

Estado de la publicación: El preprint no ha sido enviado para publicación

El primer genoma mitocondrial completo de *Diadema antillarum* (Diadematoidea, Diadematidae)

Audrey Majeske, Alejandro J. Mercado Capote, Aleksey Komissarov, Anna Bogdanova, Nikolaos V. Schizas, Stephanie O. Castro Márquez, Kenneth Hilker, Walter Wolfsberger, Tarás K. Oleksyk

<https://doi.org/10.1590/SciELOPreprints.5055>

Enviado en: 2022-11-11

Postado en: 2022-11-17 (versión 1)

(AAAA-MM-DD)

1 **Title: The first complete mitochondrial genome of *Diadema***
2 ***antillarum* (Diadematoida, Diadematidae)**

3 **Abstract**

4 The mitochondrial genome of the long-spined black sea urchin, *Diadema antillarum*, was
5 sequenced using Illumina next-generation sequencing technology. The complete mitogenome is
6 15,708 bp in length, containing two rRNA, 22 tRNA and 13 protein-coding genes, plus a
7 noncoding control region of 133 bp. The nucleotide composition is 18.37% G, 23.79% C, 26.84%
8 A and 30.99% T. The A + T bias is 57.84%. Phylogenetic analysis based on 12 complete
9 mitochondrial genomes of sea urchins, including four species of the family Diadematidae,
10 supported familial monophyly; however, the two *Diadema* species, *D. antillarum* and *D. setosum*
11 were not recovered as sister taxa.

12 **Keywords:** mitogenome, echinoderm, invertebrate, phylogeny, black sea urchin, long-spined sea
13 urchin

14 **Research Area:** Animal and Plant Sciences

15 **Classifications:** Genetics, Marine Biology

16

17

18

19 **El primer genoma mitocondrial completo de *Diadema antillarum***
20 **(Diadematoidea, Diadematidae)**

21

22 Audrey J. Majeske (ORCID: 0000-0002-2178-5869)^{1,2*}, Alejandro J. Mercado
23 Capote (ORCID: 0000-0001-9679-181X)¹, Aleksey Komissarov (ORCID: 0000-
24 0001-6981-7316)³, Anna Bogdanova (ORCID: 0000-0001-6497-1648)³, Nikolaos
25 V. Schizas (ORCID: 0000-0002-9199-6960)⁴, Stephanie O. Castro-Márquez
26 (ORCID: 0000-0002-9766-1299)², Kenneth Hilkert (ORCID: 0000-0002-1530-
27 0415)², Walter Wolfsberger (ORCID: 0000-0003-0980-645X)^{2,5}, y Taras K.
28 Oleksyk (ORCID: 0000-0002-8148-3918)^{1,2,5}

29 ¹ Universidad de Puerto Rico en Mayagüez, Departamento de Biología, Call Box 9000,
30 Mayagüez, PR 00681, USA; ² Universidad de Oakland, Departamento de Ciencias Biológicas,
31 118 Library Drive, Rochester, MI 48309, EE.UU.; ³ Laboratorio de Genómica Aplicada, Instituto
32 SCAMT, Universidad ITMO, Lomonosova 9 Str., San Petersburgo 197101, Rusia; ⁴ Universidad
33 de Puerto Rico en Mayagüez, Departamento de Ciencias Marinas, Call Box 9000, Mayagüez, PR
34 00681, USA; ⁵ Universidad Nacional de Uzhhorod, Facultad de Biología, Universytets'ka St, 14,
35 Uzhhorod, Zakarpattia Oblast, Ucrania, 88000

36 *amajeske@oakland.edu

37 **Área de investigación:** Ciencias Animales y Vegetales

38 **Clasificaciones:** Genética, Biología Marina

39 **Resumen**

40 El genoma mitocondrial del erizo de mar negro de espinas largas, *Diadema antillarum*, se
41 secuenció utilizando la tecnología de secuenciación de nueva generación de Illumina. El
42 mitogenoma completo tiene un tamaño de 15,708 pb, que contiene dos ARNr, 22 ARNt y 13 genes
43 codificadores de proteínas, además de una región de control no codificante de 133 pb. La
44 composición de nucleótidos es 18.37% G, 23.79% C, 26.84% A y 30.99% T. El sesgo A+T es del
45 57.84%. El análisis filogenético basado en 12 genomas mitocondriales completos de erizos de mar,
46 incluyendo cuatro especies de la familia Diadematidae, apoya la monofilia familiar. Sin embargo,
47 las dos especies de *Diadema* en este estudio, *D. antillarum* y *D. setosum* no fueron identificadas
48 como taxones hermanos.

49

50 **Descripción de los datos**

51 El erizo de mar negro de espinas largas, *Diadema antillarum* (Diadematoida, Diadematidae;
52 NCBI:txid105358; urn:lsid:marinespecies.org:taxname:124332), es un invertebrado marino
53 bentónico que habita en las aguas poco profundas del océano Atlántico y el mar Caribe. Es un
54 herbívoro importante y una especie clave que ayuda a mantener saludables los sistemas de arrecifes
55 de coral a lo largo de sus hábitats marinos costeros [1-9]. *Diadema antillarum* fue abundante a
56 consecuencia del impacto humano en la sobreexplotación de peces herbívoros más grandes y la
57 desaparición de vertebrados más grandes. Junto con otros peces herbívoros más pequeños, servían
58 como los principales herbívoros manteniendo la salud del sistema de arrecifes dominado por
59 corales, hasta mediados de la década de 1980 [9-11]. Después del histórico evento de mortandad

60 de esta especie en 1983-84, que presumiblemente fue causado por un patógeno desconocido
61 transmitido por el agua, se produjeron repetidos eventos de mortandad en la década de 1990 hasta
62 la actualidad [12]. Estos eventos han diezclado y aniquilado poblaciones en algunas localidades
63 del Caribe [13-15]. Los esfuerzos de monitoreo y recuperación han sido prometedores, pero es
64 probable que ocurran más eventos de mortandad a medida que continúe el cambio climático global
65 [16–18].

66

67 **Contexto**

68 Al momento, solo se han descrito unos pocos genes en el genoma mitocondrial de *D. antillarum*,
69 incluidas secuencias parciales de *COI*, *COII* y *ATP6*, así como secuencias ensambladas de *ATP8*
70 y *ARN^t_{Lys}* [19,20]. Se han completado más de 40 genomas mitocondriales de diferentes especies
71 de erizos de mar, incluyendo sólo tres especies dentro de la familia Diadematidae, que contienen
72 12 géneros en total. De estas especies, ambas especies del género *Echinothrix* tienen genomas
73 mitocondriales completos además de una de las siete especies dentro del género *Diadema*,
74 específicamente *D. setosum*. Aquí, reportamos el genoma mitocondrial completo de *D. antillarum*
75 y exploramos la utilidad de los genomas mitocondriales completos para colocar a *D. antillarum*
76 filogenéticamente en el árbol de Diadematidae.

77

78 **Métodos**

79 *Recolección de muestras y extracción de ADN*

80 Un erizo de mar adulto fue recolectado en Puerto Rico (18°20'35.2"N 67°15'40.5"W). Se extrajo
81 una muestra que contenía celomocitos enteros del animal a través de la linterna de Aristóteles
82 utilizando una aguja estéril de calibre 23 conectada a una jeringa de 5 ml. El animal fue
83 fotografiado y regresado a su hábitat en el sitio de recolección. No se conservó como un espécimen
84 de libre acceso para este estudio. La muestra se mantuvo en hielo durante su transporte a la
85 Universidad de Puerto Rico Mayagüez (UPRM). El ADN total se extrajo de los celomocitos
86 utilizando un kit de sangre y tejido DNeasy® (Qiagen, Inc.) según las instrucciones de la compañía.
87 La calidad y la concentración del ADN de la muestra se evaluaron utilizando un espectrofotómetro
88 NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific) antes del envío para su secuenciación en el laboratorio
89 Psomagen (Macrogen USA) en Rockville, MD, EUA. La aprobación para la recolección de
90 muestras se obtuvo del Departamento de Recursos Naturales y Ambientales de Puerto Rico (O-
91 VS-PVS15-AG-00046-01082018).

92

93 *Secuenciación y análisis bioinformático*

94 Para preparar la muestra de ADN para la secuenciación, se generó una biblioteca de secuencias
95 utilizando un kit de preparación de biblioteca TruSeq® DNA PCR Free (350) (Illumina, Inc.). La
96 verificación de calidad y cuantificación de las bibliotecas se realizó utilizando un Bioanalizador.
97 Luego la plataforma Illumina HiSeq 2500 generó lecturas de secuencia en pares con 151-pares de
98 base (pb). El secuenciador produjo un total de 60.8 Gpb y 402,874,618 lecturas de extremo
99 pareado, de las cuales el 88.21% tenía una puntuación de calidad de $\geq Q30$.

100 Las secuencias crudas candidatas para el genoma mitocondrial se extrajeron
101 bioinformáticamente utilizando el software Cookiecutter2 (<https://github.com/aglabx/Tools>) del

102 conjunto de datos completos producidos por Illumina que representan los genomas nuclear y
103 mitocondrial [21]. Las lecturas se recortaron utilizando un programa personalizado llamado v2trim
104 (<https://github.com/aglabx/Tools>).

105 Subsiguientemente, la lista de k-mers se formó en dos etapas. Primero, utilizamos el genoma
106 de referencia más conocido de erizos de mar (*Strongylocentrotus purpuratus*, NC_001453.1 [22])
107 para ensamblar el borrador de contigs del ADNmt de *D. antillarum* utilizando el ensamblador del
108 genoma SPAdes v3.15.4 (RRID: SCR_000131) [23]. Los contigs ensamblados fueron buscados
109 en la interfaz web BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus
110 siglas en inglés) [24] para encontrar la secuencia de referencia más cercana que coincidió con la
111 especie *Echinothrix diadema*, con el número de acceso KX385836.1. En la segunda etapa,
112 construimos la lista de k-mer usando ésta secuencia de referencia más cercana. Las secuencias
113 extraídas se ensamblaron con SPAdes utilizando parámetros predeterminados. Para verificar la
114 calidad del ensamblaje, se alinearon las secuencias extraídas al ensamblaje del ADNmt completo
115 con BWA-MEM2 (<https://github.com/bwa-mem2/bwa-mem2>; RRID:SCR_022192) utilizando los
116 parámetros predeterminados [25]. La gráfica de cobertura se calculó con bedtools genomecov con
117 parámetros `-d` y `-split` (BEDTools RRID:SCR_006646) [26]. Además, se generó una tabla de
118 datos de cobertura por base con la herramientas de análisis de datos de NGS proporcionadas en el
119 programa de software Unipro UGENE [27]. Se generó un gráfico de esta tabla de datos en
120 Microsoft Excel (2019) presentada como Figura 1. Finalmente, el inicio del ensamblaje se rotó a
121 la posición de tRNA-Phe. Después del ensamblaje, se realizó una anotación en línea utilizando el
122 servidor web MITOS [28] seguida de una verificación manual de cada ARN y proteína predichos.
123 Los resultados de esta anotación se utilizaron para generar un mapa mitocondrial en Geneious

134 **Figura 2. Mapa del genoma mitocondrial de *Diadema antillarum*.** Las formas de flecha están coloreadas para
135 indicar genes de ARNt (azul), genes de ARNr (rojo) y genes codificadores de proteínas (verde). La forma rectangular
136 negra se refiere a la región de control no codificante o bucle D. Las direcciones de las flechas indican la dirección de
137 transcripción en la hebra H (la flecha apunta a la derecha) y la hebra L (la flecha apunta a la izquierda). El mapa se
138 generó en Geneious Prime v2022.1.1. La imagen animal es el espécimen utilizado para el muestreo en este estudio.
139 Imagen tomada por Alejandro Mercado Capote.

140

141 *Análisis filogenético*

142 La alineación de secuencias y el análisis filogenético se construyeron en MEGA v11.0.11 [31]. El
143 análisis incluyó los genomas mitocondriales completos de 12 especies representativas de los
144 órdenes Camarodonta (familias Temnopleuridae, Echinometridae y Parechinidae), Arbacioida
145 (familia Arbaciidae), Temnopleuroida (familia Toxopneustidae), Cidaroida (familia Cidaridae),
146 Echinoida (familia Strongylocentrotidae) y Diadematoida (familia Diadematidae), más el pepino
147 de mar, *Apostichopus japonicus*. Se implementó MUSCLE como método de alineación utilizando
148 los parámetros predeterminados en el programa MEGA11. Para generar una matriz de identidad
149 de secuencia de las secuencias alineadas se utilizó otro editor de alineación de secuencias, BioEdit
150 [32]. Realizamos un análisis IQ-TREE para determinar el modelo de sustitución más adecuado
151 entre las secuencias del mitogenoma [33]. Se generó un árbol de máxima verosimilitud (ML, por
152 sus siglas en inglés) con las secuencias de ADN de nucleótidos del mitogenoma de las 12 especies
153 de erizo de mar y el pepino de mar incluí tiempo general reversible do como grupo externo. Para
154 el análisis filogenético, elegimos un modelo completo de parámetros que resultó en ramas que
155 contenían los mejores valores sustentados de “bootstrap” (de 500 iteraciones de “bootstrap”) para
156 el árbol de consenso resultante. El árbol ML se generó utilizando un modelo de evolución Tamura-
157 Nei [34]. Se utilizó una distribución gamma discreta para modelar las diferencias de tasa evolutiva

158 entre las posiciones genómicas (cinco categorías (+G, parámetro = 0,3129)). Los árboles iniciales
159 para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos Neighbor-
160 Join y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el modelo Tamura-Nei, y
161 luego el árbol ML se generó seleccionando la topología con probabilidad logarítmica superior. Se
162 realizaron alineamientos de secuencias adicionales y análisis filogenéticos en las secuencias
163 disponibles para *Echinothrix* spp. y *Diadema* spp. para cada uno de los tres genes: ARN
164 ribosómico 16S (secuencia parcial), la subunidad 1 de la citocromo oxidasa (CO1) (secuencia
165 codificante parcial) y genes de ATPasa (incluyendo parte de la secuencia codificante del gen de la
166 subunidad 6 de la ATP sintetasa, la secuencia parcial del gen tRNA-Lys, la secuencia codificante
167 completa del gen ATP8 y parte de la secuencia codificante del gen ATP6). Para estos análisis
168 adicionales, se generó una alineación MUSCLE utilizando los parámetros predeterminados en
169 MEGA11. Además, se extrajeron las porciones del mitogenoma para *E. diadema* (KX385836), *D.*
170 *setosum* (KX385835) y *D. antillarum* (este estudio) que correspondían a cada gen, generando una
171 alineación inicial utilizando secuencias disponibles de los mismos géneros para cada uno de los
172 tres genes. Se obtuvo un árbol de ML para cada gen utilizando un modelo “bootstraped” (500
173 iteraciones) de tiempo general reversible (GTR, por sus siglas en inglés) con tasas de sustitución
174 invariantes (I) entre los nucleótidos. Los árboles iniciales se obtuvieron aplicando los algoritmos
175 Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el modelo
176 Tamura-Nei, y luego se generó el árbol ML seleccionando la topología con un valor de
177 probabilidad logarítmica superior.

178

179 **Validación de datos y control de calidad**

180 *Características del mitogenoma*

181 El mitogenoma circular de *D. antillarum* tiene un tamaño de 15,708 pb, que comprende dos genes
182 de ARNr, 22 genes de ARNt, una región de control no codificante y 13 genes codificadores de
183 proteínas que son comunes en otros equinodermos, así como el orden de los genes [35-37]. La
184 mayoría de los genes están codificados en la cadena H, excepto un gen codificador de proteínas,
185 *ND6*, y cinco genes de ARNt, incluidos el ARNt^{Gln}, el ARNt^{Ala}, el ARNt^{Val}, el ARNt^{Asp} y el
186 ARNt^{Ser}, que están codificados en la cadena L [38]. La mayoría de los genes codificadores de
187 proteínas utilizan el codón de inicio ATG, con la excepción de *ATP8*, que comienza con GTG. La
188 longitud de los genes de ARNr es de 896 pb para el ARNr 12S y de 1,555 pb para el ARNr 16S.
189 La región de control es de 133 pb y contiene la repetición G típica que se encuentra en otros
190 equinodermos. Esta región no codificante se encuentra en las bases en las posiciones 1,111 a 1,243,
191 y se encuentra entre los genes tRNA^{Thr} y tRNA^{Pro}.

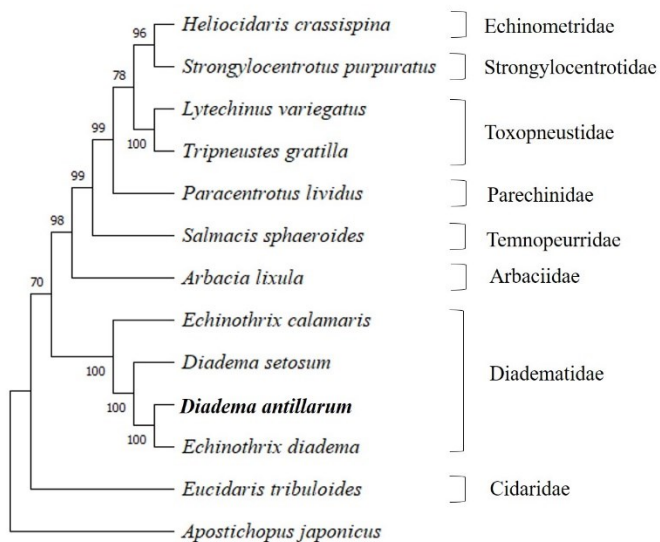
192 La composición de los nucleótidos para el mitogenoma de *D. antillarum* se calculó en MEGA11
193 como 1.37% G, 23.79% C, 26.84% A y 30.99% T. El sesgo A + T también se calculó en MEGA,
194 para *D. antillarum* es de 57.84%, ligeramente inferior, pero comparable con el de *D. setosum*, que
195 es de 58.19%. En comparación con las otras dos especies de la familia *Echinodrix* a la que *D.*
196 *antillarum* pertenece, el sesgo A + T en el mitogenoma de *D. antillarum* es ligeramente superior
197 al de *E. diadema* (57.61%) y *E. calamaris* (56.43%). No obstante, cuando se compara con especies
198 en diferentes órdenes, el sesgo mitocondrial A + T de *D. antillarum* suele ser menor que otras
199 especies en los siguientes órdenes: Cidaroida (*Stylocidaris reini*, 59.93%; *Prionocidaris baculosa*,
200 59.14%; *Eucidaris tribuloides*, 59.70%), Camarodonta (*Echinometra mathaei*, 59.21%;
201 *Heterocentrotus mamillatus*, 58.91%; *Heliocidaris crassispina*, 58.89%), y Echinoida
202 (*Strongylocentrotus droebachiensis*, 58.96%; *S. intermedius*, 58.92%; *S. purpuratus*, 58.98%).

203

204 **Árbol filogenético**

205 El árbol consenso de ML con “bootstrap” se muestra en la Figura 3. Esto se dedujo de 500 réplicas
 206 a través de la agrupación de los taxones asociados [39]. Los resultados del análisis IQ-TREE
 207 indicaron que el mejor modelo de sustitución fue el modelo más completo probado, el modelo
 208 GTR+F+R2 (modelo reversible entiendo general con tasas desiguales y frecuencia base desigual
 209 con modelo de heterogeneidad de tasas FreeRate) [40]. Los resultados de esta prueba incluyeron
 210 un árbol de ML que carecía de un análisis “bootstrap”, que está disponible en GitHub [30].
 211 Además, se generó un árbol de ML en el programa MEGA11 utilizando el modelo de evolución
 212 GTR sugerido con tasas de sustitución invariantes (o desiguales) entre sitios. Los dos árboles de
 213 consenso ML resultantes de MEGA11, más el árbol ML generado por el análisis IQ-TREE, tenían
 214 topologías idénticas con respecto a las especies dentro de la familia Diadematidae. De los dos
 215 árboles ML “bootstrap” producidos en MEGA, el árbol presentado en este estudio tendió a mostrar
 216 valores de “bootstrap” más altos para todas las ramas dentro del árbol.

217

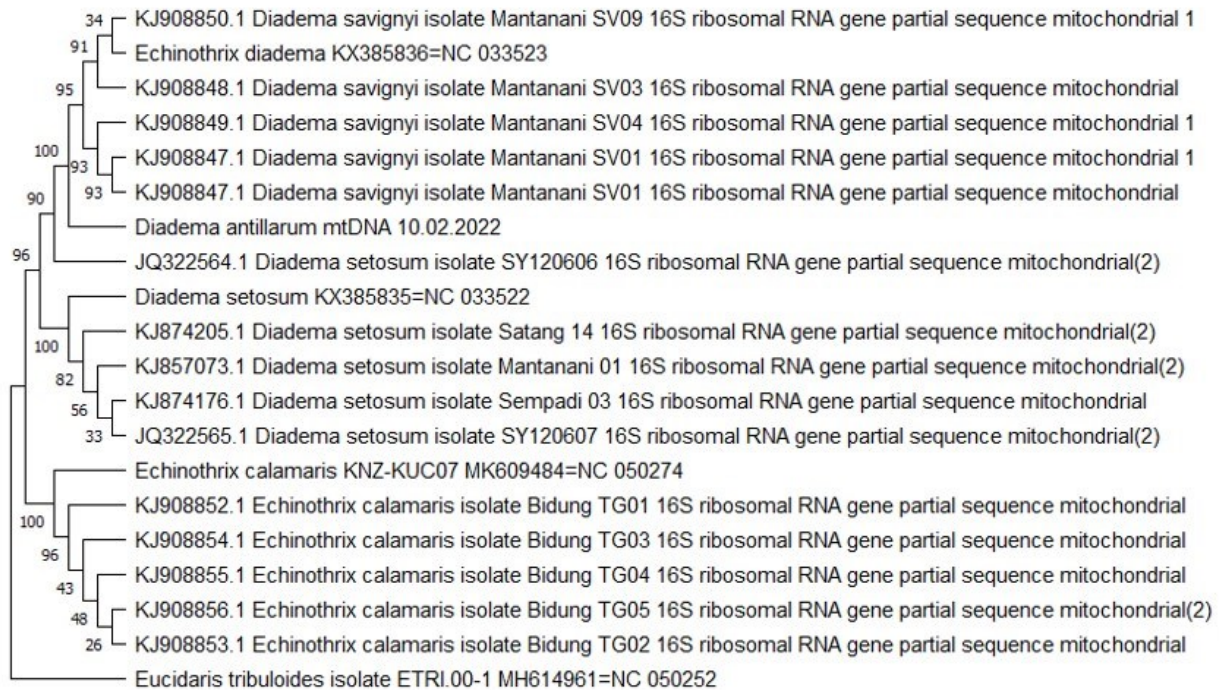


218

219 **Figura 3. El análisis filogenético de los genomas mitocondriales indica que *Diadema antillarum* está más**
220 **estrechamente relacionada con *Echinothrix diadema* que con *D. setosum*.** Un árbol de consenso de máxima
221 verosimilitud de secuencias que representan 12 especies de erizos de mar y un pepino de mar (grupo externo). Los
222 números de acceso del Genbank para los taxones en el árbol incluyen: *H. crassispina* (KC479025.1 [41]), *S.*
223 *purpuratus* (NC_001453.1 [22, 42, 43]), *L. variegatus* (NC_037785.1 [35]), *T. gratilla* (KY268294.1 [44]), *P. lividus*
224 (J04815.1 [45]), *S. sphaeroides* (KU302103.1 [41]), *A. lixula* (X80396.1 [37]), *E. calamaris* (NC_050274.1 [46]), *D.*
225 *setosum* (KX385835.1 [47]), *E. diadema* (KX385836.1 [48]), *E. tribuloides* (MH614962.1[49]) y *A. japonicus*
226 (NC_012616 [50]). Las longitudes de las ramas se igualan y no incluyen los tiempos de divergencia evolutiva. Los
227 valores de soporte de Bootstrap se incluyen en las ramas del árbol.

228
229 La topología del árbol mostrada en este estudio indicó que *D. antillarum* estaba más
230 estrechamente relacionado con *E. diadema* que con *D. setosum*. El siguiente taxón más
231 estrechamente relacionado con estos tres fue *E. calamaris*. Para *E. diadema*, *E. calamaris* y *D.*
232 *setosum*, el tamaño de estos genomas mitocondriales es de 15,712 pb, 15,716 pb y 15,708 pb,
233 respectivamente. Un estudio previo reportó el mitogenoma completo de *D. setosum* e incluyó un
234 árbol filogenético ML con un clado hermano altamente sustentado (valor de “bootstrap” de 100)
235 que contiene dos taxones: *E. diadema* y *D. setosum* [47]. Además, los resultados de nuestra matriz
236 de identidad de secuencia de mitogenomas entre *D. antillarum* y *E. diadema* fueron 96.7%
237 idénticos, mientras que *D. antillarum* vs. *D. setosum* o *D. antillarum* vs. *E. calamaris* tuvieron
238 86.3% y 80% de identidad, respectivamente. Además, los mitogenomas entre *E. diadema* y *D.*
239 *setosum* fueron 86.2% idénticos en secuencia. Esto podría sugerir que la mayor similitud general
240 entre *D. antillarum* y *E. diadema*, en comparación con *D. setosum*, podría estar asociada con el
241 mayor sesgo A + T en el mitogenoma. Sin embargo, las secuencias del mitogenoma de *E. diadema*
242 y *D. setosum* se generaron a partir de especímenes recolectados en el Mar del Sur de China por el
243 mismo grupo de investigación [47,48]. Dado que hay otras especies de *Diadema* en el Mar del Sur

244 de China que son morfológicamente similares a *E. diadema* (incluyendo *D. setosum* y *D.*
245 *savignyi*), el mitogenoma reportado de *E. diadema* puede haber sido muestreado de una especie de
246 *Diadema*, es decir, *D. savignyi*. Desafortunadamente, el mitogenoma de *D. savignyi* no se ha
247 completado o no está disponible. No obstante, para proporcionar evidencia de esta afirmación,
248 realizamos un análisis de secuencia para tres genes adicionales (*16S*, *ATPasa* y *COI*) para los datos
249 disponibles de especies de los géneros *Echinothrix* y *Diadema*. Los resultados de las topologías de
250 árbol para los tres genes indican que las secuencias genéticas específicas extraídas del mitogenoma
251 de *E. diadema* están más estrechamente relacionadas con la secuencia genómica obtenida de
252 *Diadema sp.* en lugar de los de *Echinothrix sp.* (Figuras 4, 5 y 6). En particular, las secuencias
253 genéticas específicas extraídas del mitogenoma de *E. diadema* se localizaron como un clado
254 hermano con *D. savignyi* (ver Figuras 4-6), que se colocó junto a un grupo más grande de clados
255 que incluía *D. africanum* (ver Figura 4), *D. antillarum* (ver Figuras 4-6) *D. mexicanum* (véase la
256 figura 4) y *D. setosum* (véase la figura 4-6). Esto se relacionó más lejanamente con las
257 agrupaciones de clados que incluían *E. diadema* (ver Figura 4) y *E. calamaris* (ver Figuras 4-6).
258



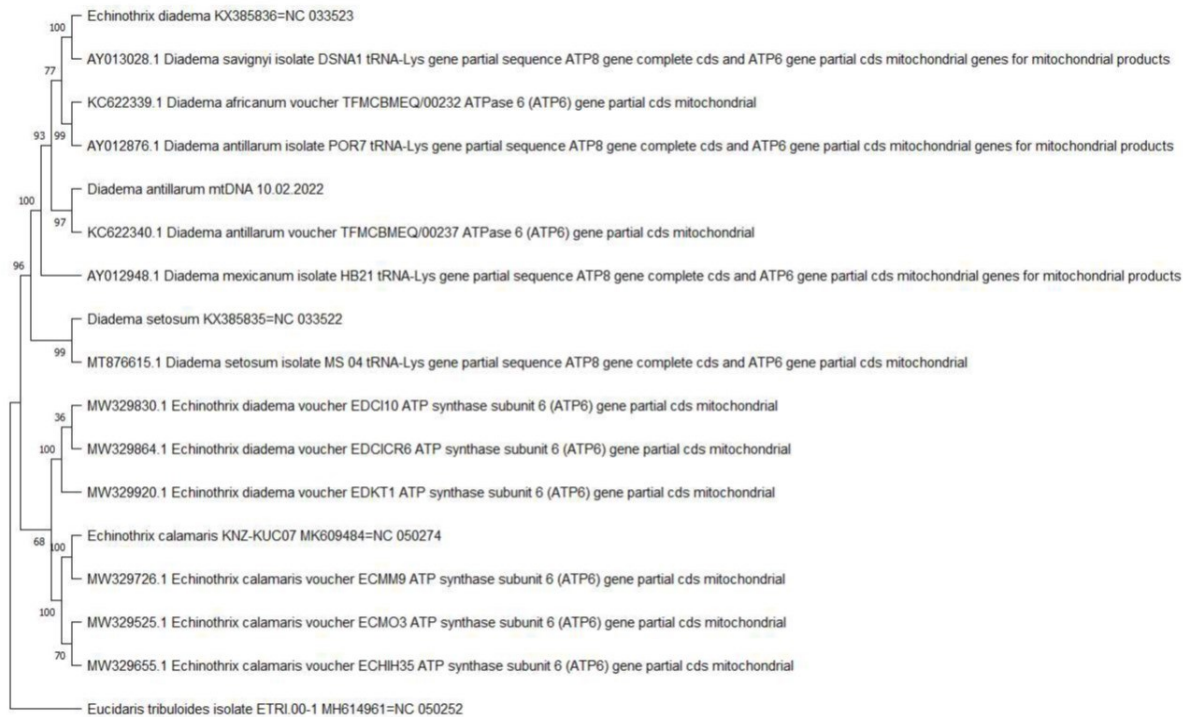
259

260 **Figura 4. Análisis filogenético de secuencias de ARN ribosómico 16S para *Diadema* y *Echinothrix* spp.**

261 Un árbol de consenso de máxima verosimilitud de secuencias genéticas parciales para 19 secuencias de
 262 *Diadema* y *Echinothrix* spp. más *Eucidaris tribuloides* como un grupo externo. Se extrajo una sección del
 263 mitogenoma para *E. diadema* (KX385836), *D. setosum* (KX385835), *D. antillarum* (10.02.2022) y *E.*
 264 *tribuloides* (ETRI 00-1) que correspondía al gen 16S generando un alineamiento inicial. Para ello, las
 265 secuencias específicas del gen *E. calamaris* 16S se alinearon con todo el mitogenoma de *E. tribuloides* y
 266 *E. diadema*. Luego, las secuencias específicas del gen *D. setosum* y *D. savignyi* para 16S se alinearon con
 267 todo el mitogenoma de *E. tribuloides* y *D. antillarum*. Por último, las secuencias específicas del gen *D.*
 268 *setosum* enumeradas en el árbol se alinearon con todo el mitogenoma de *E. tribuloides* y *D. setosum*. El
 269 resto del mitogenoma de cada especie se recortó para reflejar solo la porción perteneciente a la secuencia
 270 del gen 16S. Por lo tanto, los taxones en el árbol llamado *Diadema antillarum* mtDNA 10.02.2022,
 271 *Echinothrix diadema* KX385836 = NC 033523, *Diadema setosum* KX38535 = NC 033522 y *Eucidaris*
 272 *tribuloides* aislado ETRI 00-1 MH614961 = NC 050252 incluir solo las secuencias del gen 16S. Las

273 longitudes de las ramas se igualan y no incluyen los tiempos de divergencia evolutiva. Los valores de
 274 soporte de Bootstrap se incluyen en las ramas del árbol.

275

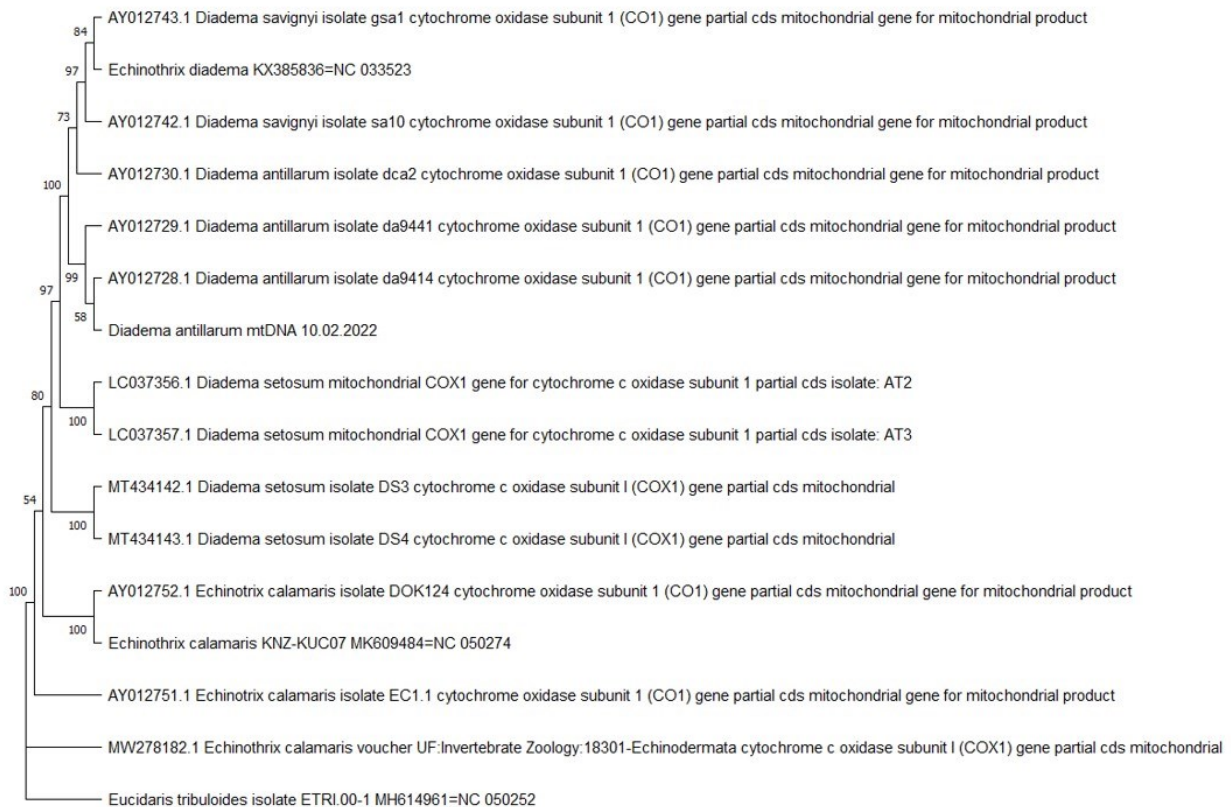


276

277 **Figura 5. Análisis filogenético de los genes ATPasa para *Diadema* y *Echinothrix* spp.** En el análisis se
 278 incluyeron el gen de la subunidad 6 de la ATP sintasa (secuencia codificante parcial) y el gen de la
 279 subunidad 8 de la ATP sintasa (secuencia codificante completa), así como el gen tRNA-Lys (secuencia
 280 parcial), que se incluyó en algunos de los taxones. Se muestra un árbol de consenso de máxima
 281 verosimilitud para 16 secuencias de *Diadema* y *Echinothrix* spp. más *Eucidaris tribuloides* como un grupo
 282 externo. Se extrajo una sección del mitogenoma para *E. diadema* (KX385836), *D. setosum* (KX385835),
 283 *E. calamaris* (KNZ-KUC07)), *D. antillarum* (10.02.2022) y *E. tribuloides* (ETRI 00-1) que correspondía
 284 al gen específico generando un alineamiento inicial. Para hacer esto, las secuencias específicas del gen *E.*
 285 *calamaris* enumeradas en el árbol se alinearon con los mitogenomas completos de *E. tribuloides*, *E.*
 286 *diadema* y *E. calamaris*. Luego, las secuencias específicas del gen en *D. antillarum* enumeradas en el árbol

287 se alinearon con todo el mitogenoma de *E. tribuloides* y *D. antillarum*. Por último, las secuencias
 288 específicas del gen *D. setosum* enumeradas en el árbol se alinearon con todo el mitogenoma de *E.*
 289 *tribuloides* y *D. setosum*. El resto del mitogenoma de cada especie se recortó para reflejar solo la porción
 290 perteneciente a las secuencias del gen ATPasa. Así, los taxones del árbol denominados *Diadema antillarum*
 291 mtDNA 10.02.2022, *Echinothrix diadema* KX385836=NC 033523, *Diadema setosum* KX38535=NC
 292 033522, *Echinothrix calamaris* KNZ-KUC07 MK609484=NC050274 y *Eucidaris tribuloides* aislado ETRI
 293 00-1 MH614961=NC 050252 incluir únicamente las secuencias del gen ATPasa. Las longitudes de las
 294 ramas se igualan y no incluyen los tiempos de divergencia evolutiva. Los valores de soporte de Bootstrap
 295 se incluyen en las ramas del árbol.

296



297

298 **Figura 6. Análisis filogenético de los genes de la citocromo oxidasa 1 (COI) para *Diadema* y**
 299 ***Echinothrix* spp.** Se muestra un árbol de consenso de máxima verosimilitud para 15 secuencias de

300 codificación parcial de *Diadema* y *Echinothrix* spp. más *Eucidaris tribuloides* como un grupo externo. Se
301 extrajo una sección del mitogenoma para *E. diadema* (KX385836), *E. calamaris* (KNZ-KUC07), *D.*
302 *antillarum* (10.02.2022) y *E. tribuloides* (ETRI 00-1) que correspondía al gen *COI* generando un
303 alineamiento inicial. Para hacer esto, las secuencias específicas del gen *E. calamaris* enumeradas en el árbol
304 se alinearon con todo el mitogenoma de *E. tribuloides*, *E. diadema* y *E. calamaris*. Por separado, las
305 secuencias específicas del gen *D. antillarum* enumeradas en el árbol se alinearon con todo el mitogenoma
306 de *E. tribuloides* y *D. antillarum*. El resto del mitogenoma de cada especie se recortó para reflejar solo la
307 porción perteneciente a la secuencia del gen *COI*. Así, los taxones del árbol denominado *Diadema*
308 *antillarum* mtDNA 10.02.2022, *Echinothrix calamaris* KNZ-KUC07 MK609484=NC050274, *Echinothrix*
309 *diadema* KX385836=NC 033523 y *Eucidaris tribuloides* aislado ETRI 00-1 MH614961=NC 050252
310 incluir únicamente las secuencias del gen *COI*. Las longitudes de las ramas se igualan y no incluyen los
311 tiempos de divergencia evolutiva. Los valores de soporte de Bootstrap se incluyen en las ramas del árbol.

312

313 Además, es importante tener en cuenta que los rangos de hábitat de *E. diadema* y *D. setosum*
314 se encuentran en la región del Indo-Pacífico, que es distinta del rango de hábitat de *D. antillarum*
315 que se encuentra típicamente en el Océano Atlántico occidental, el Mar Caribe, las costas tropicales
316 de América del Sur hasta Brasil y desde Bermudas hasta Florida. Una nueva subespecie de *D.*
317 *antillarum*, llamada *D. antillarum ascensionis*, ha sido identificada en el Atlántico oriental, que
318 es similar a la especie del Atlántico medio de *D. antillarum* [51]. Esta nueva subespecie también
319 es similar a *D. africanum* que se encuentra en las islas atlánticas orientales, desde las islas Madeira
320 hasta el Golfo de Guinea, incluyendo Salvage, Canarias, Cabo Verde [52] y Santo Tomé y las islas
321 São São [19]. A pesar de que *D. antillarum* ha estado repoblando áreas que han extendido su área
322 de distribución, no tenemos conocimiento de ninguna migración de *D. africanum* tan al oeste como
323 Puerto Rico, en el Mar Caribe. Además, al identificar el espécimen antes de la recolección para

324 este estudio, carecía de los iridóforos, típicos de *D. africanum*, que son visibles a la luz del sol. Si
325 bien el análisis de la secuencia ATPasa presentado en este estudio refleja que hay similitudes en
326 estas secuencias entre *D. antillarum*, *D. africanum* y *D. mexicanum*, la secuencia del gen *ATPasa*
327 que se extrajo del mitogenoma utilizado en este análisis se parece más a la de otro *D. antillarum*
328 (ver Figura 4). Por lo tanto, creemos que las especies utilizadas en este estudio fueron identificadas
329 correctamente. Sin embargo, a medida que se disponga de secuencias adicionales del mitogenoma,
330 el árbol filogenético que describe las relaciones entre géneros dentro de Diadematidae debería
331 volverse más completo.

332

333 **Potencial de reutilización**

334 Estos resultados pueden proveer una idea de los eventos de dispersión y especiación de la familia
335 Diadematidae. Sin embargo, se necesitan más datos de otros géneros para llegar a más
336 conclusiones sobre la evolución y adaptación de este linaje familiar. La secuencia del mitogenoma
337 producida aquí puede servir como secuencia de referencia para esta especie de erizo de mar.
338 Además, las secuencias nucleares generadas en este proyecto se incluirán en un estudio más amplio
339 para ensamblar el genoma completo de esta especie. Con la importancia de *D. antillarum* para
340 mantener la salud y la estructura actual del resto de las costas dominadas por corales frente al
341 cambio climático global, será importante incluir la genética de esta especie en futuros estudios de
342 conservación y genética de poblaciones.

343

344 **Disponibilidad de datos**

345 La secuencia del genoma mitocondrial ha sido depositada en DDBJ/ENA/GenBank bajo el número
346 de acceso ON725136. Los datos están vinculados a los números NCBI BioProject y BioSample

347 PRJNA839760 y SAMN28553754, respectivamente. Todos los archivos intermedios están
348 disponibles en el repositorio GigaDB [53].

349

350 **Declaraciones**

351 **Authors Contribution**

352 AJM and TKO conceived and designed the study; NVS and AJMC collected the animal sample;
353 SOCM and KH prepared sample collections for sequencing and performed initial sequence
354 analysis; WW, AK and AB performed bioinformatics analysis; AJM wrote the manuscript; TKO
355 funded the project.

356 **Conflicts of Interest**

357 The authors declare that they have no competing interests.

358 **Ethics Committee Approval**

359 There was no requirement for ethics committee approval for this study because invertebrate
360 animals were used in the study. Approval for animal collection was provided by the Department
361 of Natural and Environmental Resources of Puerto Rico (O-VS-PVS15-AG-00046-01082018).

362 **Lista de abreviaturas**

363 PA: par de bases; Gbp: pares gigabase; GTR: tiempo general reversible; ML: máxima
364 verosimilitud

365

366 **Aprobación ética**

367 La aprobación para la recolección de muestras de erizo de mar se obtuvo del Departamento de
368 Recursos Naturales y Ambientales de Puerto Rico (O-VS-PVS15-AG-00046-01082018).

369

370 **Consentimiento para la publicación**

371 No aplica.

372

373 **Intereses en conflicto**

374 Los autores declaran que no tienen intereses contrapuestos.

375

376 **Financiación**

377 El financiamiento para el proyecto fue proporcionado por fondos iniciales otorgados a Tarás
378 Oleksyk por la Universidad de Oakland.

379

380 **Agradecimientos**

381 No aplica.

382

383 Referencias

- 384 1. Liddell, W.D. y Ohlhorst, S.L. (1986) Changes in benthic community composition
385 following the mass mortality of *Diadema* at Jamaica. *J Exp Marine Biol Ecol.* 95 (3): págs.
386 271–278.
- 387 2. Hughes, T.P., Reed, D.C., Boyle, M.-J. (1987) Herbivory on coral reefs: Community
388 structure following mass mortalities of sea erizos. *J Exp Marine Biol Ecol.* 113:39–59.
- 389 3. Carpenter, R.C. (1988) Mortalidad masiva de un erizo de mar del Caribe: efectos
390 inmediatos sobre el metabolismo comunitario y otros herbívoros. *Proc Natl Acad Sci USA.*
391 85: 511–514.
- 392 4. Carpenter, R.C. (1990) Mortalidad masiva de *Diadema antillarum*—I. Efectos a largo
393 plazo sobre la dinámica de la población de erizos de mar y las comunidades de algas de
394 arrecifes de coral. *Biol Marino.* 104: 67–77.
- 395 5. Hughes, TP (1994) Catástrofes, cambios de fase y degradación a gran escala de un arrecife
396 de coral del Caribe. *Ciencia.* 265: 1547–1551.
- 397 6. Ferrari Legorreta, R. (2012) Building resilience of Caribbean coral reefs to macroalgal
398 phase shifts: Identifying key habitat features. Tesis doctoral, Escuela de Ciencias
399 Biológicas, Universidad de Queensland, Australia.
- 400 7. Vega Thurber, R., Burkepile, D.E., Correa, A.M.S., Thurber, A. R., Shantz, A. A., Welsh,
401 R., Pritchard, C. y Rosales, S. (2012) Las macroalgas disminuyen el crecimiento y alteran
402 la estructura de la comunidad microbiana del coral constructor de arrecifes, *Porites*
403 *astreoides*. *PLoS One.* 7(9): e44246
- 404 8. Burkepile, D.E., Allgeier, J.E., Shantz, A.A., Pritchard, C. E., Lemoine, N. P., Bhatti, L.,
405 H., Layman, C. A. (2013) El suministro de nutrientes de los peces facilita las macroalgas

- 406 y suprime los corales en un ecosistema de arrecifes de coral del Caribe. *Sci Rep.* 3(1493):
407 1–9.
- 408 9. Steneck, R.S. (2020) Los erizos de mar como impulsores de la estructura de la comunidad
409 bentónica de aguas poco profundas. En *Sea Urchins: Biology and Ecology*, Lawrence, J.M.
410 (ed.). págs. 195–212. Academic Press, San Diego, California.
- 411 10. Jackson, J.B.C. (2001) ¿Qué era natural en los océanos costeros? *Proc Natl Acad Sci USA.*
412 98(10): págs. 5411–5418.
- 413 11. Pandolfi, J.M., Bradbury, R.H, Sala, E., Hughes, T. P., Bjorndal, K. A., Cooke, R. G.,
414 McArdle, D., McClenachan, L. , Newman, M. J. H., Paredes, G., Warner, R. R., y Jackson,
415 J. B. C. (2003) Global trajectories of the long-term decline of coral reef ecosystems.
416 *Ciencia.* 301(5635): 955–958
- 417 12. Red de Respuesta Diadema. <https://www.agrra.org/sea-urchin-die-off/>. Consultado el 24
418 de mayo de 2022.
- 419 13. Lessios, H.A. (1995) *Diadema antillarum* 10 años después de la mortalidad masiva:
420 Todavía es raro, a pesar de la ayuda de un competidor. *Proc R Soc B Biol Sci.* (259) 331-
421 337.
- 422 14. Lessios, H.A., Kessing, B.D., Robertson, D.R. (1998) Flujo genético masivo a través de la
423 barrera biogeográfica marina más potente del mundo. *Proc R Soc B Biol Sci.*
424 265(1396):583-8.
- 425 15. Lessios, H.A. (2016) La gran *muerte de Diadema antillarum*: 30 años después. *Ann Rev*
426 *Marine Sci.* 8:267–83

- 427 16. Hylkema, A., Debrot, A.O., Pistor, M., Postma, E., Williams, S.M. y Kitson-Walters, K.
428 (2022) High peak settlement of *Diadema antillarum* on different artificial collectors in the
429 Eastern Caribbean. *J Exp Marine Biol Ecol.* 549 pág. 151693.
- 430 17. Pilnick, A.R., O'Neil, K.L., Moe, M. y Patterson, J.T. (2021) Un nuevo sistema para la
431 propagación intensiva de *Diadema antillarum* como un paso hacia la mejora de la
432 población. *Sci Rep.* 11(1), págs. 1 a 13.
- 433 18. Williams, SM (2022) La reducción de algas dañinas en los arrecifes de coral del Caribe a
434 través de la reintroducción de un herbívoro clave, el erizo de mar de espinas largas
435 *Diadema antillarum*. *Restauración Ecol.* 30(1) .e13475.
- 436 19. Lessios, H.A., Kessing, B.D., Pearse, J.S. (2001) Population structure and speciation in
437 tropical seas: global phylogeography of the sea urchin *Diadema*. *Evolución.* 55(5):955-
438 75.
- 439 20. Collin, R., Venera-Ponton, D.E., Driskell, A.C. , Boyle M.J., Lessios, H.A. (2020) El
440 código de barras de ADN de larvas de echinopluteus descubre diversidad críptica en
441 equinoideos neotropicales. *Invertir Biol.* 139 (2) E12292.
442 <https://doi.org/10.1111/ivb.12292>
- 443 21. Starostina, E., Tamazian, G., Dobrynin, P., O'Brien, S., Komissarov, A. (2015)
444 Cookiecutter: una herramienta para el filtrado y extracción de lectura basados en kmer.
445 *BioRxiv.* 024679. <https://doi.org/10.1101/024679>
- 446 22. Jacobs, H. T., Elliott, D. J., Math, V. B., Farquharson, A. (1988) Secuencia de nucleótidos
447 y organización génica del ADN mitocondrial del erizo de mar. *J Mol Biol.* 202(2): págs.
448 185 a 217.

- 449 23. Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin,
450 V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A.V., Sirotkin, A. V., Vyahhi,
451 N., Tesler, G., Alekseyev, M. A. y Pevzner P.A. (2012) SPAdes: un nuevo algoritmo de
452 ensamblaje del genoma y sus aplicaciones a la secuenciación de células individuales. *J*
453 *Comp Biol.* 19(5): págs. 455 a 477.
- 454 24. Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Herramienta básica de búsqueda
455 de alineación local (BLAST). <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Consultado el 10 de
456 enero de 2022.
- 457 25. Li, H. (2013) Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-
458 MEM. preimpresión arXiv. arXiv: 1303.3997.
- 459 26. Quinlan, A. R. y Hall, I. M. (2010) BEDTools: un conjunto flexible de utilidades para
460 comparar características genómicas. *Bioinformática.* 26(6) 841-842.
- 461 27. Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., y el equipo de UGENE. (2012) Unipro
462 UGENE: un conjunto de herramientas bioinformáticas unificado. *Bioinformática.* 28(8)
463 1166-1167.
- 464 28. Universidad de Leipzig. Servidor web MITOS. <http://mitos.bioinf.uni-leipzig.de/index.py>.
465 Consultado el 29 de abril de 2022.
- 466 29. Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S. (2012) Geneious Basic: Una plataforma
467 de software de escritorio integrada y extensible para la organización y análisis de datos de
468 secuencia. *Bioinformática.* 28(12) 1647-1649.
- 469 30. aglabx. (2022) Asamblea de *Diadema antillarum* mtDNA.
470 https://github.com/aglabx/mtDNA_assembly/tree/master/Diadema_anthilarum.

- 471 31. Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S. (2021) MEGA11: Análisis de genética evolutiva
472 molecular versión 11. *Mol Biol Evol.* 38 (7) 3022-3027.
- 473 32. Hall, T. R. (1999) BioEdit: Un editor de alineación de secuencias biológicas fácil de usar
474 y programa de análisis para Windows 95/98/NT. Serie de simposios sobre ácidos nucleicos.
475 41, 95 a 98.
- 476 33. Nguyen, L-T., Schmidt, H.A., von Haeseler, A., y Minh, B.Q. (2015) IQ-TREE: Un
477 algoritmo estocástico rápido y efectivo para estimar filogenias de máxima verosimilitud.
478 *Mol Biol Evol.* 32(1) 268–274.
- 479 34. Tamura K. y Nei M. (1993) Estimación del número de sustituciones de nucleótidos en la
480 región de control del ADN mitocondrial en humanos y chimpancés. *Mol Biol Evol.*
481 10:512-526.
- 482 35. Bronstein, O. y Kroh, A. (2018) El primer genoma mitocondrial del equinoide modelo
483 *Lytechinus variegatus* y conocimientos sobre la filogenética odontófora. *Genómica.* 111
484 (4) DOI:10.1016/j.ygeno.2018.04.008
- 485 36. Ketchum, R.N, DeBiase, M.B., Ryan, J.F., Burt, J.A. y Reitzel, A.M. (2018) El genoma
486 mitocondrial completo del erizo de mar, *Echinometra* sp. *ADN mitocondrial B, Resour.*
487 2018. 3(2) 1225-1227.
- 488 37. De Giorgi, C., Martiradonna, A., Lanave, C. y Saccone, C. (1996) Complete sequence of
489 the mitochondrial DNA in the sea urchin *Arbacia lixula*: conserved features of the echinoid
490 mitochondrial genome. *Mol Phylogenet Evol.* 5: 323-332.
- 491 38. Bernt, M., Donath, A., Jühling, F., Externbrink, F., Florentz, C., Fritzsch, G., Pütz, J.,
492 Middendorf, M. y Stadler, P.F. (2013) MITOS: Improved de novo Metazoan
493 Mitochondrial Genome Annotation. *Mol Phylogenet Evol.* 69 (2):313-319.

- 494 39. Felsenstein, J. (1985) Límites de confianza en filogenias: Un enfoque usando el bootstrap.
495 Evolución. 39:783-791.
- 496 40. Tavaíe, S. (1986) Algunos problemas probabilísticos y estadísticos en el análisis de
497 secuencias de ADN. Conferencias sobre Matemáticas en las Ciencias de la Vida. 17:57-86.
- 498 41. Jung, G. y Lee, Y. -H. Filogenia molecular y evolución de la secuencia de ADN
499 mitocondrial de Strongylocentrotidae, Echinoida. Presentación directa (14-ene-2013).
500 División de Investigación de Ecosistemas Marinos, Instituto Coreano de Ciencia y
501 Tecnología Oceánicas, 787, Haean-ro, Sangrok-gu, Ansan, República de Corea.
- 502 42. Valverde, J.R., Marco, R. y Garesse, R. (1994) Un motivo heptámero conservado para la
503 terminación de la transcripción de ARN ribosómico en mitocondrias animales. Proc Natl
504 Acad Sci USA. 91 (12), 5368-5371.
- 505 43. Qureshi, S.A. y Jacobs, H.T. (1993) Dos proteínas distintas de unión al ADN específicas
506 de la secuencia interactúan independientemente con la principal región de pausa de
507 replicación del erizo de mar mtDNA Nucleic Acids Res. 21 (12) 2801-2808.
- 508 44. Laruson, A.J. (2017) Tasas y relaciones de la evolución del genoma mitocondrial a través
509 de Echinoidea, con especial atención a la superfamilia Odontophora. Ecol Evol. 7 (13)
510 4543-4551.
- 511 45. Cantatore, P., Roberti, M., Rainaldi, G., Gadaleta, M.N. y Saccone, C. (1989) La secuencia
512 completa de nucleótidos, la organización génica y el código genético del genoma
513 mitocondrial de *Paracentrotus lividus*. J Biol Chem. 264 (19) 10965-10975.
- 514 46. Wakayama, N., Kiyono, Y., Matsumoto, N., Saitoh, M. y Kanazawa, K. (2019) Métodos
515 efectivos de extracción de ADN para la filogenómica mitocondrial de los erizos de mar.
516 Zoosimposios. 15 1), 192 a 202.

- 517 47. Li, C., Wu, G., Fu, W. y Zeng, X. (2016) El genoma completo de las mitocondriasal de
518 *Diadema setosum* (Aulodonta: diadematidae). Recuperación del ADN mitocondrial B. 1
519 (1): págs. 873 a 874.
- 520 48. Li, C., Wu, G., Fu W. y Zeng, X. El genoma mitocondrial completo de *Echinothrix*
521 *diadema* (Diadematacea: Diadematidae). Presentación directa (13-Jun-2016). Ocean
522 University of China, Institute of Evolution and Marine Biodiversity, YuShan road 5#,
523 QingDao, ShanDong 266003, P.R. China.
- 524 49. Kroh, A. y Bronstein, O. Si no está roto, no lo arregles: 268 millones de años de estabilidad
525 mitocondrial equinoide. Presentación directa (11-Jul-2018). Departamento Geológico
526 Paleontológico, Museo de Historia Natural de Viena, Burgring 7, Viena 1010, Austria.
- 527 50. Sun, X.-J., Li, Q. y Kong, L.-F. (2010) Genómica mitocondrial comparativa dentro del
528 pepino de mar (*Apostichopus japonicus*): Proporcionar nuevos conocimientos sobre las
529 relaciones entre las variantes de color. Acuicultura. 309 (1-4), 280-285.
- 530 51. Rodriguez A., Hernandez, J.C., Clement, S., Coppard, S.E. (2013) Una nueva especie de
531 *Diadema* (Echinodermata: Echinoidea: Diadematidae) del Océano Atlántico oriental y una
532 designación neotipo de *Diadema antillarum* (Philippi, 1845). Zootaxa. 3636 (1) 144-
533 170.
- 534 52. Hernandez, J.C., Clemente, S., Sangil, C., and Brito, A. (2008) Actual status of the sea
535 urchin *Diadema* aff. Las poblaciones de *antillarum* y la cubierta de macroalgas en la
536 Marine protectó unreas en comparación con una zona altamente explotada (Islas Canarias-
537 Océano Atlántico oriental). Aquat Conserv Marine Freshwater Res. 66. 259 a 270.

- 538 53. Majeske AJ; Mercado Capote AJ; Komissarov A, et al. (2022): Datos de apoyo para "El
539 primer genoma mitocondrial completo de *Diadema antillarum* (Diadematoida,
540 Diadematidae)" Base de datos GigaScience. <http://dx.doi.org/10.5524/102326>

Este preprint fue presentado bajo las siguientes condiciones:

- Los autores declaran que son conscientes de que son los únicos responsables del contenido del preprint y que el depósito en SciELO Preprints no significa ningún compromiso por parte de SciELO, excepto su preservación y difusión.
- Los autores declaran que se obtuvieron los términos necesarios del consentimiento libre e informado de los participantes o pacientes en la investigación y se describen en el manuscrito, cuando corresponde.
- Los autores declaran que la preparación del manuscrito siguió las normas éticas de comunicación científica.
- Los autores declaran que los datos, las aplicaciones y otros contenidos subyacentes al manuscrito están referenciados.
- El manuscrito depositado está en formato PDF.
- Los autores declaran que la investigación que dio origen al manuscrito siguió buenas prácticas éticas y que las aprobaciones necesarias de los comités de ética de investigación, cuando corresponda, se describen en el manuscrito.
- Los autores declaran que una vez que un manuscrito es postado en el servidor SciELO Preprints, sólo puede ser retirado mediante solicitud a la Secretaría Editorial deSciELO Preprints, que publicará un aviso de retracción en su lugar.
- Los autores aceptan que el manuscrito aprobado esté disponible bajo licencia [Creative Commons CC-BY](#).
- El autor que presenta el manuscrito declara que las contribuciones de todos los autores y la declaración de conflicto de intereses se incluyen explícitamente y en secciones específicas del manuscrito.
- Los autores declaran que el manuscrito no fue depositado y/o previamente puesto a disposición en otro servidor de preprints o publicado en una revista.
- Si el manuscrito está siendo evaluado o siendo preparando para su publicación pero aún no ha sido publicado por una revista, los autores declaran que han recibido autorización de la revista para hacer este depósito.
- El autor que envía el manuscrito declara que todos los autores del mismo están de acuerdo con el envío a SciELO Preprints.