

1 Neotropical Helminthology, 2024, vol. 18 (2), XX-XX.

2 DOI: <https://doi.org/10.62429/rnh20242181822>

3 Este artículo es publicado por la revista Neotropical Helminthology de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Universidad
4 Nacional Federico Villarreal, Lima, Perú auspiciado por la Asociación Peruana de Helminología e Invertebrados Afines (APHIA).
5 Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional
6 (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier
7 medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original.



9 ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

10
11 An alternative technique for preparing monogeneans

12
13 Uma técnica alternativa para a preparação de monogenéticos

14
15 Una técnica alternativa para la preparación de monogeneos

16
17 Moisés Gallas¹* & Eliane Fraga da Silveira¹

18 ¹ Laboratório de Zoologia dos Invertebrados, Museu de Ciências Naturais,
19 Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 92425-900, Rio Grande do Sul, Brazil.

20
21 * Corresponding author: mgallas88@gmail.com

22
23 Titulillo: technique for preparing monogeneans

24 Gallas & Fraga da Silveira

25
26 Moisés Gallas:  <https://orcid.org/0000-0003-4525-009X>

27 Eliane Fraga da Silveira:  <https://orcid.org/0000-0002-0992-5136>

28
29 **ABSTRACT**

30 Monogeneans encompass a group of parasites whose identification requires the
31 visualization of both internal and external morphology. In most cases, the techniques
32 involve many steps and the use of restricted substances, in addition to the necessity of
33 protective equipment. Faure's mounting medium, an aqueous medium similar to
34 Hoyer's mounting medium, has already been used for the preparation of the group. The

35 aim of this study was to evaluate the effectiveness of Faure's medium for the mounting
36 of stained specimens. For this purpose, specimens of *Microcotyle pomatomi* Goto,
37 1900 and *Gotocotyla acanthura* (Parona & Perugia, 1896) Meserve, 1938, collected
38 from *Pomatomus saltatrix* (Linnaeus, 1766) in the southernmost part of Brazil were
39 used. The monogeneans were stained with five different dyes and mounted between a
40 slide and coverslip using Faure's mounting medium. The specimens that exhibited the
41 best results were stained with Gomori's trichrome and Semichon's acetic carmine.
42 Monogeneans stained with eosin and fast green showed less satisfactory results,
43 primarily because they did not highlight the structures of the reproductive systems. The
44 analysis after years of preparation revealed that the characteristics and conditions of
45 the staining and preparations remained in good condition, ensuring durability. The
46 technique presented establishes a quick and effective method and provides an
47 alternative for mounting monogeneans, especially when dealing with large
48 infrapopulations.

49
50 **Keywords:** Faure's medium – Gomori's trichrome – method – mounting – Semichon's
51 acetic carmine – staining

54 **RESUMO**

55 Monogenéticos compreendem um grupo de parasitos cuja identificação necessita a
56 visualização da morfologia interna e externa. Na maioria dos casos, as técnicas
57 requerem muitas etapas e a utilização de substâncias de uso restrito, além da
58 necessidade de equipamentos para proteção. O meio de montagem de Faure, um
59 meio aquoso similar ao meio de montagem de Hoyer, já foi utilizado para a preparação
60 do grupo. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do meio de Faure na montagem
61 de monogenéticos corados. Foram utilizados espécimes de *Microcotyle pomatomi*
62 Goto, 1900 e *Gotocotyla acanthura* (Parona & Perugia, 1896) Meserve, 1938,
63 coletados de *Pomatomus saltatrix* (Linnaeus, 1766) no extremo sul do Brasil. Os
64 monogenéticos foram corados com cinco corantes e montados entre lâmina e lamínula
65 com o meio de montagem de Faure. Os melhores resultados foram obtidos com os
66 espécimes corados com tricrômico de Gomori e carmin acético de Semichon.
67 Monogenéticos corados com eosina e *fast green* apresentaram resultados menos
68 satisfatórios, principalmente por não evidenciarem as estruturas dos sistemas
69 reprodutores. A análise realizada após anos da preparação evidenciou que as
70 características e condições das colorações e preparações permaneceram em bom
71 estado, garantindo a durabilidade. A técnica apresentada é um método rápido e eficaz,

72 e constitui uma alternativa para a montagem de monogenéticos, principalmente
73 quando são encontradas infrapopulações numerosas.

74

75 **Palavras-chave:** carmim acético de Semichon – coloração – meio de Faure – método
76 – montagem – tricrômico de Gomori

77

78

79 **RESUMEN**

80 Los monogéneos son un grupo de parásitos cuya identificación depende de la
81 visualización de su morfología interna y externa. En la mayoría de los casos, las
82 técnicas requieren múltiples pasos y el uso de sustancias restringidas, además de la
83 necesidad de equipos de protección. El medio de montaje de Faure, un medio acuoso
84 similar al medio de montaje de Hoyer, ya se ha utilizado para la preparación de estos
85 parásitos. El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia del medio de Faure en el
86 montaje de monogéneos coloreados. Se utilizaron especímenes de *Microcotyle*
87 *pomatomi* Goto, 1900 y *Gotocotyla acanthura* (Parona & Perugia, 1896) Meserve,
88 1938, colectados de *Pomatomus saltatrix* (Linnaeus, 1766) en el extremo sur de Brasil.
89 Los monogéneos fueron coloreados con cinco colorantes y montados entre la lámina y
90 el cubreobjetos utilizando el medio de montaje de Faure. Los mejores resultados se
91 obtuvieron con los especímenes coloreados con tricrómico de Gomori y carmín acético
92 de Semichon. Los monogéneos coloreados con eosina y *fast green* presentaron
93 resultados menos satisfactorios, especialmente porque no evidenciaron las estructuras
94 de los sistemas reproductores. El análisis realizado después de años de preparación
95 demostró que las características y condiciones de las coloraciones y preparados se
96 mantuvieron en buen estado, garantizando la durabilidad. La técnica presentada es en
97 método rápido y eficaz, y se presenta como una alternativa para el montaje de
98 monogéneos, especialmente cuando se encuentran infrapoblaciones numerosas.

99

100 **Palabras clave:** carmín acético de Semichon – coloración – medio de Faure – método
101 – montaje – tricrómico de Gomori

102

103

104 **INTRODUÇÃO**

105 Um dos procedimentos para identificar uma espécie de parasito é a coloração
106 dos espécimes, como é o caso dos monogenéticos, através de diferentes protocolos
107 (Yamaguti, 1965; Pritchard & Kruse, 1982; Mo & Appleby, 1990; Amato *et al.*, 1991;
108 Richards & Chubb, 1995; Deveney & Whittington, 2001; Chaudhary *et al.*, 2004; Cribb

109 *et al.*, 2004; Eiras *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2006; Košková *et al.*, 2010; García-
110 Vásquez *et al.*, 2012; Justine *et al.*, 2012; Ayadi *et al.*, 2022; Nejat *et al.*, 2023;
111 Ramírez-Cruz *et al.*, 2023). Essas técnicas foram desenvolvidas para processar
112 espécimes para estudos morfológicos e mais recentemente, para pesquisas de
113 obtenção de material genético e estudos moleculares.

114 Um dos problemas enfrentados pelos parasitologistas que estudam a
115 morfologia dos helmintos, e particularmente dos monogenéticos, é a montagem
116 permanente de espécimes em lâminas. Esse processo normalmente requer um
117 corante, usualmente o tricrômico de Gomori, para evidenciar as estruturas
118 morfológicas que serão úteis para a identificação (Amato *et al.*, 1991; Eiras *et al.*,
119 2006; Thatcher, 2006). Posteriormente à coloração, existe um processo de clarificação
120 ou diafanização para incorporação em um meio de montagem. Para a clarificação dos
121 monogenéticos, muitos protocolos apresentam a utilização de uma substância que na
122 maioria das vezes é tóxica e/ou cancerígena (Brasil, 2013), como é o caso do xileno e
123 do creosoto de Faia (Yamaguti, 1965; Pritchard & Kruse, 1982; Amato *et al.*, 1991;
124 Eiras *et al.*, 2006). Adicionalmente, a manipulação do material em contato com essas
125 substâncias requer cuidado e a utilização de equipamentos de proteção individual e
126 coletiva, como é o caso das cabines de segurança.

127 O meio de montagem de Faure constitui em um meio aquoso, com composição
128 similar ao meio de Hoyer (Sewell *et al.*, 2006; Amato & Amato, 2010), que é muito
129 utilizado para a montagem de monogenéticos (Eiras *et al.*, 2006; Thatcher, 2006). O
130 meio de montagem de Faure vem sendo usado para a montagem de estruturas de
131 diferentes grupos, como os temnocefalídeos (Seixas *et al.*, 2018), monogenéticos
132 (Gallas *et al.*, 2014, 2015, 2016) e os cestoides (Silveira & Amato, 2008, 2010).
133 Contudo, as preparações obtidas diretamente com o meio de montagem de Faure
134 permanecem sem coloração, o que dificulta a visualização de estruturas internas.

135 Diferentes autores desenvolveram protocolos utilizando espécimes corados
136 para a preparação em meios de montagem. Kritsky *et al.* (1978) apresentaram uma
137 técnica na qual espécimes de monogenéticos foram corados pelo tricrômico de Gomori
138 e após foram montados com meio de montagem de Gray & Wess. Similarmente,
139 Gallas *et al.* (2015) utilizaram uma técnica na qual monogenéticos foram corados pelo
140 carmim de Semichon e montados com o meio de montagem de Faure. No presente
141 estudo, foi avaliada a eficácia da técnica de Gallas *et al.* (2015) e a utilização de
142 diferentes corantes com o meio de montagem de Faure.

143

144 MATERIAL E MÉTODOS

145

146 Espécimes de *Microcotyle pomatomi* Goto, 1900 e *Gotocotyla acanthura*
147 (Parona & Perugia, 1896) Meserve, 1938 utilizados no presente estudo foram
148 coletados de *Pomatomus saltatrix* (Linnaeus, 1766) do município de Tramandaí, Rio
149 Grande do Sul, extremo sul do Brasil. Os monogenéticos foram fixados em formalina
150 5% e conservados em etanol 70° GL (Gallas *et al.*, 2014). A identificação dos parasitos
151 foi realizada de acordo com Yamaguti (1963) e Cohen *et al.* (2013).

152 Monogenéticos foram corados por 3 a 10 minutos em cada corante, de acordo
153 com as fórmulas descritas em diferentes protocolos: tricrômico de Gomori (Humason,
154 1979), carmim acético de Semichon (Amato & Amato, 2010), hematoxilina de Delafield
155 (Humason, 1979; Amato & Amato, 2010), eosina (Humason, 1979) e *fast green*
156 (Humason, 1979). Posteriormente, cada espécime foi transferido com uma agulha
157 histológica para uma lâmina com uma gota do meio de montagem de Faure e coberto
158 com uma lamínula. A fórmula do meio de montagem de Faure utilizada seguiu Amato
159 & Amato (2010).

160 Para comparar a eficácia da coloração e preparação, os espécimes foram
161 observados logo após a montagem e acompanhados durante nove anos. As lâminas
162 montadas foram armazenadas em caixas porta lâminas de material ABS (*acrylonitrile*
163 *butadiene styrene*), com capacidade para 50 lâminas e mantidas em temperatura
164 ambiente. Fotomicrografias foram realizadas utilizando uma câmera acoplada a um
165 microscópio de luz. As lâminas foram depositadas na Coleção Helmintológica (CHMU)
166 no Museu de Ciências Naturais da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), em
167 Canoas, Rio Grande do Sul, Brasil.

168
169 **Aspectos éticos:** os parasitos utilizados fazem parte do material da Coleção
170 Helmintológica (CHMU 206, CHMU 222, CHMU 226) do Museu de Ciências Naturais
171 da ULBRA, Brasil. Os peixes foram obtidos comercialmente, todos adquiridos mortos.

172

173

174 **RESULTADOS**

175

176 Os monogenéticos utilizados apresentaram tamanho total do corpo entre 3,40 a
177 8,62mm. Os espécimes corados com tricrômico de Gomori e carmim acético de
178 Semichon apresentaram os melhores resultados, com a maioria das estruturas
179 morfológicas possíveis de visualização (Tabela 1, Fig. 1). Os monogenéticos corados
180 com hematoxilina de Delafield apresentaram resultados pouco eficientes e os corados
181 com eosina e o *fast green* apresentaram, principalmente, as estruturas relacionadas
182 aos sistemas reprodutores de difícil ou nenhuma visualização (Tabela 1, Fig. 2).

183 Na preparação com o meio de montagem de Faure, foi visualizada uma
 184 pequena remoção dos corantes quando os espécimes foram transferidos para o meio.
 185 Adicionalmente, não foram observadas mudanças na coloração dos espécimes
 186 quando as lâminas foram reexaminadas através de microscopia após longo período
 187 (três, cinco e nove anos) da montagem. Pelas características do meio e por ser um
 188 meio de montagem temporário, não foram evidenciados danos a preparação,
 189 tampouco foi visualizada a formação de mofo nas extremidades da lamínula.

190

191 **Tabela 1.** Comparação das estruturas após utilização de diferentes corantes e
 192 montagem com meio de montagem de Faure.

Estrutura	Corantes				
	Tricrômico de Gomori	Carmim acético de Semichon	Hematoxilina de Delafield	Eosina	<i>Fast green</i>
Glândulas cefálicas	+	+	+/-	+	+
Órgãos bucais	+	+	+	+	+
Faringe	+	+	+	-	+/-
Esôfago	+	+	+	+/-	+/-
Cecos intestinais	+	+	+	+	+
Átrio genital	+	+	+	+	+/-
Testículos	+	+	+	+/-	+/-
Vaso/canal deferente	-	-	-	-	-
Ovário	+	+	+/-	-	-
Vagina	+/-	+/-	-	-	-
Vitelário	+	+	+	+	+
Ducto vitelínico	+	+	+/-	-	-
Ovos	+	+	+	+	+
Grampos	+	+	+	+	+

193 Legenda = +: visualização possível; +/-: visualização parcial; -: não visualizado ou de
 194 difícil visualização.

195

196 **Figura 1.** Monogenéticos corados e montados em meio de montagem de Faure: A e B,
197 região anterior e posterior, respectivamente, de espécime corado com carmim acético
198 de Semichon; C e D, região anterior e posterior, respectivamente, de espécime corado
199 com tricrômico de Gomori; E e F, região anterior e posterior, respectivamente, de
200 espécime corado com hematoxilina de Delafield. Barras = 150 µm
201

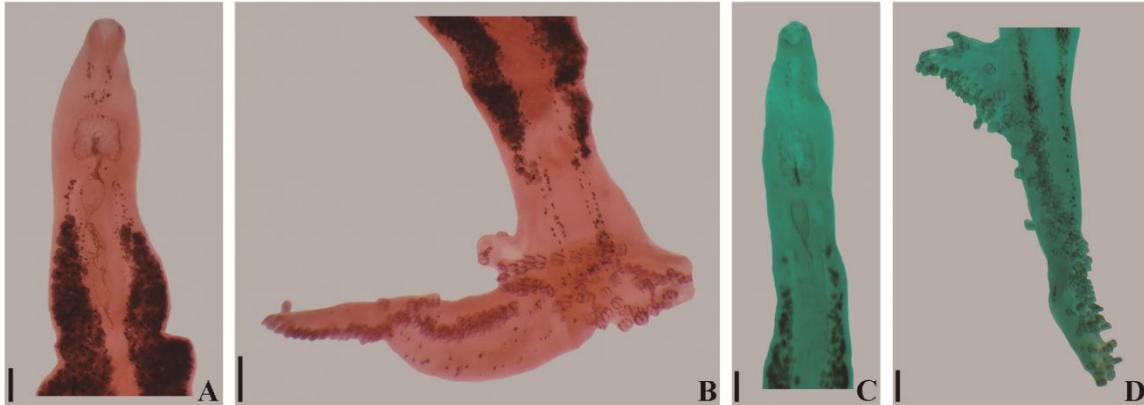


202

203

204 **Figura 2.** Monogenéticos corados e montados em meio de montagem de Faure: A e B,
205 região anterior e posterior, respectivamente, de espécime corado com eosina; C e D,

206 região anterior e posterior, respectivamente, de espécime corado com *fast green*.
207 Barras = 150 µm
208



209

210

211 DISCUSSÃO

212

213 O meio de montagem de Faure foi utilizado no presente estudo pela
214 similaridade ao meio de Hoyer (Eiras *et al.*, 2006; Thatcher, 2006; Amato & Amato,
215 2010). Os melhores resultados foram obtidos com os espécimes a partir de corantes já
216 utilizados para o grupo dos monogenéticos, como o tricrômico de Gomori (Kritsky *et*
217 *al.*, 1978; Eiras *et al.*, 2006; Thatcher, 2006) e o carmim acético de Semichon (Gallas
218 *et al.*, 2015), um dentre os tipos de carmins utilizados para corar monogenéticos
219 (Boudaya *et al.*, 2006; Chero *et al.*, 2018). Para a identificação dos gêneros de
220 monogenéticos, é necessário observar as estruturas do haptor e sistemas
221 reprodutores (Yamaguti, 1963), que poderão ser visualizadas nos espécimes
222 preparados com os corantes supracitados.

223 Nas montagens realizadas no presente estudo, somente um pouco do corante
224 foi removido quando os espécimes foram transferidos para o meio de montagem de
225 Faure, característica também encontrada quando monogenéticos são montados pela
226 técnica de Kritsky *et al.* (1978) (Thatcher, 2006). Nesta pesquisa, a técnica foi
227 realizada com monogenéticos coletados de peixes marinhos, portanto a utilização de
228 outros grupos de monogenéticos requer mais estudo, pois muitos possuem tamanho
229 diminuto, como é o caso dos monogenéticos parasitos de peixes de água doce.
230 Devido a composição do meio de montagem de Faure, os espécimes muito pequenos
231 podem perder totalmente ou parcialmente o corante adquirido, limitando a técnica.
232 Além disso, a qualidade dos espécimes relacionada com o tempo entre a coleta nos
233 hospedeiros e a fixação dos tecidos, também influencia na coloração e montagem.

234 A técnica apresentada e comparada no presente estudo constitui em uma
235 alternativa ao uso de substâncias com restrição de uso. Alguns pesquisadores têm
236 utilizado o óleo de cravo nas preparações permanentes (Neifar *et al.*, 2000; Bullard *et*
237 *al.*, 2003; Jithendran *et al.*, 2005; Boudaya *et al.*, 2006), como alternativa às
238 substâncias como xileno e creosoto de Faia. Contudo, essas técnicas ainda requerem
239 uma sequência de etapas de manipulação dos espécimes em diferentes substâncias,
240 que podem causar a perda dos monogenéticos (Silveira & Almeida, 2014),
241 principalmente devido ao tamanho dos espécimes. Uma vantagem que a técnica
242 adaptada no presente estudo oferece é evitar a contínua manipulação supracitada.
243 Outras vantagens incluem a simplicidade dos componentes utilizados na fórmula e a
244 desnecessária utilização de equipamentos de laboratório como cabines de segurança,
245 que devem ser usadas quando os espécimes são montados com creosoto de Faia
246 (Pritchard & Kruse, 1982; Amato *et al.*, 1991; Eiras *et al.*, 2006).

247 As técnicas utilizadas por Kritsky *et al.* (1978), Gallas *et al.* (2015) e a
248 apresentada neste estudo não substituem os procedimentos de coloração,
249 diferenciação, desidratação e clarificação para a montagem em bálsamo do Canadá
250 ou outra substância. Estas montagens são realizadas principalmente ao descrever
251 uma espécie nova, nas quais alguns espécimes designados como o holótipo e os
252 parátipos serão depositados em coleções de referência. A técnica apresentada no
253 presente trabalho constitui uma alternativa à utilização de substâncias de uso restrito,
254 principalmente se for possível a montagem de alguns espécimes de uma
255 infrapopulação numerosa. Nestas condições, a presente técnica pode evidenciar
256 determinadas estruturas, permitindo a descrição morfológica.

257

258

259 **AGRADECIMENTO**

260

261 Ao Tiago S. Sarmiento, pela coleta dos monogenéticos realizada durante o
262 Trabalho de Conclusão de Curso e que foram utilizados no presente estudo.

263

264 **Author contributions: CRediT (Contributor Roles Taxonomy)**

265 **MG** = Moisés Gallas

266 **EFS** = Eliane Fraga da Silveira

267

268 **Conceptualization:** MG, EFS

269 **Data curation:** MG, EFS

270 **Formal Analysis:** MG, EFS

271 **Funding acquisition:** MG, EFS
272 **Investigation:** MG, EFS
273 **Methodology:** MG, EFS
274 **Project administration:** MG, EFS
275 **Resources:** MG, EFS
276 **Software:** MG, EFS
277 **Supervision:** MG, EFS
278 **Validation:** MG, EFS
279 **Visualization:** MG, EFS
280 **Writing – original draft:** MG, EFS
281 **Writing – review & editing:** MG, EFS

283 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 284
285 Amato, J.F.R., Boeger, W.A., & Amato, S.B. (1991). *Protocolos para laboratório –*
286 *coleta e processamento de parasitos do pescado*. Imprensa Universitária-UFRRJ.
287
288 Amato, J.F.R., & Amato, S.B. (2010). Técnicas gerais para coleta e preparação de
289 helmintos endoparasitos de aves. In: Von Matter, S., Straube, F.C., Accordi, I.A.,
290 Piacentini, V.Q., Cândido-Jr, J.F. (Orgs). *Ornitologia e Conservação: Ciência Aplicada,*
291 *Técnicas de Pesquisa e Levantamento*. Technical Books (pp. 369-393).
292
293 Ayadi, Z.E.M, Tazerouti, F., Gey. D., & Justine, J.L. (2022). A revision of
294 *Plectanocotyle* (Monogenea, Plectanocotylidae), with molecular barcoding of three
295 species and the description of a new species from the streaked gurnard
296 *Chelidonichthys lastoviza* off Algeria. *PeerJ*, 10, e12873.
297
298 Brasil, Ministério da Saúde (2013). *Diretrizes para a vigilância do câncer relacionado*
299 *ao trabalho*. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.
300
301 Boudaya, L., Neifar, L., & Euzet, L. (2006). *Plectanocotyle major* sp. n. (Monogenea:
302 *Plectanocotylidae*), a gill parasite of *Chelidonichthys obscurus* (Teleostei: Triglidae)
303 from the Mediterranean Sea. *Folia Parasitologica*, 53, 53-56.
304
305 Bullard, S.A., Goldstein, R.J., Hocking, R., & Jewell, J. (2003). A new geographic
306 locality and three new host records for *Neobenedenia melleni* (MacCallum)
307 (Monogenea: Capsalidae). *Gulf and Caribbean Research*, 15, 1-4.

308

309 Chaudhary, A., Verma, C., & Singh, H.S. (2014). Ribosomal DNA as molecular
310 markers and their applications in the identification of fish parasites (Platyhelminthes:
311 Monogenea) from India. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4, 82-84.

312

313 Chero, J.D., Cruces, C.L., Sáez, G., Camargo, A.C.A., Santos, C.P., & Luque, J.L.
314 (2018). *Hypanocotyle bullardi* n. gen. n. sp. (Monogenea: Hexabothriidae) from gill of
315 the diamond stingray *Hypanus dipterurus* (Jordan et Gilbert) (Myliobatiformes:
316 Dasyatidae) in the Southeastern Pacific Ocean off Peru. *Parasitology International*, 67,
317 425-430.

318

319 Cohen, S.C., Justo, M.C.N., & Kohn, A. (2013). *South American Monogenoidea*
320 *parasites of fishes, amphibians and reptiles*. Oficina de Livros.

321

322 Cribb, B., Armstrong, W., & Whittington, I. (2004). Simultaneous fixation using
323 glutaraldehyde and osmium tetroxide or potassium ferricyanide-reduced osmium for
324 the preservation of monogenean flatworms: An assessment for *Merizocotyle icopae*.
325 *Microscopy Research & Technique*, 63, 102-110.

326

327 Deveney, M.R., & Whittington, I.D. (2001). A technique for preserving pigmentation in
328 some capsalid monogeneans for taxonomic purposes. *Systematic Parasitology*, 48, 31-
329 35.

330

331 Eiras, J.C., Takemoto, R.M., & Pavanelli, G.C. (2006). *Métodos de estudo e técnicas*
332 *laboratoriais em parasitologia de peixes*. Eduem.

333

334 García-Vásquez, A., Shinn, A.P., & Bron, J.E. (2012). Development of a light
335 microscopy stain for the sclerites of *Gyrodactylus* von Nordmann, 1832 (Monogenea)
336 and related genera. *Parasitology Research*, 110, 1639-1648.

337

338 Gallas, M., Calegario-Marques, C., & Amato, S.B. (2014). A new species of
339 *Cacatuocotyle* (Monogenea, Dactylogyridae) parasitizing two species of *Astyanax*
340 (Ostariophysi, Characidae) in southern Brazil. *Acta Parasitologica*, 59, 638-642.

341

342 Gallas, M., Silveira, E.F., & Périco, E. (2015). First report of *Pterinotrematoides*
343 *mexicanum* Caballero & Bravo-Hollis, 1955 (Monogenea, Macrovalvitrematidae) in

344 *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) (Perciformes, Sciaenidae) from the coastal
345 zone of the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *CheckList*, 11, 1568.

346

347 Gallas, M., Calegario-Marques, C., & Amato, S.B. (2016). A new species of
348 *Characithecium* (Monogenea: Dactylogyridae) from external surface and gills of two
349 species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characidae) in southern Brazil. *Revista Mexicana*
350 *de Biodiversidad*, 87, 903-907.

351

352 Humason, G.L. (1979). *Animal tissue techniques*. W. H. Freeman and Company.

353

354 Jithendran, K.P., Vijayan, K.K., Alavandi, S.V., & Kailasam, M. (2005). *Benedenia*
355 *epinepheli* (Yamaguti 1937), a monogenean parasite in captive broodstock of grouper,
356 *Epinephelus tauvina* (Forsk.) *Asian Fisheries Science*, 18, 121-126.

357

358 Justine, J.L., Briand, M.J., & Bray, R.A. (2012). A quick and simple method, usable in
359 the field, for collecting parasites in suitable condition for both morphological and
360 molecular studies. *Parasitology Research*, 111, 341-351.

361

362 Košková, E., Matějusková, I., Cíváňová, K., & Koubková B. (2010). Ethanol-fixed
363 material used for both classical and molecular identification purposes: *Eudiplozoon*
364 *nipponicum* (Monogenea: Diplozoidae) as a case parasite species. *Parasitology*
365 *Research*, 107, 909-914.

366

367 Kritsky, D.C., Leiby, P.D., & Kayton, R.J. (1978). A Rapid Stain Technique for the
368 Haptorial Bars of *Gyrodactylus* Species (Monogenea). *Journal of Parasitology*, 64, 172-
369 174.

370

371 Mo, T.A., & Appleby, C. (1990). A special technique for studying haptorial sclerites of
372 monogeneans. *Systematic Parasitology*, 17, 103-108.

373

374 Neifar, L., Euzet, L., & Ben Hassine, O.K. (2000). New species of the Monocotylidae
375 (Monogenea) from the stingray *Dasyatis tortonesi* Capapé (Euselachii, Dasyatidae) off
376 the Tunisian coast, with comments on host-specificity and the specific identities of
377 Mediterranean stingrays. *Systematic Parasitology*, 47, 43-50.

378

379 Nejat, F., Benovics, M., Řehulková, E., Vukić, J., Šanda, R., Kaya, C., Tarkan, A.S.,
380 Abdoli, A., Aksu, S. & Šimková, A. (2023). Diversity, phylogeny and intraspecific

381 variability of *Paradiplozoon* species (Monogenea: Diplozoidae) parasitizing endemic
382 cyprinoids in the Middle East. *Parasitology*, 150, 705-722.

383

384 Pritchard, M.H., & Kruse, G.O.W. (1982). *The collection and preservation of animal*
385 *parasites*. University of Nebraska Press.

386

387 Ramírez-Cruz, E.S., Monks, S., Manríquez-Morán, N.L., Violante-González, J. &
388 Pulido-Flores, G. (2023). New species of *Protomicrocotyle* (Monogenea:
389 Protomicrocotylidae), and new information on *P. mirabilis*, parasites of *Caranx* spp.
390 from Veracruz, México. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 32, e009523.

391

392 Richards, G., & Chubb, J. (1995). Trichrome staining of *Gyrodactylus sclerites* and soft
393 tissues following fixation in ammonium picrate-glycerin, including an improved rendition
394 of the haptor bars of *G. turnbulli*. *Journal of Helminthology*, 69, 149-154.

395

396 Seixas, S.A., Dametto, N., & Périco, E. (2018). New species of *Temnocephala*
397 (Platyhelminthes, Temnocephalida) ectosymbiont on vulnerable species of aeglids
398 (Crustacea, Anomura) from the Neotropical Region. *Biota Neotropica*, 18, e20170475.

399

400 Sewell, K.B., Cannon, L.R.G., & Bray, R.A. (2006). A review of *Temnohaswellia* and
401 *Temnosewellia* (Platyhelminthes: Temnocephalida: Temnocephalidae) ectosymbionts
402 from Australian crayfish *Euastacus* (Parastacidae). *Memoirs of the Queensland*
403 *Museum*, 52, 199-280.

404

405 Silveira, E.F., & Amato, S.B. (2008). *Diploposthe laevis* (Bloch) Jacobi (Eucestoda,
406 Hymenolepididae) from *Netta peposaca* (Vieillot) (Aves: Anatidae): first record for the
407 Neotropical Region and a new host. *Revista Brasileira de Zoologia*, 25, 83-88.

408

409 Silveira, E.F., & Amato, S.B. (2010). *Microsomacanthus hopkinsi* (Eucestoda,
410 Hymenolepididae) in *Netta peposaca* (Aves, Anatidae). *Neotropical Helminthology*, 4,
411 105-111.

412

413 Silveira, A.C.A., & Almeida, K.S.S. (2014). Sobre variações na técnica de tricrômico de
414 Gomori para estudo de helmintos da classe Monogenoidea e família Dactylogyridae.
415 *Perspectivas Online: Biológicas & Saúde*, 4, 1-7.

416

417 Thatcher, V.E. (2006). *Amazon Fish Parasites. Volume I*. Penssoft Publishers.

418

419 Wong, W.L., Tan, W.B., & Lim, L.H.S. (2006). Sodium dodecyl sulphate as a rapid
420 clearing agent for studying the hard parts of monogeneans and nematodes. *Journal of*
421 *Helminthology*, 80, 87-90.

422

423 Yamaguti, S. (1963). *Systema Helminthum. Volume IV. Monogenea and*
424 *Aspidocotylea*. Interscience Publishers.

425

426 Yamaguti, S. (1965). Preparation of stained whole mounts of flatworms. *Transactions*
427 *of the American Microscopical Society*, 84, 602-603.

428 Received September 4, 2024.

429 Accepted October 11, 2024.

ASAP