migratorios o aves marinas, lo que contribuiría a la diseminación del patógeno en distintas áreas del Caribe (Hewson *et al.*, 2023). Estos factores indican que la mortalidad masiva de *D. antillarum* es un fenómeno complejo que involucra interacciones entre microorganismos patógenos y las condiciones ambientales.

Hewson *et al.* (2023) reportaron que de todos los especímenes anormales, la mayor abundancia de ciliados se observó en los tejidos de la base de las espinas y en la pared corporal, mientras que los ciliados rara vez se detectaron en muestras del tracto digestivo o de la gónada, y que la detección poco frecuente en el tracto digestivo y en las gónadas de los erizos anormales sugiere que la infección de ciliados es externa y no un crecimiento excesivo debido a estrés antes de la muerte o a una propagación postmortem. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en esta tesis debido a que hubo una mayor presencia de anormalidades en el tejido ambulacral-interambulacral de la testa tanto en la zona oral como en la aboral en comparación con el tracto digestivo y las gónadas. Estos hallazgos resultan relevantes para este trabajo de investigación, ya que de igual manera se hallaron ciliados tanto en los frotis como en los tejidos de los erizos. Se distinguieron tres morfologías diferentes dentro de todas las muestras observadas, aunque los ciliados encontrados aún no han sido identificados, lo que podría representar una señal de enfermedad o susceptibilidad causada por un sistema inmune deficiente.

Del mismo modo, la prevalencia de anormalidades en los tejidos examinados en esta tesis, concuerda con el patrón de aparición de ciliados similares a *Philaster* reportado por Hewson *et al.* (2023), ya que sugieren que la asociación inicial ocurre en los pies ambulacrales, las espinas y las bases de las espinas; luego, en los tejidos de la pared corporal alejados de las bases de las espinas y, por último, en el fluido celómico de especímenes anormales. Esto puede explicar por qué a pesar de tener un número bajo de individuos con señales de enfermedad en la muestra, reportamos anormalidades en todos los tejidos de manera congruente con la sugerencia de los autores. Ya que los tejidos con mayor prevalencia

de anomalías fueron los del tegumento, esto quiere decir que la infección comienza en la parte exterior del erizo y avanza cada vez más hacia tejidos internos.

A pesar de que en este trabajo no se identificó a los ciliados encontrados, se pudieron diferenciar las morfologías encontradas. Una de ellas, destaca por su similitud con el ciliado similar a *Philaster* reportado por Hewson *et al.* (2023) (Figura 31B). Que al mismo tiempo presenta una morfología consistente con taxones de escuticiliados (Sweet *et al.*, 2014; Pan *et al.*, 2015). El ciliado encontrado en diferentes frotis de heces, presenta una forma alargada y presenta cilios en todo su margen externo (Figura 31A).



Figura 32. Ciliados con morfologías similares a las descritas para *Philaster sp.* En A se muestra el ciliado en este estudio; mientras que en B se muestra el ciliado reportado por Hewson *et al.* (2023.)

Un estudio realizado por Ruiz-Barrionuevo *et al.* (2024) de la microbiota indica un cambio notable en las comunidades bacterianas del intestino de *D. antillarum* durante el evento de mortalidad, respaldado por una gran diversidad bacteriana y diferencias en la composición en comparación con la microbiota de los individuos de *Diadema* recolectados en 2019. Esta disbiosis podría estar relacionada con la patogénesis y ser una consecuencia directa del escuticociliado *Philaster apodigitiformis*, dado que los animales recolectados en 2022 presentaron signos compatibles con escuticociliatosis. Aunque *P. apodigitiformis* tiene el potencial de causar enfermedad, no todos los ciliados inducen disbiosis en *D. antillarum*.

En este sentido, destacan que el microbioma central del grupo afectado por la mortalidad masiva se asemejaba a bacterias comúnmente presentes en la piel y el intestino humano, lo que sugiere que la contaminación antropogénica y la contaminación por aguas residuales podrían haber contribuido a la disbiosis observada en 2022. El escuticocilio se

asocia con erizos que presentan signos de enfermedad, lo que sugiere que el patógeno causa daño a los tejidos del erizo. Esto puede incluir la destrucción de células en los tejidos del cuerpo y la pared del cuerpo del erizo, lo que compromete su salud general. Los signos de enfermedad en los erizos infectados pueden progresar rápidamente, con una muerte que puede ocurrir en cuestión de días después de la aparición de los síntomas. Esto indica que el patógeno tiene un efecto devastador y rápido sobre la salud de los erizos (Hewson *et al.*, 2023).

Es por esto que destacan la relación entre los microbios humanos y las etapas de enfermedad en el erizo de mar de espinas largas, particularmente en el contexto de la contaminación antropogénica, resaltando la compleja interacción entre los estresores ambientales y la salud de los ecosistemas marinos. Aunque estos organismos pueden no ser la causa directa de la muerte en esta especie de erizos, su presencia y multiplicación podrían señalar problemas subyacentes, como la disminución de la función del sistema inmunológico debido a la contaminación, la degradación del hábitat o el cambio climático, que, en última instancia, afectan negativamente la salud de estos organismos marinos.

10. Conclusiones

El análisis histopatológico realizado en *Diadema antillarum* durante este estudio revela una serie de anomalías en diversos tejidos, que incluyen necrosis, pigmentos celulares, colonias bacterianas y acumulaciones de celomocitos. De los 27 individuos colectados, 20 presentaron anomalías en uno o varios tejidos, lo que contradujo la hipótesis planteada porque la prevalencia de lesiones en individuos aparentemente sanos colectados en sitios considerados enfermos, e individuos considerados sanos colectados en sitios control fue mayor de lo que se esperaba. La presencia de ciliados en varios tejidos, como el aparato bucal, intestino, tejido ambulacral-interambulacral, recto y gónadas, podría ser debido a una relación potencial entre estos organismos y la respuesta celular de los erizos, manifestada a través de fagocitosis y formación de aglomeración de celomocitos en diferentes tejidos.

La observación de ciliados en la mayoría de los tejidos afectados en este estudio también resalta la importancia de un sistema inmune funcional y la necesidad de una caracterización histológica completa en erizos sanos para establecer comparaciones en estudios de enfermedades. A pesar de no identificar la causa exacta de las anomalías, la presencia de estos organismos en los tejidos afectados podría ser consecuencia de un desequilibrio inmunológico o ambiental en los ecosistemas marinos.

Las lesiones en tejidos de individuos aparentemente sanos podrían deberse a una combinación de factores, incluyendo infecciones latentes, estrés ambiental, acción de organismos facultativos y la presencia de patógenos en el ambiente, o a un proceso de enfermedad inicial que aún no presenta señales externas. Estas posibles explicaciones subrayan la complejidad del evento de mortalidad y resaltan la importancia de realizar análisis histológicos detallados para entender los efectos a largo plazo de este tipo de eventos en poblaciones de especies clave como *Diadema antillarum* y su papel en los ecosistemas coralinos del Caribe.

El estudio de la patología en *D. antillarum* mediante la histología ofrece una perspectiva clave para comprender los mecanismos de enfermedad en esta especie y resalta la importancia de monitorear factores ambientales y microbiológicos en la conservación de los ecosistemas de arrecifes. La implementación de investigaciones futuras que profundicen en la identificación de los ciliados presentes y en el análisis de factores ambientales podría

proporcionar una comprensión más completa de los factores que desencadenan eventos de mortalidad masiva en *D. antillarum*, y en última instancia, contribuir a su preservación.

11. Referencias

- Acevedo-Ramirez, C. A., Stephenson, W., Wakes, S., y Mariño-Tapia, I. (2021). Wave transformation on a fringing reef system with spur and groove structures. *Journal of Geophysical Research. Oceans*, 126(9). <https://doi.org/10.1029/2020jc016910>
- Adigun R, Bhimji SS, Necrosis, cell (liquefactive, coagulative, caseous, fat, fibrinoid, and gangrenous). (2017). Treasure Island (FL): *StatPearls Publishing*. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430935/>
- Alonso, P. S., González, C. Á., García, P., & Serrano, F. S. (2007). Atresia gonadal durante el ciclo gametogénico de *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 cultivado en la ría de Vigo (noroeste de la península Ibérica). *Boletín. Instituto Español de Oceanografía*, ISSN 0074-0195, Vol. 23, N°. 1-4, 2007, pags. 3-10. 23.
- Argüelles-Jiménez, J., Alva-Basurto, J. C., Pérez-España, H., Zetina-Rejón, M. J., y Arias-González, J. E. (2020). The measurement of ecosystem development in Caribbean coral reefs through topological indices. *Ecological Indicators*, 110(105866), 105866. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105866>
- Arnold, S. N., Steneck, R. S., y Mumby, P. J. (2010). Running the gauntlet: inhibitory effects of algal turfs on the processes of coral recruitment. *Marine ecology progress series*, 414, 91–105. <https://doi.org/10.3354/meps08724>
- Bak, R. P. M., y van Eys, G. (1975). Predation of the sea urchin *Diadema antillarum philippi* on living coral. *Oecologia* 20, 111–115. doi: 10.1007/ BF00369023
- Bak, R. P. M., Carpay, M. J. E., y De Ruyter van Steveninck, E. D. (1984). Densities of the sea urchin *Diadema antillarum* before and after mass mortalities on the coral reefs on curacao. *Marine Ecology Progress Series*. Oldendorf 17 (1), 105–108. doi: 10.3354/meps017105
- Banister, K., A. Campbell. 1985. *The Encyclopedia of Aquatic Life*. New York: Facts of File Publishing.
- Bellwood DR, Hughes TP, Folke C, Nystrom M (2004) Confronting the coral reef crisis. *Nature* 429:827–833
- Betyna, M., y Zieliński, E. (2018). Histology – history, short review of techniques and application in modern science. *Advances in Medical Sciences*. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.1442533>

- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., & Wahli, T. (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of fish diseases*, 22(1), 25-34.
- Bielmyer, G. K., Brix, K. V., Capo, T. R., & Grosell, M. (2005). The effects of metals on embryo-larval and adult life stages of the sea urchin, *Diadema antillarum*. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 74(3), 254–263.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.05.016>
- Bodmer, M. D. V., A. D. Rogers, M. R. Speight, N. Lubbock, y D. A. Exton. (2015). Using an isolated population boom to explore barriers to recovery in the keystone Caribbean coral reef herbivore *Diadema antillarum*. *Coral Reefs*, 34: 1011–1021.
<https://doi.org/10.1007/s00338-015-1329-4>
- Bodmer, M.D.V., Wheeler, P.M., Anand, P. (2021) The ecological importance of habitat complexity to the Caribbean coral reef herbivore *Diadema antillarum*: three lines of evidence. *Scientific Reports*, 11, 9382. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87232-9>
- Burcham, Z. M., Pechal, J. L., Schmidt, C. J., Bose, J. L., Rosch, J. W., Benbow, M. E., y Jordan, H. R. (2019). Bacterial community succession, transmigration, and differential gene transcription in a controlled vertebrate decomposition model. *Frontiers in Microbiology*, 10, 745.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00745>
- Cabanillas-Terán, N., Hernández-Arana, H. A., Ruiz-Zárata, M.-Á., Vega-Zepeda, A., y Sanchez-Gonzalez, A. (2019). Sargassum blooms in the Caribbean alter the trophic structure of the sea urchin *Diadema antillarum*. *PeerJ*, 7(e7589), e7589.
<https://doi.org/10.7717/peerj.7589>
- Carpenter, R. C., (1988). Mass mortality of a Caribbean Sea urchin: immediate effects on community metabolism and other herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 85(2), 511–514.
<https://doi.org/10.1073/pnas.85.2.511>
- Chávez, G., Candela, J., and Ochoa, J. (2003). Subinertial flows and transports in Cozumel Channel. *J. Geophys. Res. Ocean* 108, 1–11. doi: 10.1029/2002jc001456

- Coppard, S.E., y Campbell, A.C. (2005). Taxonomic significance of spine morphology in the echinoid genera *Diadema* and *Echinothrix*. *Invertebrate Biology*, 123, 357-371.
- Costa, P. M., Carreira, S., Costa, M. H., & Caeiro, S. (2013). Development of histopathological indices in a commercial marine bivalve (*Ruditapes decussatus*) to determine environmental quality. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 126, 442–454. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.08.013>
- da Silva-Neto, I. D., da Silva Paiva, T., do Nascimento Borges, B., & Harada, M. L. (2016). Fine structure and molecular phylogeny of *Parametopidium circumlabens* (Ciliophora: Armophorea), endocommensal of sea urchins. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 63(1), 46–61. <https://doi.org/10.1111/jeu.12247>
- Delgado, G., y Sharp, W. (2021). Does artificial shelter have a place in *Diadema antillarum* restoration in the Florida Keys? Tests of habitat manipulation and sheltering behavior. *Global Ecology and Conservation*, 26. <https://doi.org/10.1016/J.GECCO.2021.E01502>.
- DeFilippo, J., Ebersole, J., y Beck, G. (2018). Comparison of phagocytosis in three Caribbean Sea urchins. *Developmental and Comparative Immunology*, 78, 14–25. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.09.007>
- Edmunds P, Carpenter R. (2001) Recovery of *Diadema antillarum* reduces macroalgal cover and increases abundance of juvenile corals on a Caribbean reef. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98:5067–5071
- Edmunds, P., Carpenter, R. (2001). Recovery of *Diadema antillarum* reduces macroalgal cover and increases abundance of juvenile corals on a Caribbean reef. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98, 5067–5071.
- Foulds, L. (1940). The histological analysis of tumours a critical review. *American Journal of Cancer*, 39(1), 1–24. <https://doi.org/10.1158/ajc.1940.1>
- Francis-Floyd, R. (2020). Diagnostic methods for the comprehensive health assessment of the long-spined Sea urchin, *Diadema antillarum*: VM244/VM244, 05/2020. EDIS 2020 (3), 55. [10.32473/edis-vm244-2020](https://doi.org/10.32473/edis-vm244-2020)

- Ganjali, H. (2012). Tissue processing: An Overview. *Annals of Biological Research*, 3, 5374-5378.
- Godard, R. D., Wilson, C. M., Amstutz, C. G., Badawy, N., y Richardson, B. (2024). Impacts of hurricanes and disease on *Diadema antillarum* in shallow water reef and mangrove locations in St John, USVI. *PloS One*, 19(2), e0297026. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0297026>
- Grande, H., Reis, M., y Carvalho, N. F. (2020). Use of the sea urchin *Diadema antillarum* (Echinodermata, Echinoidea) as a shelter for non-cryptobenthic juvenile reef fishes. *Marine Biodiversity*, 50(4). <https://doi.org/10.1007/s12526-020-01081-9>
- Grzimek, B. (1972). *Grzimek's Animal Life Encyclopedia*. New York: Van Norstand Reinhold Company.
- Guillen-Climent, S., García Vázquez, A., Estébanez, A., Pons Benavent, M., Folch Briz, R., Gil Viana, R., Sáez-Martín, L. C., María Martín, J., y Ramón Quiles, M. D. (2020). Subcutaneous fat necrosis of the newborn: clinical and histopathological review and use of cutaneous ultrasound Necrosis grasa subcutánea del recién nacido: revisión clínica e histopatológica y utilidad de la ecografía cutánea. *Dermatology online journal*, 26(11). <https://doi.org/10.5070/d32611046542>
- Hendler, G., J. Miller, D. Pawson, P. Kier. (1995). *Sea Stars, Sea Urchins, and Allies: Echinoderms of Florida and the Caribbean*. Washington: Smithsonian Institution Press.
- Hernández-Arana, H., Espinoza-Ávalos, J., Carrillo, L., Weissenberger, H., GarcíaRivas, M.del C., 2010. Caracterización del ANP parque nacional arrecifes de xcalak y formulación de un programa de monitoreo.
- Hernández, J., Clemente, S., Sangil, C., y Brito, A. (2008). Actual status of the sea urchin *Diadema aff. antillarum* populations and macroalgal cover in marine protected areas compared to a highly fished area (Canary Islands—eastern Atlantic Ocean). *Aquatic Conservation-marine and Freshwater Ecosystems*, 18, 1091-1108. <https://doi.org/10.1002/AQC.903>.
- Hewson, I., Ritchie, I. T., Evans, J. S., Altera, A., Behringer, D., Bowman, E., Brandt, M., Budd, K. A., Camacho, R. A., Cornwell, T. O., Countway, P. D., Croquer, A., Delgado, G. A., DeRito, C., Duermit-Moreau, E., Francis-Floyd, R., Gittens, S., Jr,

- Henderson, L., Hylkema, A., Breitbart, M. (2023). A scuticociliate causes mass mortality of *Diadema antillarum* in the Caribbean Sea. *Science Advances*, 9(16), eadg3200. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adg3200>
- Hughes, T.P. (1994) Catastrophes, phase shifts, and large-scale degradation of a Caribbean coral reef. *Science* 265: 1547 – 1551
- Hylkema, A., Debrot, A. O., van de Pas, E. E., Osinga, R., & Murk, A. J. (2022). Assisted natural recovery: A novel approach to enhance *Diadema antillarum* recruitment. *Frontiers in marine science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.929355>
- Hylkema, A., Kitson-Walters, K., Kramer, P. R., Patterson, J. T., Roth, L., Sevier, M. L. B., Vega-Rodriguez, M., Warham, M. M., Williams, S. M., y Lang, J. C. (2023). The 2022 *Diadema antillarum* die-off event: Comparisons with the 1983-1984 mass mortality. *Frontiers in Marine Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.1067449>
- Hyman, L. H. (1956). *The Invertebrates: Echinodermata, the coelomate Bilateria*. McGraw-Hill.
- Jackson, J. B. C., Kirby, M. X., Berger, W. H., Bjorndal, K. A., Botsford, L. W., Bourque, B. J. (2001). Historical overfishing and the recent collapse of coastal ecosystems. *Science* 293 (5530), 629–637. doi: 10.1126/science.1059199
- Kabu, M., Tosun, M., Elitok, B., y Akosman, M. S. (2015). Histological evaluation of the effects of borax obtained from various sources in different rat organs. *Revista Internacional de Morfologia [International Journal of Morphology]*, 33(1), 255–261. <https://doi.org/10.4067/s0717-95022015000100040>
- Kissling, D. L., Precht, W. F., Miller, S. L., y Chiappone, M. (2014). Historical reconstruction of population density of the echinoid *Diadema antillarum* on Florida Keys shallow bank-barrier reefs. *Bulletin of Marine Science*, 90(2), 665–679. <https://doi.org/10.5343/bms.2013.1022>
- Knoblauch, S.E., Hohl, T.M., y La Perle, K.M. (2018). Pathology Principles and Practices for Analysis of Animal Models. *ILAR journal*.
- Lamb, J. B., van de Water, J. A. J. M., Bourne, D. G., Altier, C., Hein, M. Y., Fiorenza, E. A., Abu, N., Jompa, J., & Harvell, C. D. (2017). Seagrass ecosystems reduce

- exposure to bacterial pathogens of humans, fishes, and invertebrates. *Science (New York, N.Y.)*, 355(6326), 731–733. <https://doi.org/10.1126/science.aal1956>
- Lesser, M., Bythell, J., Gates, R., Johnstone, R., y Hoegh-Guldberg, O. (2007). Are infectious diseases really killing corals? Alternative interpretations of the experimental and ecological data. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 346, 36–44. <https://doi.org/10.1016/J.JEMBE.2007.02.015>.
- Lessios, H. A. (1988). Population dynamics of *Diadema antillarum* (Echinodermata: Echinoidea) following mass mortality in Panama. *Marine Biodiversity*. 99:515–26.
- Lessios, H. A. (2016). The Great *Diadema antillarum* Die-Off: 30 Years Later. *Annual Review of Marine Science*, 8(1), 267–283. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-122414-033857>
- Lessios, H. A., Cubit, J. D., Robertson, D. R., Shulman, M. J., Parker, M. R., Garrity, S. D., et al. (1984a). Mass mortality of *Diadema antillarum* on the Caribbean coast of Panama. *Coral Reefs* 3 (4), 173–182.
- Lessios, H. A. 2005. “*Diadema antillarum* populations in Panama twenty years following mass mortality.” *Coral Reefs* 24: 125–127. <https://doi.org/10.1007/s00338-004-0443-5>
- Lessios, H. A. (1988). Mass mortality of *Diadema antillarum* in the caribbean: What have we learned? *Annual Review of Ecology and Systematics*, 19(1), 371–393. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.19.110188.002103>
- Levine, N. D. 1972. Relationships between certain protozoa and other animals. *En Research in protozoology*, vol. 4, T.-T. Chen (ed.). Pergamon Press, New York, New York, p.291–350.
- Levitan, D. R. (1991). Influence of body size and population density on fertilization success and reproductive output in a free-spawning invertebrate. *The Biological Bulletin*, 181(2), 261–268. <https://doi.org/10.2307/1542097>
- Lewis, J. B. 1964. Feeding and digestion in the tropical sea urchin *Diadema Antillarum* Philippi. *Canadian Journal of Zoology*, 42, 549–557.
- Lewis, J. B., & Saluja, G. (1967). The claviform pedicellariae and their stalk glands in the tropical sea urchin *Diadema Antillarum Philippi*. *Canadian Journal of Zoology*, 45, 1211–1214.

- Liddell, W. D., & Ohlhorst, S. L. (1986). Changes in benthic community composition following the mass mortality of *Diadema* at Jamaica. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 95(3), 271–278. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(86\)90259-5](https://doi.org/10.1016/0022-0981(86)90259-5)
- Lopes, F. F. (2021). Fish diseases analysis used as bioindicators for water quality and its importance for environmental monitoring. *International Journal of Zoological Investigations*, 7(1). <https://doi.org/10.33745/ijzi.2021.v07i01.001>
- Luna, L. G. (1968). *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institutes of Pathology, 3rd Edition*. New York: McGraw-Hill.
- Lynn, D. H., y Strüder-Kypke, M. (2005). Scuticociliate endosymbionts of echinoids (phylum echinodermata): Phylogenetic relationships among species in the genera entodiscus, plagiopyliella, thyrophylax, and Entorhipidium (phylum Ciliophora). *The Journal of Parasitology*, 91(5), 1190–1199. <https://doi.org/10.1645/ge-445r.1>
- Macintyre, I. G., Glynn, P. W., & Hinds, F. (2005). Evidence of the role of *Diadema antillarum* in the promotion of coral settlement and survivorship. *Coral Reefs*, 24(2), 273–273. <https://doi.org/10.1007/s00338-005-0492-4>
- Martínez-Rendis, A., Acosta González, G., Hernández-Stefanoni, J. L., y Arias González, J. E. (2016). Quantifying the reefscape transformation of a coastal Caribbean coral reef during a phase shift and the associated coastal landscape change. *Marine Ecology (Berlin, Germany)*, 37(3), 697–710. <https://doi.org/10.1111/maec.12334>
- Medina-Vogel, G. (2010). Ecología de enfermedades infecciosas emergentes y conservación de especies silvestres. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 42(1). <https://doi.org/10.4067/s0301-732x2010000100003><https://doi.org/10.4067/s0301-732x2010000100003>
- Muckelbauer, G. (1990). The shelf of Cozumel, Mexico: Topography and organisms. *Facies*, 23(1), 201–239. <https://doi.org/10.1007/bf02536714><https://doi.org/10.1007/bf02536714>

- Muthiga, N. A., y McClanahan, T. R. (2013). Diadema. En *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* (pp. 257–274). Elsevier.
- Nichols, D., J. Cooke. (1971). *The Oxford Book of Invertebrates*. Oxford: Oxford University Press.
- Ogden, J.C. y Carpenter, R.C. (1987). Long-Spined Black Sea urchin, Biological report. 82 (11.77) TREL-824. <http://www.osti.gov/scitech/biblio/5892615>
- Olmeda-Saldaña Manuel, S.M. Williams, E. Weil, J.J. Cruz-Motta, Experimental evaluation of *Diadema antillarum* herbivory effects on benthic community assemblages, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, Volume 541, 2021, 151566, ISSN 0022-0981, <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2021.151566>.
- Pan, X., Yi, Z., Li, J., Ma, H., Al-Farraj, S. A., & Al-Rasheid, K. A. S. (2015). Biodiversity of marine scuticociliates (Protozoa, Ciliophora) from China: Description of seven morphotypes including a new species, *Philaster sinensis* spec. nov. *European Journal of Protistology*, 51(2), 142–157. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2015.02.005>
- Pandolfi, J. M., Bradbury, R. H., Sala, E., Hughes, T. P., Bjorndal, K. A., Cooke, R. G. (2003). Global trajectories of the long-term decline of coral reef ecosystems. *Science* 301 (5635), 955–958. doi: 10.1126/science.1085706
- Pérez, A., Gil, D., Rubilar, T., (2014). Echinodermata. En Calcagno, J.A. (Ed). *Los invertebrados marinos*. Fundación de Historia Natural Félix de Azara, Vázquez Mazzini Editores, Buenos Aires, Argentina, 295–316 pp.
- Pérez-Posada, I., Cabanillas-Terán, N., Rosas-Luis, R., Hernández-Arana, H. A., y Sánchez-Gonzalez, A. (2023). Isotopic niche shift in the sea urchins *Echinometra lucunter* and *E. viridis* after massive arrivals of *Sargassum* in the Mexican Caribbean. *Regional Studies in Marine Science*, 65(103064), 103064. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2023.103064>
- Phinney, J. T., Muller-Karger, F., Dustan, P., & Sobel, J. (2001). Using remote sensing to reassess the mass mortality of *Diadema antillarum* 1983–1984. *Conservation*

- Biology: The Journal of the Society for Conservation Biology*, 15(4), 885–891.
<https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2001.015004885.x>
- Pichat, J., Iglesias, J., Yousry, T., Ourselin, S., & Modat, M. (2018). A Survey of Methods for 3D Histology Reconstruction. *Medical image analysis*, 46, 73-105.
<https://doi.org/10.1016/j.media.2018.02.004>.
- Pilnick, A., O’Neil, K., Moe, M., & Patterson, J. (2021). A novel system for intensive *Diadema antillarum* propagation as a step towards population enhancement. *Scientific Reports*, 11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90564-1>.
- Proctor, R., Eiff, C., Kahl, B., Becker, K., Mcnamara, P., Herrmann, M., & Peters, G. (2006). Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nature Reviews Microbiology*, 4, 295-305.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1384>.
- Purivirojkul, W. (2012). Histological change of aquatic animals by parasitic infection. En *Histopathology - Reviews and Recent Advances*. InTech. 10.5772/52769
- Quintero-Hunter, I., Grier, H., & Muscato, M. (1991). Enhancement of histological detail using metanil yellow as counterstain in periodic acid Schiff’s hematoxylin staining of glycol methacrylate tissue sections. *Biotechnic & Histochemistry: Official Publication of the Biological Stain Commission*, 66(4), 169–172.
<https://doi.org/10.3109/10520299109109964>
- Randall, J.E., R.E. Schroeder & W.A. Starck. (1964). Notes on the biology of the echinoid *Diadema antillarum*. *Caribbean Journal of Science*. 4: 421-433.
- Reis, Alex. (2020) [Anatomy of a long-spined sea urchin]. Rolling Harbour Abaco.
<https://rollingharbour.com/tag/long-spined-sea-urchin-anatomy/>
- Ruiz-Barrionuevo, J. M., Kardas, E., Rodríguez-Barreras, R., Quiñones-Otero, M. A., Ruiz-Díaz, C. P., Toledo-Hernández, C., & Godoy-Vitorino, F. (2024). Shifts in the gut microbiota of sea urchin *Diadema antillarum* associated with the 2022 disease outbreak. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1409729.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1409729>
- Ruiz-Zárate, M.A., Espinoza-avalos, J., Carricart-ganivet, J.P., Fragoso, D. (2000). Relationship between *Manicina areolata* (Cnidaria: Scleractinia), *Thalassia testudinum* (Anthophyta) and *Neogoniolithon* sp. (Rhodophyta) 206, 135–146

- Ruiz-Zarate, M. A., Hernandez-Landa, R. C., Gonzalez-Salas, C., Nunez-Lara, E., & Arias-Gonzalez, J. E. (2003). Mexico. Condition of coral reef ecosystems in central-southern Quintana Roo, Mexico (part 1: Stony corals and algae). *Atoll Research Bulletin*, 496(18), 318–337. <https://doi.org/10.5479/si.00775630.496-18.318>
- Sammarco, P. W. (1980). Diadema and its relationship to coral spat mortality: Grazing, competition, and biological disturbance. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 45(2), 245–272. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(80\)90061-1](https://doi.org/10.1016/0022-0981(80)90061-1)
- Schmitter-Soto, J. J., Aguilar-Perera, A., Cruz-Martínez, A., Herrera-Pavón, R. L., Morales-Aranda, A. A., & Cobián-Rojas, D. (2018). Interdecadal trends in composition, density, size, and mean trophic level of fish species and guilds before and after coastal development in the Mexican Caribbean. *Biodiversity and Conservation*, 27(2), 459–474. <https://doi.org/10.1007/s10531-017-1446-1>
- Shimizu, M. (1994). Histopathological investigation of the spotted gonad disease in the sea urchin, *Strongylocentrotus intermedius*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 63(2), 182–187. <https://doi.org/10.1006/jipa.1994.1034>
- Schofield, P. N., Ward, J. M., & Sundberg, J. P. (2016). Show and tell: disclosure and data sharing in experimental pathology. *Disease Models & Mechanisms*, 9(6), 601–605. <https://doi.org/10.1242/dmm.026054>
- Slaoui, M., & Fiette, L. (2011). Histopathology procedures: from tissue sampling to histopathological evaluation. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 691, 69–82. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-849-2_4
- Smith, L. C., Ghosh, J., Buckley, K. M., Clow, L. A., Dheilily, N. M., Haug, T., Henson, J. H., Li, C., Lun, C. M., Majeske, A. J., Matranga, V., Nair, S. V., Rast, J. P., Raftos, D. A., Roth, M., Sacchi, S., Schrankel, C. S., y Stensvåg, K. (2010). Echinoderm immunity. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 708, 260–301. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8059-5_14
- Sołtysiak, Z., Rokicki, J., & Kantyka, M. (2014). Histopathological diagnosis in parasitic diseases. *Annals of parasitology*, 60 2, 127-31.
- Spiers, L. J., Harrison, S. J., Deutsch, J. M., Garg, N., y Paul, V. J. (2021). The role of algal chemical defenses in the feeding preferences of the long-spined sea urchin

- Diadema antillarum*. *Aquatic Ecology*, 55(3), 941–953.
<https://doi.org/10.1007/s10452-021-09873-2>
- Sweet, M. J., Croquer, A., & Bythell, J. C. (2014). Experimental antibiotic treatment identifies potential pathogens of white band disease in the endangered Caribbean coral *Acropora cervicornis*. *Proceedings. Biological Sciences*, 281(1788), 20140094. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.0094>
- Tahseen, Q. (2009). Coelomocytes: Biology and possible immune functions in invertebrates with special remarks on nematodes. *International Journal of Zoology*, 2009, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2009/218197>
- Tamizhazhagan, V. (2017). Histological methods in life science. *International Journal of Biomedical Materials Research*, 5(6), 68.
<https://doi.org/10.11648/j.ijbmr.20170506.11>
- Tonnus, W., Meyer, C., Paliege, A., Belavgeni, A., von Mässenhausen, A., Bornstein, S. R., Hugo, C., Becker, J. U., y Linkermann, A. (2019). The pathological features of regulated necrosis: Pathology of regulated necrosis. *The Journal of Pathology*, 247(5), 697–707. <https://doi.org/10.1002/path.5248>
- Tuohy, E., Wade, C., y Weil, E. (2020). Lack of recovery of the long-spined sea urchin *Diadema antillarum Philippi* in Puerto Rico 30 years after the Caribbean-wide mass mortality. *PeerJ*, 8. <https://doi.org/10.7717/peerj.8428/table-3>.
- Williams, S. M. (2022). The reduction of harmful algae on Caribbean coral reefs through the reintroduction of a keystone herbivore, the long-spined sea urchin *Diadema antillarum*. *Restoration Ecology*, 30(1). <https://doi.org/10.1111/rec.13475>
- Xue, Z., Peng, T., y Wang, W. (2023). Classification and immune function of coelomocytes in echinoderms. *Current Chinese Science*, 03.
<https://doi.org/10.2174/0122102981266814231016051712>