

## Assessment of homeopathic medicines on survival and antioxidant response in white shrimp *Litopenaeus vannamei*

### Evaluación de medicamentos homeopáticos en la supervivencia y respuesta antioxidante del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* infectado con *Vibrio parahaemolyticus*

José Mazón-Suástegui<sup>1</sup> Ph.D, Milagro García-Bernal<sup>2</sup> Ph.D, Araceli Avilés-Quevedo<sup>3</sup> Ph.D, Ángel Campa-Córdova<sup>1</sup> Ph.D, Joan Salas-Leiva<sup>1</sup> Ph.D, Fernando Abasolo-Pacheco<sup>4\*</sup> Ph.D.

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C., La Paz, Baja California Sur, México. <sup>2</sup>Centro de Bioactivos Químicos, Universidad Central de Las Villas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. <sup>3</sup>Instituto Nacional de Pesca (INAPESCA), La Paz, Baja California Sur, México. Investigador jubilado. <sup>4</sup>Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Facultad de Ciencias Agrarias, Quevedo, Ecuador.\*Correspondence: [fabasolo@uteq.edu.ec](mailto:fabasolo@uteq.edu.ec)

Received: November 2017; Accepted: June 2018.

#### RESUMEN

**Objetivo.** Evaluar el efecto de medicamentos homeopáticos sobre la supervivencia y actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) del camarón *Litopenaeus vannamei* sometido a infección con *Vibrio parahaemolyticus*. **Materiales y métodos.** Se determinó la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) para la cepa patógena en juveniles de *L. vannamei*, bajo los métodos de inmersión (Inm), inyección (Iny) e incisión + inmersión (Inc+Inm). Luego el efecto de cuatro medicamentos homeopáticos sobre juveniles de *L. vannamei* retados con *Vibrio parahaemolyticus* fue evaluado usando el índice de supervivencia y la actividad SOD. Se aplicaron cuatro tratamientos: (1) Mezcla CIB®-HOM Heel-Mix (TH1), constituido por igual proporción v/v, de Cyme-Heel®, Gal-Heel®, Hepa-Heel®, Mucs-Heel® y Chol-Heel®; (2) Mezcla CIB®-HOM Pav-Mix (TH2), constituido por igual proporción v/v de *Passiflora incarnata*, *Valeriana officinalis*, *Zincum valerianicum* e *Ignatia amara* (Similia®); (3) Heel-Mix/Pav-Mix (TH3) constituido por una combinación 1:1 v/v de los tratamientos TH1 y TH2, y (4) ViT-Mix (TH4), constituido por Vidatox®, y un control (no tratado/infectado). **Resultados.** Al aplicar los métodos Inm, Iny e Inc+Inm la DL<sub>50</sub> fue de 0.9 x 10<sup>6</sup>; 0.6 x 10<sup>6</sup> y 0.5 x 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Los camarones tratados con TH3 y TH4 presentaron una mayor actividad de SOD con respecto al grupo control (p<0.05). Al final del reto, los grupos TH2, TH3 y TH4 tuvieron una supervivencia mayor a la del grupo control (p<0.05). **Conclusiones.** Los tratamientos homeopáticos (TH3 y TH4), aumentaron la actividad de la enzima SOD y la supervivencia en juveniles de *L. vannamei*, retados con *V. parahaemolyticus*. Esto sugiere que los tratamientos homeopáticos empleados tienen potencial como alternativa para el control de *V. parahaemolyticus* y sus enfermedades asociadas, incluido el síndrome de mortalidad temprana en el cultivo del camarón

**Palabras Clave:** Camarón; homeopatía acuícola; respuesta inmune, *Vibrio parahaemolyticus* (Fuente: CAB).

## ABSTRACT

**Objective.** Evaluating the effect of homeopathic medicines on survival and activity of the superoxide dismutase (SOD) enzyme in white shrimp *Litopenaeus vannamei* subjected to infection with the pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*. **Materials and methods.** The average lethal dosage (LD<sub>50</sub>) was determined for the pathogen strain in *L. vannamei* juveniles under immersion (Imm), injection (Inj) and incision + immersion (Inc+Imm) methods. Four treatments were applied: (1) Mix CIB®-HOM Heel-Mix (TH1), constituted by equal v/v ratio, of Cyme-Heel®, Gal-Heel®, Hepa-Heel®, Mucs-Heel® and Chol-Heel®; (2) Mix CIB®-HOM Pav-Mix (TH2), constituted by the same v/v ratio of *Passiflora incarnata*, *Valeriana officinalis*, *Zincum valerianicum* and *Ignatia amara* (Similia®); (3) Heel-Mix/Pav-Mix (TH3) consisting of a 1:1 v/v combination of the TH1 and TH2 treatments, and (4) ViT-Mix (TH4), constituted by Vidatox®, and a control (not treated/infected). **Results.** While applying the methods Imm, Inj and Inc+Imm, LD<sub>50</sub> was 0.9 x 10<sup>6</sup>; 0.6 x 10<sup>6</sup> and 0.5 x 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, respectively. At the end of the challenge, the groups treated with TH2, TH3 and TH4 had a greater survival rate to that of the control group (p<0.05). Moreover, these two last treatments showed a greater SOD activity with respect to the control group (p<0.05). **Conclusions.** The homeopathic treatments (TH3 and TH4) increased survival and SOD activity in *L. vannamei* juveniles challenged with *V. parahaemolyticus*, which suggests that the homeopathic treatments employed had the potential as an alternative for the control of *V. parahaemolyticus* and its associated diseases, including the early mortality syndrome in shrimp farming.

**Keywords:** Aquaculture homeopathy; shrimp; immune response; *Vibrio parahaemolyticus*. (Sources: CAB)

## INTRODUCTION

The shrimp *Litopenaeus vannamei* is a species with rapid growth, high survival and price in the market, which makes this crustacean one of the most important resources at world level (1). Nonetheless, the production of this important resource has been hindered by recurrent epizootic outbreaks and sudden mortalities caused by pathogen microorganisms, particularly to pathogenic bacteria *Vibrio parahaemolyticus* that causes the pathology identified as "Early Mortality Syndrome" (EMS), and later called "Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome" (AHPNS) caused by a pathogenic strain of *Vibrio parahaemolyticus* was observed (2). This pathology occurs during the first 30 days post-harvest and could cause up to 100% mortality (3).

To face the challenge, several chemical and antibiotic products have usually been applied (4), whose prophylactic application was initially an effective strategy. However, they have caused the development of resistant bacteria making it necessary to reduce their application (5). These problems have led the shrimp culture industry to explore and develop new strategies that would be as effective or better than antibiotics but respectful to the environment and consumers, and above all sustainably applicable in the medium and long term (6). As part of the search for new options, homeopathy has been confirmed as an alternative with the potential of disease control in farming aquatic and terrestrial animals

## INTRODUCCIÓN

El camarón *Litopenaeus vannamei* es una especie con rápido crecimiento, alta supervivencia y alto precio en el mercado, lo que hacen de este crustáceo, uno de los recursos más importantes en la acuicultura mundial (1). Sin embargo, la producción de este importante recurso, se ha obstaculizado por epizootias recurrentes y mortalidades repentinas, causadas por microorganismos patógenos, particularmente por la bacteria *Vibrio parahaemolyticus* que causa la patología identificada como "Síndrome de Mortalidad Temprana" (EMS-por sus siglas en inglés), y posteriormente como "Síndrome de la Necrosis Hepatopancreática Aguda" (AHPNS-por sus siglas en inglés) (2). Esta patología ocurre durante los primeros 30 días post-siembra y puede causar hasta un 100% de mortalidad (3).

Para hacer frente a esto, generalmente se han aplicado diversos productos químicos y antibióticos (4). La aplicación de antibióticos como profilácticos fue una estrategia efectiva al principio, pero el desarrollo de resistencia bacteriana ha provocado la disminución de los mismos (5). Estos problemas han llevado a la industria camaronícola a explorar y desarrollar nuevas estrategias que sean tan eficaces o mejores que los antibióticos, pero respetuosas con el ambiente y los consumidores y, sobre todo, sostenibles a mediano y largo plazo (6). Como parte de esta búsqueda de nuevas opciones, se ha establecido que la homeopatía es una alternativa con potencial para el control de enfermedades

(7). It has been catalogued as a complementary medication that uses high dilutions of substances that derive from plants, minerals, or animals, and it is based on the similarity principle (8). The animals could benefit from the use of homeopathic products because they stimulate their immune system and specific organic responses (9). Besides contributing preventively by reducing stress, homeopathic treatments can also reduce the application of chemotherapeutic agents and antibiotics avoiding risks for cultured animals, consumers, and the environment (10).

Taking this background into account, the objective of this study was to assess the effect of homeopathic medication on survival and antioxidant response in *L. vannamei* before infection with *V. parahaemolyticus*.

## MATERIALS AND METHODS

**Study site.** The experiment was performed in the Mollusc Laboratory of Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) in La Paz, Baja California Sur, México. Juveniles of *L. vannamei* ( $8 \pm 0.05$  g) were obtained from the commercial shrimp laboratory of the company Acualcultura Mahr located in Puerto de Pichilingue, La Paz, México. The shrimp were acclimated in 1500-L fiberglass tanks with filtered seawater at  $1 \mu\text{m}$  and sterilized with UV light, salinity of  $37 \text{ g L}^{-1}$ , continuous airflow and temperature of  $29 \pm 0.5^\circ\text{C}$  for five days. The organisms were fed *ad libitum* three times a day with a balanced diet (Alimento PIASA®, Planta La Paz, B.C.S., México, 35% protein).

**Bacterial strains.** For the survival study, the strain *Vibrio parahaemolyticus* (CIAD-CAIM 170) was used; it was cultivated in tryptone soy broth (TSB; #257107, Difco) at  $35^\circ\text{C}$  for 48 h. The culture was centrifuged at  $4696 \text{ g}$  at  $4^\circ\text{C}$  for 10 min; the pellet was re-suspended in sterile seawater, and bacterial density was adjusted to 1.0 to obtain a final density of  $1 \times 10^9 \text{ UFC mL}^{-1}$  (11).

**Pathogen inoculation and average lethal dosage ( $\text{LD}_{50}$ ) in *Litopenaeus vannamei*.** To determine  $\text{LD}_{50}$ , a batch of shrimp was infected in groups in triplicate by means of three inoculation methods: [immersion (Imm), injection (Inj) and incision + immersion (Inc+Imm)]. For each infection method, three groups (10 shrimp each) were formed with different concentrations ( $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^7$ ) of *V. parahaemolyticus*. For Imm, the shrimp were placed in water at the pathogen concentrations previously mentioned. For Inj the shrimp were injected in the third abdominal

en el cultivo de animales acuáticos y terrestres (7). Esta ha sido catalogada como una medicina complementaria que utiliza altas diluciones de sustancias derivadas de plantas, minerales o animales, y se basa en el principio de similitud (8). Los animales pueden beneficiarse con el uso de productos homeopáticos a través de la estimulación de su sistema inmune y respuestas orgánicas específicas (9). Además de contribuir de manera preventiva mediante la reducción del estrés, los medicamentos homeopáticos también pueden reducir la aplicación de agentes quimioterapéuticos y antibióticos, evitando riesgos para los animales cultivados, para los consumidores, y para el ambiente (10).

Por ello el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de medicamentos homeopáticos sobre la supervivencia y respuesta antioxidante en *L. vannamei* ante la infección con *V. parahaemolyticus*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Sitio de estudio.** El experimento se realizó en el Laboratorio de Moluscos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) en la Paz, Baja California Sur, México. Los juveniles de *L. vannamei* ( $8 \pm 0.05$  g) fueron obtenidos del laboratorio camaronícola comercial de la empresa Acualcultura Mahr ubicado en el Puerto de Pichilingue, La Paz, México. Los camarones se aclimataron durante 5 días en tanques de fibra de vidrio de 1500 L con agua de mar filtrada a  $1 \mu\text{m}$  y esterilizada con luz UV, salinidad de  $37 \text{ g L}^{-1}$ , aireación continua y temperatura de  $29 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . Los organismos fueron alimentados *ad libitum* tres veces al día con una dieta balanceada (Alimento PIASA®, Planta La Paz, B.C.S., México, 35% de proteína).

**Cepas bacterianas.** Para el estudio de supervivencia, se utilizó la cepa *Vibrio parahaemolyticus* CIAD-CAIM 170, la cual fue cultivada en caldo triptona soya (TSB; #257107, Difco) a  $35^\circ\text{C}$  por 48 h. El cultivo se centrifugó a  $4696 \text{ g}$  a  $4^\circ\text{C}$  durante 10 min; el *pellet* fue re-suspendido en agua de mar estéril y la densidad bacteriana se ajustó a 1.0 para obtener una densidad final de  $1 \times 10^9 \text{ UFC mL}^{-1}$  (11).

**Métodos de inoculación del patógeno y  $\text{DL}_{50}$  en juveniles de *L. vannamei*.** Los camarones fueron infectados mediante tres métodos [inmersión (Inm), inyección (Inj) e incisión + inmersión (Inc+Inm)] por triplicado. Por cada método de infección se conformaron tres grupos con diferentes concentraciones ( $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^7$ ) de la cepa de *V. parahaemolyticus*, con 10

segment with 30  $\mu$ L of each one of the bacterial concentrations already mentioned (12). For Inc+Imm, two incisions of approximately two mm in length were performed through the cuticle and the muscle of the third abdominal muscle. Then, the shrimp were immersed in seawater with the pathogen at the concentrations mentioned (13). After infection was performed, mortality was recorded in each group and replicate for the following 48 h to determine the average lethal dosage (LD<sub>50</sub>) by applying the Probit analysis (14).

#### Preparation of homeopathic medication.

The experimental treatments were prepared starting from the commercial homeopathic medicine for humans, ingestible in alcoholic dilution 30 Centesimal Hahnemaniana (30 CH) of the Laboratorios Similia® (México), Labiofam® (Cuba), and Heel® in injectable aqueous dilution of Laboratorios Rubiopharma® (México). The treatments were prepared by combining the required volume with the respective "stock dynamisation" (30 CH) of each one of their components diluted in a proportion of 1:99 to obtain "work dynamisation" (31 CH) utilizing ethanol 30°GL as vehicle, which was prepared by diluting ethanol 87°GL (Similia®, México) in distilled water.

**Experimental treatments.** Four treatments were used (1) Mix CIB®-HOM Heel-Mix (TH1) constituted by an equal v/v proportion of Cyme-Heel®, Gal-Heel®, Hepa-Heel®, Mucs-Heel® and Chol-Heel®; (2) Mix CIB®-HOM Pav-Mix (TH2) constituted by equal v/v proportion of *Passiflora incarnata*, *Valeriana officinalis*, *Zincum valerianicum* and *Ignatia amara* (Similia®); (3) Heel-Mix/Pav-Mix (TH3) constituted by a proportion of 1:1 v/v combination of the treatments TH1 and TH2; and (4) ViT-Mix (TH4) constituted by Vidatox®. Additionally, a fifth experimental group was included as control (non-treated/non-infected). The homeopathic treatments (31CH) prepared with ethanol 30°GL were interspersed (5% volume/weight) in pelletized commercial feed with 35% protein (PIASA®, Planta La Paz, B.C.S. México), provided *ad libitum* for seven days previous to and also during challenge. The same type of food was used for the control group, but in this case it was interspersed with ethanol 30°GL.

During the sequential dynamisation process, the dilution at 1:99 was alternated with shaking in vortex equipment (Benchmark mixer™, Benchmark Scientific Inc. Edson, NJ, U.S.A.) at 3200 rpm for two minutes applying basic principles of homeopathic pharmacopoeia. Independently of its origin, all "work" (31 CH)

organismos cada uno. Para el primer método (Inm), los camarones fueron colocados en agua de mar con las concentraciones del patógeno mencionadas anteriormente y para el segundo método (Iny) fueron inyectados con 30  $\mu$ L de dichas concentraciones, en el tercer segmento abdominal (12). Para el tercer método (Inc+Imm), se realizó una herida de aproximadamente 2 mm de longitud a través de la cutícula y en el músculo del tercer segmento abdominal y luego los camarones fueron inmersos en agua de mar habiendo añadido previamente las diferentes concentraciones del patógeno (13). Después de realizada la infección se procedió a registrar la mortalidad de los organismos en cada grupo y réplica, durante las siguientes 48 h, para determinar la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) (14).

#### Preparación de los medicamentos homeopáticos.

Los tratamientos experimentales fueron preparados a partir de medicamentos homeopáticos comerciales para uso humano, ingeribles en dilución alcohólica 30 Centesimal Hahnemaniana (30 CH), de los Laboratorios Similia® (México) y Labiofam® (Cuba), y medicamentos Heel® en dilución acuosa inyectable de Laboratorios Rubiopharma® (México). Los tratamientos fueron preparados combinando el volumen requerido de la "dinamización stock" respectiva (30 CH), de cada uno de sus componentes y diluyendo en proporción 1:99 para obtener una "dinamización de trabajo" (31 CH), utilizando como vehículo etanol 30°GL que se preparó diluyendo etanol 87°GL (Similia®, México) en agua destilada.

**Tratamientos experimentales.** Se utilizaron cuatro tratamientos: (1) Mezcla CIB®-HOM Heel-Mix (TH1), constituido por igual proporción v/v, de Cyme-Heel®, Gal-Heel®, Hepa-Heel®, Mucs-Heel® y Chol-Heel®; (2) Mezcla CIB®-HOM Pav-Mix (TH2), constituido por igual proporción v/v de *Passiflora incarnata*, *Valeriana officinalis*, *Zincum valerianicum* e *Ignatia amara* (Similia®); (3) Heel-Mix/Pav-Mix (TH3) constituido por una combinación 1:1 v/v de los tratamientos TH1 y TH2, y (4) ViT-Mix (TH4), constituido por Vidatox®. Adicionalmente, se incluyó un quinto grupo experimental como control (no tratado/ infectado). Los tratamientos homeopáticos (31CH), preparados con etanol 30°GL, se asperjaron (5% volumen/peso) en alimento pelletizado comercial con 35% de proteína (PIASA®, Planta La Paz, B.C.S. México), el cual fue suministrado *ad libitum* durante 7 días previos al reto y también durante el mismo. El mismo tipo de alimento se utilizó para el grupo control, pero en este caso, fue asperjado con etanol 30°GL.

dynamisations were prepared utilising ethanol 30°GL as vehicle to homogenise alcoholic content in all treatments since the medication Vidatox® (La Habana, Cuba) vehicle is ethanol 30°GL.

**Experimental design.** The juveniles of *L. vannamei* were distributed randomly (10 shrimp/group) in 4 L experimental units gauged with 2 L of filtered seawater and disinfected with UV at  $29 \pm 0.5^\circ\text{C}$  with constant aeration and photoperiod of 12:12 h. These units were covered with lids under pressure fitted with an opening of 5 x 5 cm (with mosquito mesh). Such recipients were placed in a thermoregulated system at  $29 \pm 1^\circ\text{C}$  within plastic boxes with chlorinated drinking water. The shrimp were fed the interspersed commercial diet *ad libitum* with the respective homeopathic treatments and with 30°GL ethanol for control three times a day. Particulate bottom matter of the tubs was eliminated daily by siphoning, recovering the volume (25%) of eliminated water immediately. The treatments were administered for seven days, and a challenge bioassay started from the eighth day with a total length of 120 h.

**Challenge with *Vibrio parahaemolyticus*.** After seven days of treatment, we proceeded to challenge the shrimp with the pathogen. For this purpose, five experimental groups were formed (10 shrimp per group) and three replicates, which were placed separately in 4-L experimental units and gauged with 2-L filtered and sterilised seawater. All the groups were challenged with the pathogen *V. parahaemolyticus*, corresponding to the diet LD<sub>50</sub> (obtained in the previous assays) except for the control group.

**Determination of SOD activity.** At 70 h after starting the challenge, nine shrimp from each experimental group were selected at random. Muscular tissue (100 mg) was taken from these juveniles and submerged in 500 µL of phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.5 for subsequent determination of superoxide dismutase (SOD) activity. The sampled tissue was processed with a tissue homogeniser (Toption, model JS18, Xi'an, China). The homogenised tissue was centrifuged at 9327 g at 4°C for 10 min; once the supernatant was recovered, it was stored at -20°C for its subsequent assessment. The SOD activity was determined using a commercial kit (SOD Assay Kit-WST #19160, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.), following the instructions of the manufacturer. The results were expressed as inhibition percentage of complex formation WST-1 (water-soluble tetrazolium) formazan (15).

**Statistical analysis.** The data obtained were used in Kolmogorov-Smirnov test to verify normality, and Levene's test was used to analyse

Durante el proceso de dinamización secuencial, se alternó la dilución 1:99 con agitación, en equipo vórtex a 3200 rpm (Benchmark mixer™, Benchmark Scientific Inc. Edson, NJ, E.U.A.), durante 2 minutos, aplicando principios básicos de la farmacopea homeopática. Independientemente de su origen, todas las dinamizaciones "de trabajo" (31 CH) fueron preparadas localmente (CIBNOR-México), utilizando como vehículo etanol 30°GL. Esto se hizo para homogenizar el contenido alcohólico en todos los tratamientos, ya que el vehículo del medicamento Vidatox® (La Habana, Cuba) es etanol 30°GL.

**Diseño experimental.** Los juveniles de *L. vannamei* se distribuyeron aleatoriamente (10 camarones/grupo) en cubetas de plástico de 4 L con un volumen de 2 L conteniendo agua de mar filtrada y desinfectada por radiación ultravioleta, a  $29 \pm 0.5^\circ\text{C}$  con aireación constante y fotoperiodo de 12:12 horas. Las cubetas fueron cubiertas con unas tapas a presión, provistas con una abertura de 5 x 5cm (con malla mosquitera). Dichos recipientes se colocaron en un sistema termoregulado a  $29 \pm 1^\circ\text{C}$ , dentro de cajas plásticas con agua potable clorada. Los animales fueron alimentados *ad libitum* tres veces al día, con la dieta comercial asperjada con los respectivos tratamientos homeopáticos y con etanol 30°GL para el control. Mediante sifoneo se eliminó diariamente la materia particulada del fondo de las tinas, recuperando enseguida el volumen de agua eliminado (25%). Los tratamientos se administraron durante 7 días y a partir del octavo día se inició un bioensayo de reto con una duración total de 120 h.

**Reto con *V. parahaemolyticus*.** Después de 7 días de haber aplicado los tratamientos experimentales mediante la metodología antes descrita, se procedió a realizar el reto frente al patógeno. Para esto, se conformaron cinco grupos experimentales c/u con 10 camarones y 3 réplicas, los mismos fueron colocados por separado en cubetas de plástico de 4 L con volumen operativo de 2 L y agua de mar filtrada y esterilizada. Todos los grupos fueron retados con el patógeno, excepto el grupo control. Se aplicó una suspensión de *V. parahaemolyticus*, correspondiente a la DL50.

**Determinación de la actividad SOD.** A las 70 h de iniciado el reto, se seleccionaron 9 camarones por cada grupo experimental. A estos juveniles se les retiró 100 mg de tejido muscular los cuales fueron sumergidos en 500 µL de buffer fosfato, con pH 7.5 para posteriormente determinar la actividad superóxido dismutasa (SOD). El tejido muestreado se procesó utilizando un

equality of variances. Arcsine transformation was applied to the data expressed as percentage (survival and SOD) before performing ANOVA. Tukey multiple comparison of means tests were performed to detect significant differences among the enzymatic SOD activity and survival values obtained in each one of the treatments. The differences were considered significant for  $P < 0.05$ . All the analyses were performed by the statistical program SPSS version 21 for Windows (SPSS Inc., Chicago II).

## RESULTS

During the determination of  $LD_{50}$ , the percentage of accumulated mortality of *L. vannamei* was obtained 48 h post-infection by using different methods of infection and charge of *V. parahaemolyticus* (Table 1). The  $LD_{50}$  results were  $0.9 \times 10^6$  CFU  $mL^{-1}$  with the immersion method;  $0.6 \times 10^6$  CFU  $mL^{-1}$  with the injection method; and  $0.5 \times 10^6$  CFU  $mL^{-1}$  with the incision + immersion method (Table 1). The dosage selected for the experimental challenge was the one that showed a mortality of 50% by the immersion method to avoid possible collateral effects of the incision.

**Table 1.** Mortality accumulated and  $LD_{50}$  in *Litopenaeus vannamei* juveniles challenged with *Vibrio parahaemolyticus* at 48 h post-infection, using different methods to determine average lethal dosage.

Method of Infection	Charge of <i>V. parahaemolyticus</i> (CFU $mL^{-1}$ )	Mortality (%)	$LD_{50}$ (CFU $mL^{-1}$ )
Immersion	$10^7$	67	$0.9 \times 10^6$
	$10^5$	36	
	$10^3$	17	
Incision + Immersion	$10^7$	73	$0.5 \times 10^6$
	$10^5$	27	
	$10^3$	27	
Injection	$10^7$	66	$0.6 \times 10^6$
	$10^5$	36	
	$10^3$	16	

At the end of the challenge, 120 h post-infection, the groups treated with TH2, TH3 and TH4 showed significantly higher survival rates ( $P < 0.05$ ) than the control group (Figure 1). The highest survival rates corresponded to TH3 and TH4 64.43% and 56%, respectively. The group treated with TH1 and the control group, showed an accumulated survival of 0% when the pathogen challenge concluded at 120 h (Figure 1).

homogeneizador de tejidos (Toption, modelo JS18, Xian, China). El tejido homogenizado se centrifugó a 9327 g durante 10 min a 4°C, recuperando el sobrenadante, que fue almacenado a -20°C para su posterior evaluación. La actividad SOD fue determinada usando el *kit* comercial (SOD Assay Kit-WST #19160, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados fueron expresados como porcentaje de inhibición de formación del complejo WST-1 (water-soluble tetrazolium, por sus siglas en inglés) formazán (15).

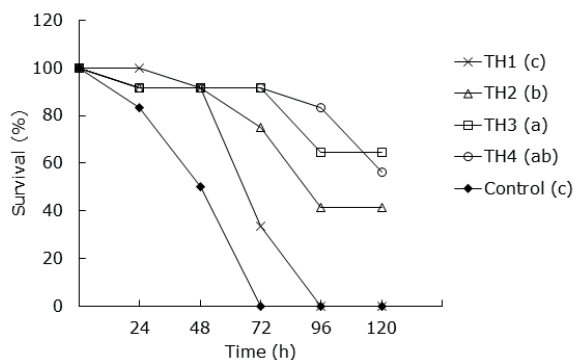
**Análisis estadístico.** Los datos experimentales obtenidos fueron analizados utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov para verificar la normalidad y la prueba de Levene fue utilizada para analizar la homogeneidad de varianzas. Los datos expresados como porcentajes (SOD y supervivencia), fueron transformados a arcoseno antes de realizar el ANOVA. Se realizaron pruebas de rangos múltiples de medias de Tukey, para detectar diferencias significativas entre los valores de actividad enzimática SOD y supervivencia, obtenidos en cada uno de los tratamientos experimentales y sus réplicas. Las diferencias se consideraron significativas para  $P < 0.05$ . Todos los análisis se realizaron mediante el programa estadístico SPSS versión 21 para Windows (SPSS Inc., Chicago II).

## RESULTADOS

Durante la determinación de  $DL_{50}$ , se obtuvo el porcentaje de mortalidad acumulada de *L. vannamei* 48 h post-infección, utilizando diferentes métodos de infección y cargas de *V. parahaemolyticus* (Tabla 1). Al utilizar el método de inmersión, la  $DL_{50}$  resultante fue de  $0.9 \times 10^6$  UFC  $mL^{-1}$ ; con el método de inyección, de  $0.6 \times 10^6$  UFC  $mL^{-1}$  y por el método de incisión + inmersión, fue de  $0.5 \times 10^6$  UFC  $mL^{-1}$  (Tabla 1). La dosis que se eligió para el reto experimental fue la que presentó una mortalidad del 50% por el método de inmersión, para evitar posibles efectos colaterales de la incisión.

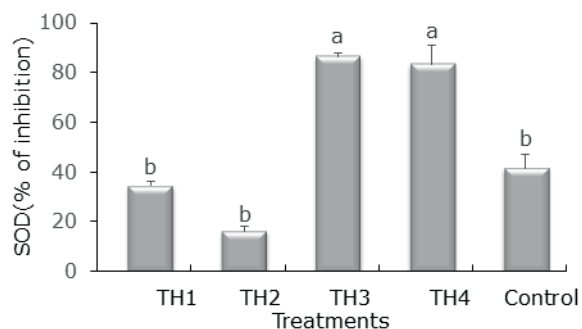
Al finalizar el reto, 120 h post-infección inicial, todos los grupos tratados con TH2, TH3 y TH4, exhibieron tasas de supervivencia significativamente más altas ( $p < 0.05$ ) que el grupo control (Figura 1). Los grupos tratados con TH3 y TH4 mostraron las tasas de supervivencia más altas con un 64.43% y 56%, respectivamente. El grupo tratado con TH1 y el grupo control, mostraron una supervivencia acumulada de 0% al concluir las 120 h del reto ante el patógeno.

With respect to SOD activity in shrimp *L. vannamei* tissue at 72 h after challenge, the groups treated with TH1 and TH2 did not show significant differences ( $34.48 \pm 1.87$  and  $16.32 \pm 1.22$ , respectively) in relation to the control group ( $41.63 \pm 2.59$ ); whereas TH3 and TH4 showed a SOD activity of  $86.43 \pm 1.02$  and  $83.47 \pm 5.54$ , respectively, with significantly higher values ( $P < 0.05$ ) with respect to the control group ( $41.63 \pm 2.59$ ) after challenge with *V. parahaemolyticus* (Figure 2).



**Figure 1.** Survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles treated with homeopathic medications during challenge (120 h) with *Vibrio parahaemolyticus*. Letters a, b, c indicate statistical differences between treatments and control.

Con respecto a la actividad SOD en tejido de camarón *L. vannamei*, a las 70 h de iniciado el reto, los grupos tratados con TH1 y TH2 no mostraron diferencias significativas ( $34.48 \pm 1.87$  y  $16.32 \pm 1.22$ ; respectivamente) con relación al grupo control ( $41.63 \pm 2.59$ ); mientras que TH3 y TH4 con una actividad de la SOD de  $86.43 \pm 1.02$  y  $83.47 \pm 5.54$ ; respectivamente exhibieron valores significativamente superior al grupo control ( $p < 0.05$ ) ( $41.63 \pm 2.59$ ), después de retar los camarones con *V. parahaemolyticus* (Figura 2).



**Figure 2.** Activity of SOD enzyme in white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles treated with homeopathic treatments at 72 h after starting challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. Data were expressed as media  $\pm$  standard deviation. Columns with different letters show difference ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSSION

Homeopathic medications are natural substances of animal, plant or mineral origin, highly diluted and agitated, and thus sufficiently innocuous (7), which could activate specific sensibility mechanisms in living organisms, and they do not contravene their natural defence reactions (8). Homeopathy has been used with success in aquaculture (16,17), and it has the applicability to reduce stress associated to a gradual and progressive intensification, which is habitual in modern aquaculture production systems (7,16).

The lesions and stress that cultured shrimp may suffer under adverse environmental conditions reduce their natural resistance, making them susceptible to viral and/or bacterial infections (18). In shrimp, natural infection by virulent bacteria is made by different routes: oral, transcuticular or by lesions, and it could be associated with an imbalance of their normal intestinal microbiota (19). The average lethal dosage ( $LD_{50}$ ) was established to determine

## DISCUSIÓN

Los medicamentos homeopáticos son sustancias naturales de origen animal, vegetal o mineral altamente diluidas y agitadas, y por lo tanto suficientemente inocuas, que pueden activar mecanismos de sensibilidad específicos en los seres vivos y no contravienen sus reacciones naturales de defensa (8). La homeopatía se ha utilizado con éxito en la acuicultura (16,17) y tiene aplicabilidad para reducir el estrés asociado a una gradual y progresiva intensificación, que es habitual en los modernos sistemas de producción acuícola.

Las lesiones y el estrés que pueden sufrir los camarones cultivados bajo condiciones ambientales adversas, reducen su resistencia natural, haciéndolos susceptibles a infecciones virales y/o bacterianas (18). En los camarones, la infección natural por bacterias virulentas se realiza por diferentes vías: oral, transcuticular o por heridas, y puede asociarse con un desequilibrio de su microbiota normal (19). La dosis letal media ( $DL_{50}$ ) se estableció para determinar la virulencia de la cepa patogénica, ya

virulence of the pathogen strain, and it has been used to evaluate shrimp resistance or susceptibility to vibriosis (11). This study selected the LD<sub>50</sub> of  $0.9 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> by the immersion method because it was the least aggressive method of infection with less collateral effects that imitates the natural conditions that shrimp are exposed to the bacteria present in the marine environment (20).

The marine invertebrates, including shrimp, have developed an immune innate system based mainly in phagocytosis and generation of antimicrobial peptides and reactive oxygen species (ROS) (21). Because ROS, in their majority superoxide anions, can also affect the host tissues; invertebrates counterattack their effect by producing diverse compounds, including SOD enzymes, catalase and glutathione peroxidase (22). The activity of SOD has been referenced as a parameter to evaluate the potential of the immune system in some shrimp species (23,24).

This study has demonstrated that in the *L. vannamei* juveniles treated with the homeopathic treatments TH3 and TH4, the SOD enzyme activity increased significantly at 70 h post-infection with *V. parahaemolyticus* with respect to the control group. Whereas shrimp treated with TH1 and TH2, their response was similar to that of the control group. Treatment TH3 included the formulation of the medication Passival®, used in human medicine as tranquiliser to reduce stress and improve sleep besides the mixture Heel-Mix, which included medication used for enzymatic disorder, infectious diseases and stimulation of organism defence. Treatment TH4 is a homeopathic medication whose active principle is the venom of the *Rhopalurus junceus* scorpion, an endemic species to Cuba. Anti-tumour properties have been attributed to this medicine shown through some preclinical toxicity studies (25) on tumour cells of epithelial origin (26) and an immunomodulatory effect that increases production of white cells and interleukins (27).

The greatest survival recorded in animals that received treatments TH2, TH3 and TH4 after *V. parahaemolyticus* challenge indicated a protector effect, which shows that the homeopathic medications assessed could be an alternative tool for controlling bacterial diseases in shrimp farming. In relation to this study, the bacteria of the genus *Vibrio* are well known as pathogens of marine shrimp, so it is possible to assume that a greater survival of the shrimp treated with homeopathic medications is related to the stimulation of their immunological systems, and

que ésta es utilizada para evaluar la resistencia o la susceptibilidad del camarón a la vibriosis (11). En el presente estudio se seleccionó la DL<sub>50</sub> de  $0.9 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> mediante el método de inmersión; por ser el método de infección menos agresivo, con menos efectos colaterales y con el que se imita las condiciones naturales a las que están expuestos los camarones a las bacterias presentes en el medio acuático (20).

Los invertebrados marinos, incluidos los camarones, han desarrollado un sistema inmune innato, que se basa principalmente en la fagocitosis y la generación de péptidos antimicrobianos y especies reactivas de oxígeno (ERO<sub>s</sub>) (21). Debido a que las ERO<sub>s</sub>, en su mayoría aniones superóxido, también dañan los tejidos del huésped, los invertebrados contrarrestan su efecto por medio de las enzimas SOD, catalasa y glutatión peroxidasa (22). La actividad de la SOD ha sido ya referenciada como un parámetro para evaluar el potencial inmune en algunas especies de camarón (23,24).

En este estudio, se demostró que en los juveniles de *L. vannamei* tratados con los medicamentos homeopáticos TH3 y TH4, se incrementó significativamente la actividad de la enzima SOD a las 70 h post-infección con *V. parahaemolyticus*, con respecto al grupo control. Mientras que con TH1 y TH2 se comportaron similar al grupo control. El tratamiento TH3 incluyó la formulación del medicamento Passival®, usado en medicina humana como tranquilizante para reducir el estrés y mejorar el sueño; además de la mezcla Heel-Mix, la cual incluyó medicamentos utilizados para el tratamiento de trastornos enzimáticos, enfermedades infecciosas y estimulación de las defensas del organismo. El tratamiento TH4 es un medicamento homeopático cuyo principio activo es el veneno del escorpión *Rhopalurus junceus*, una especie endémica de Cuba. A este medicamento se le atribuyen propiedades antitumorales demostradas a través de algunos estudios preclínicos (25). Un estudio realizado por Díaz et al (26) evidenció una significativa toxicidad sobre células tumorales de origen epitelial. Además, se comprobó que tiene un efecto inmunomodulador, lo cual hace que aumente la producción de glóbulos blancos y de interleucinas (27).

La mayor supervivencia registrada en los animales que recibieron los tratamientos TH2, TH3 y TH4, después del reto con *V. parahaemolyticus*, indica un efecto protector. Con esto se demuestra que los medicamentos homeopáticos evaluados podrían ser una herramienta alternativa para el control de las enfermedades bacterianas en el cultivo del camarón. Con relación al presente estudio, las bacterias del género *Vibrio* son bastante conocidas como patógenos de los camarones marinos, de manera que es posible asumir que la mayor supervivencia de los camarones



in consequence to a greater resistance to acute infectious diseases associated to this genus, for example, the early mortality syndrome or acute hepatopancreatic necrosis syndrome (EMS/AHNPS) (28,29).

In conclusion the homeopathic medicine included in the treatments TH3 and TH4, increased survival and immunity of the shrimp *L. vannamei* juveniles when infected with *V. parahaemolyticus*. These results contribute to the generation of new knowledge that helps to confirm that aquaculture homeopathy is a potential and eco-sustainable alternative facing the use and abuse of chemotherapeutic agents and antibiotics used to attack certain pathogens, including EMS/AHNPS increasing productivity in shrimp industry at world level.

#### Acknowledgements

This study was financed by Proyectos Ciencia Básica SEP-CONACYT/CIBNOR-258282 and PROINNOVA-CONACYT/PEASA-241777 under the responsibility of JMMS. The authors are thankful to the support of the governments of Cuba and Mexico, Empresa Acuicultura Mahr and CIBNOR technical staff Norma Ochoa, Delfino Barajas, Pablo Ormart, Pablo Ormart, Carmen Rodríguez, Eulalia Meza and Arturo Sierra, and to Diana Fischer for editorial services in English.

tratados con medicamentos homeopáticos, está relacionada con la estimulación de su sistema inmunológico, y en consecuencia, con una mayor resistencia a las enfermedades infecciosas agudas asociadas al género *Vibrio*, como por ejemplo el síndrome de mortalidad temprana o síndrome de la necrosis hepatopancreática aguda (EMS/AHNPS) (28,29).

En conclusión los medicamentos homeopáticos incluidos en los tratamientos TH3 y TH4, incrementaron la supervivencia y la inmunidad en juveniles de camarón *L. vannamei*, al ser infectados con *V. parahaemolyticus*. Estos resultados contribuyen a la generación de conocimiento nuevo que ayuden a confirmar que la homeopatía acuícola es una alternativa potencial y ecosustentable, ante el uso y abuso de agentes quimioterapéuticos y antibióticos utilizados para combatir a ciertos patógenos, incluyendo EMS/AHNPS, e incrementar la productividad en la industria camaronícola mundial.

#### Agradecimientos

El estudio fue financiado por el Proyecto de Ciencia Básica SEP-CONACYT/CIBNOR-258282 y PROINNOVA-CONACYT-241777, bajo la responsabilidad académica de JMMS. Los autores agradecen por el apoyo, a los gobiernos de Cuba y de México, a la Empresa Acuicultura Mahr y al personal técnico del CIBNOR: Norma Ochoa, Delfino Barajas, Pablo Ormart, Carmen Rodríguez, Eulalia Meza, Arturo Sierra y a Diana Fischer por servicios editoriales en inglés

## REFERENCES

1. Valdez G, Díaz F, Re AD, Sierra E. Efecto de la salinidad sobre la fisiología energética del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Hidrobiológica* 2008; 18(2):105-115.
2. Soto-Rodríguez SA, Gomez-Gil B, Lozano-Olvera R, Betancourt-Lozano M, Morales-Covarrubias MS. Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in northwestern Mexico. *Appl Environ Microbiol*. 2015; 81(5):1689-1699.
3. Schryver PD, Defoirdt T, Sorgeloos P. Early mortality syndrome outbreaks: a microbial management issue in shrimp farming? *PLoS Pathog*. 2014; 10(4):e1003919.
4. Newaj-Fyzul A, Austin B. Probiotics, immunostimulants, plant products and oral vaccines, and their role as feed supplements in the control of bacterial fish diseases. *J Fish Dis*. 2015; 38(11):937-955.
5. Lakshmi B, Viswanath B, Sai Gopal DVR. Probiotics as antiviral agents in shrimp aquaculture. *J Pathog*. 2013; ID:424123.
6. Standen BT, Rawling MD, Davies SJ, Castex M, Foey A, Gioacchini G. Probiotic *Pediococcus acidilactici* modulates both localised intestinal- and peripheral-immunity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish Immun*. 2013; 35(4):1097-1104.
7. Ortiz-Cornejo NL, Tovar-Ramírez D, Abasolo-Pacheco F, Mazón-Suástegui JM. Homeopatía, una alternativa para la acuicultura. *Rev Med Homeopat*. 2017; 10(1):18-24.
8. Khuda-Bukhsh AR, Pathak S. Homeopathic drug discovery: theory update and methodological aspect. *Expert Opinion Drug Discovery*. 2008; 3(8):979-990.
9. Vockeroth WG. Veterinary homeopathy: an overview. *Can Vet J*. 1999; 40(8):592-594.

10. Siena CE, Natali MRM, Braccini GL, Oliveira AC, Ribeiro RP, Vargas L. Effect of core homeopathic homeopatia 100® in productive efficiency of fingerlings reverted from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Semina: Ciênc Agrár.* 2010; 31(4):985-994.
11. Luis-Villaseñor IE, Voltolina D, Gomez-Gil B, Ascencio F, Campa-Córdova ÁI, Audelo-Naranjo JM, Zamudio-Armenta OO. Probiotic modulation of the gut bacterial community of juvenile *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus* CAIM 170. *Lat Am J of Aquat Res.* 2015; 43(4):766-775.
12. Takahashi Y, Itami T, Kondo M, Maeda M, Fujii R, Tomonaga S, Supamattaya K., Boonayaratpalin S. Electron microscopic evidence of bacilliform virus infection in kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). *Fish Pathology.* 1994; 29:121-125.
13. Flegel TW. (ed) *Advances in shrimp biotechnology.* National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok: Mahidol University; 1998.
14. Finney DJ. *Probit analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve.* 2<sup>nd</sup>. Cambridge University Press: Cambridge; 1952.
15. Dudonné S, Vitrac X, Coutière P, Woillez M, Mérillon JM. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J Agric Food Chem.* 2009; 57(5):1768-1774.
16. Mazón-Suástegui JM, García-Bernal M, Saucedo PE, Campa-Córdova Á, Abasolo-Pacheco F. Homeopathy outperforms antibiotics treatment in juvenile scallop *Argopecten ventricosus*: effects on growth, survival, and immune response. *Homeopathy.* 2017; 106(1):18-26.
17. Merlini LS, Vargas L, Piau R, Ribeiro PR, Merlini NB. Effects of a homeopathic complex on the performance and cortisol levels in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Homeopathy.* 2014; 103:139-142.
18. Gómez B, Roque A, Guerra AL. *Enfermedades Infecciosas más comunes en la camaronicultura en México y el impacto del uso de antimicrobianos.* Instituto de Ciencias del Mar y Limnología: México; 2001.
19. Saulnier D, Haffner P, Goarant C, Levy P, Ansquer D. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture.* 2000; 191:133-144.
20. Aguirre-Guzmán G, Sánchez-Martínez JG, Pérez-Castañeda R, Palacios-Monzón A, Trujillo-Rodríguez T, De La Cruz-Hernández NI. Pathogenicity and Infection Route of *Vibrio parahaemolyticus* in American White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J World Aquac Soc.* 2010; 41:464-470.
21. Lemaitre B, Hoffmann J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol.* 2007; 25:697-743.
22. Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol.* 1998; 201:1203-1209.
23. Franco, R., Martín, L., Arenal, A., Santiesteban, D., Sotolongo, J., Cabrera, H., Castillo, N. M. Evaluation of two probiotics used during farm production of white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Aquac Res.* 2017; 48(4):1936-1950.
24. Liu, G., Zhu, S., Liu, D., Guo, X., Ye, Z. Effects of stocking density of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) on immunities, antioxidant status, and resistance against *Vibrio harveyi* in a biofloc system. *Fish Shellfish Immun.* 2017; 67:19-26.
25. Díaz-García A, Morier-Díaz L, Frión-Herrera Y, Rodríguez-Sánchez H, Caballero-Lorenzo Y, Mendoza-Llanes D, Riquenes-Garlobo Y, Fraga-Castro JA. *In vitro* anticancer effect of venom from Cuban scorpion *Rhopalurus junceus* against a panel of human cancer cell lines. *J Venom Res.* 2013; 4:5-12.
26. Díaz A, Morier L, Rodríguez H, Caballero Y. Citotoxicidad del veneno del escorpión cubano *Rhopalurus junceus* y sus fracciones sobre líneas celulares tumorales humanas. *LABIOFAM.* 2010; 1:12-18.
27. Hernández Betancourt O, Casado Hernández I, Iglesias Huerta E, Ramírez Labrada A, Del Risco Ramos J, Rodríguez Pargas A. Evaluación de la toxicidad *in vitro* del veneno del alacrán *Rhopalurus junceus* a través de un ensayo celular. *Rev Cubana de Invest Bioméd.* 2009; 28(1):1-11.
28. Akazawa N, Eguchi M. Environmental trigger for EMS/ AHPNS identified in Agrobrest shrimp ponds. *Glob Aquacult Advocate.* 2013; 4:16-17.
29. Hoanh DTH, Phu TQ, Phuong NT, Tuan PA. Ongoing Vietnam studies find *Vibrio* with phage transmits EMS/AHPNS. *Glob Aquacult Advocate.* 2013; 4:22-23.