**La memoria del agua (II): de Benveniste a Ennis**

7 febrero, 2013

[](http://cnho.files.wordpress.com/2013/02/0.gif)

Jacques Benveniste (izquierda) y Madeleine Ennis (derecha)

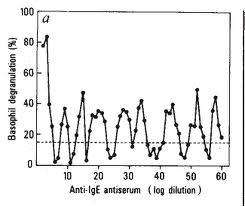
**Este artículo trata sobre el presunto efecto biológico de diluciones ultra-diluidas como las que se producen en los preparados homeopáticos. Benveniste estableció un modelo de estudio: la desgranulación de basófilos. Empleando ese modelo, diversos investigadores han seguido sus pasos: analizar si alguna sustancia ultra-diluida dispara la desgranulación en basófilos. Los resultados son dispares y no permiten obtener una conclusión categórica, algo que es necesario cuando se pretende contradecir conocimientos bien cimentados de física, química y/o enzimología.**

Para entender todo esto primero hay que hablar acerca del modelo empleado: la desgranulación de basófilos. Jacques Benveniste fue un experto inmunólogo, que conocía muy bien las distintas respuestas de las células del sistema inmune ante diferentes estímulos. Para estudiar el efecto de determinadas sustancias sobre las células sanguíneas de la gama blanca (glóbulos blancos) se emplean distintos ensayos, siendo uno de ellos la desgranulación de basófilos.

De forma breve, y para no extenderme en detalles técnicos: los anticuerpos IgE se unen a receptores específicos de la membrana de los basófilos. Cuando un alergeno o un suero que tenga anticuerpos anti-IgE reconocen los IgE de la membrana, se produce una respuesta celular en el basófilo. Es un proceso que promueve una salida (exocitosis) de gránulos que liberan histamina, con la pérdida del cromatismo que poseen los gránulos cuando éstos se tiñen con colorantes básicos como la toluidina azul. Esta técnica se correlaciona bien con el diagnóstico de la alergia.  
  
Empleando esta técnica el equipo de Benveniste probó cómo afectaban a un cultivo de basófilos la adición de preparaciones ultra-diluidas de anti-IgE (1), algo que se podría detectar analizando la desgranulación de los basófilos, o lo que es lo mismo, contando qué porcentaje de basófilos había perdido la coloración.

Los resultados preliminares mostraron que la desgranulación no sólo se observa a bajas diluciones, sino incluso también en las diluciones en las que se supone que no queda nada de anti-IgG, como por ejemplo a diluciones 1060. El número de basófilos que es afectado por las diferentes diluciones se determina mediante contaje de las propiedades cromáticas de los mismos tras observación microscópica. Estos resultados se repitieron en nuevas réplicas experimentales, también cuando se llegó a diluciones tan elevadas como 10120, pero no cuando se emplearon sustancias que no promueven la desgranulación (control negativo).

Llama la atención comprobar que no existe una linealidad en los resultados, al incrementar la dilución no hay un efecto aditivo (aumento de “potencia”) sino que se observan picos sucesivos acompañados de valles, por ejemplo una dilución 10 50 provoca una mayor desgranulación que una 10 55, pero menor que una 10 57 (Figura 1).

[](http://cnho.files.wordpress.com/2013/02/2.jpg)

Efecto de la dilución de anti-IgE sobre la desgranulación de basófilos. Fuente: Nature

¿Cómo interpreta el grupo de Benveniste estos resultados? En el artículo no muestran ningún mecanismo, simplemente sugieren una posible explicación. En primer lugar asumen que no hay ninguna molécula de anti-IgE en la muestra tras diluirla más allá de 10 14. En segundo lugar afirman que la forma de agitar la muestra, así como el diluyente empleado es muy importante. Sólo ven efecto si agitan durante 10 segundos, hacerlo durante 30-60 segundo inhibe el efecto. Así mismo, sustancias como el etanol o el propanol son óptimas para la dilución, mientras que el DMSO no permite obtener los resultados mostrados. En tercer lugar muestran que calentar, congelar o sonicar las muestras elimina la actividad de las soluciones ultra-diluidas, pero no de aquellas que poseen una alta concentración de anti-IgE. Todo ello lleva a Benveniste a sugerir que las moléculas de anti-IgE presenten en la solución de partida han generado un molde en el agua que se ha mantenido pese a la desaparición de las moléculas activas. Esto es lo que dio lugar al término “memoria del agua”.

El artículo termina con una nota llamada “Editorial Reservation” que dice:

Los lectores de este artículo deben compartir la incredulidad que han presentado a este editor los evaluadores del trabajo. La esencia de estos resultados indican que una dilución acuosa de un anticuerpo retiene su capacidad de provocar respuesta biológica, incluso cuando éste se encuentra tan diluido que es altamente improbable que se pueda detectar una sola molécula de él en la muestra. No existen bases físicas conocidas para esta actividad. Con la amable colaboración del profesor Benveniste, “Nature” ha contactado con otros investigadores independientes para que repitan los experimentos. Un resumen de dichos resultados serán publicados próximamente.

Las reacciones a esta publicación no se hicieron esperar. Mucho se ha escrito sobre lo que se ha denominado el “affaire Benveniste”, pero este artículo no va específicamente sobre este caso. Podréis encontrar mucha información sobre el mismo en [artículos](http://hipotesis-carolus.blogspot.com.es/2009/03/el-affaire-nature-benveniste.html) e incluso [vídeos](http://lacienciaysusdemonios.com/2010/03/09/la-corta-historia-de-la-memoria-del-agua/). Solamente resumiré lo que ocurrió a continuación y como se liga esto con los trabajos de Ennis.

El artículo de Benveniste fue publicado en junio de 1988, y en julio del mismo año ya se podían leer algunas réplicas al mismo, así como las impresiones del propio Benveniste a dicha réplica. En el primero de ellos titulado “High-dilution experiments a delusion” (2) se argumenta de forma extensa a los experimentos de Benveniste.

Las principales objeciones tienen que ver con los controles y los errores, que no fueron estimados de forma adecuada. Se argumenta que “a pesar del tremendo esfuerzo realizado para demostrar que las soluciones ultra-diluidas de anti-IgE, una vez eliminado el sesgo, el fenómeno descrito no es reproducible” y por tanto concluyen que “no hay base para afirmar que altas diluciones de anti-IgE (como por ejemplo 1020) tengan efecto biológico, por lo que dotar de memoria al agua es innecesario”. No solamente se centran ahí las críticas, también señalan que dos firmantes del trabajo tienen financiación por parte de Boiron y que los resultados obtenidos por Benveniste se están usando para justificar la homeopatía, apoyo injustificado a la luz de la nueva interpretación de los resultados. Cuando se repitieron los experimentos y analizaron las libretas de laboratorio encontraron que:

- El laboratorio de Benveniste encuentra los mejores resultados de desgranulación a diluciones de 102a 104 para luego bajar en posteriores diluciones.

- Los apuntes mostraron que los experimentos no siempre funcionaron, con periodos de meses en los que no se observó desgranulación con anti-IgE ultra-diluida.

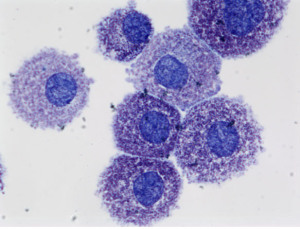
- En algunas de las pruebas realizadas se observa efecto positivo, sin embargo en otros experimentos no se observa ese efecto.

- El experimento no poseía doble-ciego.

- El experimento salía mejor cuando había un miembro específico del equipo de Benveniste.

- En el artículo de Benveniste aparecen toda una serie de picos (Figura 1), que siempre aparecen en la misma posición (1), sin embargo al repetir los experimentos los picos no aparecen en los mismos lugares (2). Un estudio de los apuntes de laboratorio mostró que los picos variaban de un experimento a otro, con lo que la información dada en la publicación de Nature no era correcta.

Todas estas objeciones y muchas más que no cito para no extenderme, pero que podéis leer en la publicación, en el artículo firmado por Maddox y col. (2) que se elaboró a partir de las conclusiones obtenidas en una visita de un equipo al laboratorio de Benveniste. En el mismo número de Nature apareció la respuesta de Benveniste (3). En ella se acusa al equipo de Maddox, Randi y Stewart de poco profesional, de intimidador, de perseguir una conspiración y de distraer y acosar a sus trabajadores. De hecho escribe: “procesos similares al de las brujas de Salem o persecuciones al estilo McCarthy matarán la ciencia”. Además, justifica sus resultados como correctos y afirma que se tomaron los controles adecuados para llegar a las conclusiones correspondientes.

[](http://cnho.files.wordpress.com/2013/02/basofilo-2.jpg)

Un grupo de basófilos teñidos

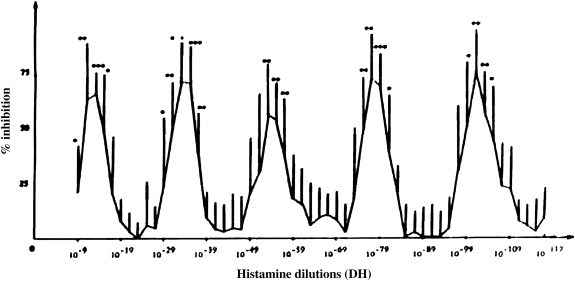
En el mes de agosto de 1988, Nature publica una serie de cartas (cuyo título genérico fue “Only the smile is left”) que opinan sobre los resultados de Benveniste. La primera de ellas está firmada por Henry Metzger y Stephen C. Dreskin (4). Reivindican haber repetido el experimento, con ligeras diferencias, aunque manteniendo aquello que el equipo de Benveniste considera esencial, como por ejemplo los tiempos de agitación para preparar las disoluciones. Sus gráficas muestran que se observa desgranulación en diluciones bajas de anti-IgE, para posteriormente desaparecer el efecto a mayores diluciones. Ninguna ultra-dilución presentó efecto desgranulación. En otra carta P.M. Gaylard informa sobre la debilidad de los análisis estadísticos empleados por Benveniste (5). Otras cartas tratan de justificar los resultados de Benveniste de forma alternativa. Así Kenneth S. Sulick apunta hacia la posibilidad de un artefacto por la formación de especies reactivas por[cavitación](http://es.wikipedia.org/wiki/Cavitaci%C3%B3n) durante la preparación de las muestras (6), mientras que J. Leslie Glick (7) apunta a la posibilidad de que las moléculas de anti-IgE actúen como un molde de la heparina, a través de la cual puedan mediar su efecto, aunque el anti-IgE ya no esté presente. Una idea parecida apunta M.J. Escribano (8).

Sólo una semana después aparecieron en Nature dos artículos cortos que fueron inscritos bajo el título de “Evidence of non-reproducibility”. El primero de ellos firmado por Jean Claude Seagrave repite el experimento empleando un modelo estandarizado para detectar alergias. El efecto sólo se observa hasta diluciones de 104, más allá de la misma son incapaces de encontrar efecto. Justifican la discrepancia afirmando que su sistema es más potente que el de Benveniste, ya que cuentan poblaciones de células mucho mayores (500.000 frente a los 60-120 de ensayo de Benveniste), un ensayo de mayor potencia cuantitativa (mide la liberación de serotonina, en vez de un colorante), emplea un IgE caracterizado y un anticuerpo purificado, en vez de emplear suero, como hace Benveniste (9). En otro ensayo descrito por Bonini y colaboradores (10) miden la liberación de histamina, en vez de analizar la desgranulación de basófilos, para evaluar el efecto de soluciones ultra-diluidas de IgE. Las condiciones experimentales fueron similares a las descritas por Benveniste, en cuanto agitación, pero la medición del efecto fue automatizada por métodos fluorimétricos. Solamente se observó liberación de histamina entre las diluciones 101 (53%) y 104 (6%), si se incrementa la dilución no se detectaba efecto (10).

Pocos años después en la propia revista Nature se publicó otro ensayo que trata de repetir los experimentos de Benveniste mediante el mismo modelo de estudio: desgranulación de basófilos (11). En este estudio firmado por S.J. Hirst como primer autor se analiza el efecto de diluciones desde 102 a 1060. El artículo concluye afirmando que solamente se observa desgranulación a diluciones de anti-IgE de 102, mientras que diluciones entre 1012 a 1060 no presentaron ningún efecto. Además indicaron que la densidad celular varía en cada ensayo, por lo que hay que tenerla en cuenta en los controles. Cuando este control no se tiene en cuenta, y sólo se presentan los porcentajes de desgranulación, sin comparar con la densidad celular cuando no hay anti-IgE, se obtienen resultados similares a Benveniste. En la publicación del grupo de Hirst podemos leer quién financia su trabajo: el “Research Council for Complementary Medicine”, y la farmacéutica de productos homeopáticos Nelson cedió el equipo para realizar los experimentos. Con anterioridad el grupo de Evelgönne había llegado a conclusiones parecidas (12).  
A pesar de todas estas publicaciones ni Benveniste, ni sus colaboradores se dieron por vencidos. Pensaron que sus resultados eran correctos, y que los controles que se tomaron eran los adecuados. Benveniste siguió publicando ensayos y estudios de ese tipo, aunque alguno de ellos hay que reconocer que tiene mucho de esotérico. Así por ejemplo llegó a afirmar que agua tiene memoria y que ésta se puede almacenar en un ordenador y ser enviada a través del océano por e-mail (13). Volvemos a las andadas de [Emoto](http://lacienciaysusdemonios.com/2013/02/04/la-memoria-del-agua-i-las-fabulas-de-emoto/).

Algunos autores del trabajo de Benveniste siguieron trabajando en el tema. Especialmente productivo han sido J. Sainte-Laudy y Ph. Belon, los cuales han publicado diversos trabajos que seguían la misma línea, aunque presentaron variaciones en la forma de detectar la desgranulación de basófilos, o en el método empleado para contar células (manual o citometría de flujo). Ambos investigadores reciben financiación de Boiron, al menos en el período 1981-2008 (14). No voy a utilizar este dato como crítica de los trabajos. De hecho he repetido varias veces en este foro que Boiron debería financiar investigaciones que intentan demostrar sus postulados, a ver si consigue demostrar de forma irrefutable alguna de las propiedades que se atribuye la homeopatía. Eso no quita, que como ocurre con los trabajos financiados por las grandes farmacéuticas, se agradezca comprobar que otros autores no financiados por industrias de homeopatía llegan a las mismas conclusiones. Y también se agradecería encontrar los trabajos relacionados con propiedades de las soluciones ultra-diluidas en revistas diferentes a “Homeopathy” o “Inflammation Research”. Y esto no lo digo sólo yo, incluso Madeleine Ennis lo apunta en una de sus publicaciones (15). En dicha publicación la propia Ennis reconoce que: (i) los métodos no están estandarizados entre diferentes laboratorios, (ii) hay dudas sobre la validez biológica de los ensayos realizados, (iii) no existe una reproducibilidad del fenómeno en todos los laboratorios (incluso en el mismo laboratorio se pueden obtener resultados dispares), (iv) prácticamente todos los datos de eficiencia positiva proceden del mismo laboratorio y (v) se impone la necesidad de mecanismos para evitar la objetividad en la toma de muestras (15).

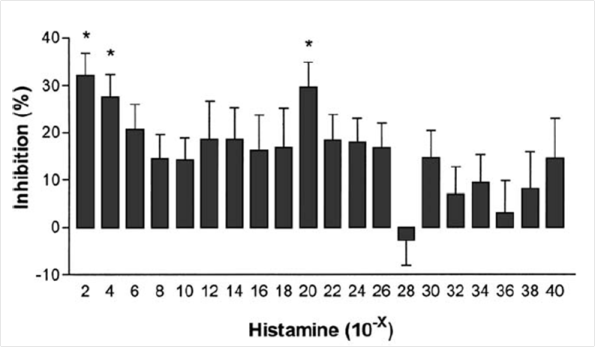
El equipo de Sainte-Laudy publicó una serie de trabajos mostrando efectos positivos de las soluciones ultra-diluidas de IgE (16-21). Estos trabajos no disminuyeron el escepticismo hacia el potencial de las soluciones ultra-diluidas en la fisiología celular. Aspectos como la no linealidad de los resultados, que se presentaban como una serie de picos (Figura 2) fueron interpretados como artefactos de la preparación.

[](http://cnho.files.wordpress.com/2013/02/3.jpg)

Efecto de altas diluciones de histamina sobre la inhibición de la activación de basófilos. Fuente: Homeopathy.

Para intentar dar un poco de luz en este asunto Madeleine Ennis publica dos estudios del efecto de soluciones ultra-diluidas de histamina sobre la desgranulación de basófilos (22-23). En ambos trabajos participan P. Belon y J. Sainte-Laudy, colaboradores de Benveniste. La diferencia entre este trabajo y los anteriores es que los ensayos se realizan en 4 laboratorios diferentes. Todos los técnicos son entrenados para analizar de la misma forma la desgranulación de los basófilos. Los resultados obtenidos en el meta-ensayo sugieren que hay un efecto fisiológico de las soluciones ultra-diluidas de histamina.

Sin embargo, hay aspectos críticos sobre lo expuesto en la publicación que merece un comentario crítico. En primer lugar los autores indican que en el primer estudio, de los 3906 datos que recogen, sólo toman para los análisis estadísticos 2706, sin informar por qué rechazan el resto. En segundo lugar llama la atención que, pese a que se intenta que los 4 laboratorios hagan un estudio homogéneo, el laboratorio 1 sólo probara las diluciones 10-28-10-32 M, mientras que el laboratorio 3 presenta resultados para 10-2, 10-4 y 10-20 M. Además, los resultados conjuntos (Figura 3) no se ven afectados por la dilución, eso es algo que la propia Ennis le hace ser escéptica (15) como comentaré en breve.

[](http://cnho.files.wordpress.com/2013/02/ennis.png)

Efecto de la dilución de histamina sobre la inhibición de los basófilos. Fuente: Inflammation Research

Para finalizar varios de los ensayos presentados no se correlacionan con los resultados obtenidos por Benveniste (1) o por Sainte-Laudy (21), en los que se presentaban una serie de picos.

La propia Ennis presenta objeciones (15). La primera objeción es global:

En los estudios *in vitro* llevados a cabo con basófilos humanos, aunque se empleen soluciones ultra-diluidas, la mayor parte de los efectos es cuantitativamente similar al que se obtiene con dosis farmacológicas. Desde mi punto de vista esto se opone a los fundamentos de la homeopatía donde los efectos causados por dosis farmacológicas y ultra-diluidas deberían ser opuestos

.

La segunda objeción aparece en la metodología. Describe los protocolos empleados no automatizados como muy favorable a la aparición de sesgo. Para evitarlo indica que lo mejor es contar un número muy alto de células (y no sólo las 80 por pocillo) de muchos de los ensayos y de forma automática. Como ejemplo cita el trabajo de Lorenz (24) que muestra efecto a altas diluciones de histamina, pero el efecto es mucho más apreciable cuando se usan tubos de poliestireno en vez de polipropileno. La crítica final de Ennis informa que los métodos están poco estandarizados entre laboratorios, que si que parece existir un efecto por parte de altas diluciones de histamina, pero que ésta es muy pequeña en algunas ocasiones. **Se pregunta finalmente cuánto de este efecto puede ser atribuido a artefactos de laboratorio**, sugiriendo una serie de puntos para estandarizar los ensayos y comprobar de esa forma si el presunto efecto existe.

Y es que eso es necesario porque volvemos a lo de siempre: **“Afirmaciones extraordinarias requieren siempre de evidencias extraordinarias”**. La afirmación de que una solución donde no queda ni una sola molécula biológica tiene efecto sobre las células es extraordinaria, ya que rompe modelos bien descritos de interacción molecular. Un grupo de científicos presentó un conjunto de evidencias que se mostraron débiles (cuando no incorrectas). Otros refutaron el argumento. Y otros más han vuelto a presentar evidencias a favor de ésta. Pero incluso personas que han trabajado en dichos estudios plantean dudas sobre la validez universal de esos resultados. La ciencia está abierta a nuevos resultados sorprendentes, pero justamente en esos casos es cuando hay que ser más concienzudo en los experimentos, descartando cualquier interferencia que haga llegar a resultados de forma errónea.

**Referencias:**

(1) Davenas, E. y col. (1988) Human basophil degranulation triggered by very dilute antiserum against IgE. Nature 333:816-818.  
(2) Maddox, J. y col. (1988) “High dilution” experiments a delusion. Nature 334:287-290.  
(3) Benveniste, J. (1988) Dr. Jacques Benveniste replies. Nature 334:291.  
(4) Mezger, H. y Dreskin, S.C. (1988) Only the smile is left. Nature 334:375.  
(5) Gaylarde, P.M. (1988) Only the smile is left. Nature 334:375.  
(6) Suslik, K.S. (1988) Only the smile is left. Nature 334:375-376.  
(7) Glick, J.L. (1988) Only the smile is left. Nature 334:376.  
(8) Escribano, M.J. (1988) Only the smile is left. Nature 334:376.  
(9) Seagrave, J.C. (1988) Evidence of non-reproducibility. Nature 334:559.  
(10) Bonini, S. y col. (1988) Evidence of non-reproducibility. Nature 334:559.  
(11) Hirst, S.J. y col. (1993) Human basophil degranulation is not triggered by very diluted antiserum against IgE. Nature 366: 525-527.  
(12) Ovelgönne, J.H. y col. (1992) Mechanical agitation of very dilute antiserum against IgE has no effect on basophil staining properties. Experientia 48:504-508.  
(13) Aefssa, J. y col. (1997) Transatlantic: transfer of digitized antigen signal by telephone link. Abstract to the Congress of the American Association of Immunologists (San Francisco).  
(14) Sainte-Laudy, J. y Belon, Ph. (2009) Inhibition of basophil activation by histamine: a sensitive and reproducible model for the study of the biological activity of high dilutions. Homeopathy 98:186-197.  
(15) Ennis. M. (2010) Basophil models of homeopathy: a skeptical view. Homeopathy 99:51-56.  
(16) Sainte-Laudy, J. y col. (1996) Analysis of immunosuppressive activity of serial dilutions of histamine on human basophil activation by flow cytometry. Inflamm. Res. 45(Suppl 1):S33-34.  
(17) Sainte-Laudy, J. y col. (2009) Differential effect of storage on molecular and ultra-molecular dilution of histamine. Inflamm. Res. 58(Suppl 1):30-31.  
(18) Sainte-Laudy, J. y col. (2008) Effect of submolecular concentrations of histamine and 1-, 3-and 4-metylhistamines oh human basophil activation. Inflamm. Res. 57(Suppl 1): S27-S28.  
(19) Sainte-Laudy, J. y col. (2007) Use of both CD63 up regulation and IgE down regulation for the flow cytometric analysis of allergen induced basophil activation. Definition of an activation index. Inflamm. Res. 56:291-296.  
(20) Sainte-Laudy, J. y col. (2006) Use of four different flow cytometric protocols for the analysis of human basophis activation. Application to the study of the biological activity of high dilutions of histamine. Inflamm. Res. 55 (Suppl 1):S23-S24.  
(21) Sainte-Laudy, J. y Belon, Ph. (2009) Inhibition of basophil activation by histamine: a sensitive and reproducible model for the study of the biological activity of high dilutions. Homeopathy 9:186-197.  
(22) Belon et al. (1999) Inhibition of human basophil degranulation by successive histamine dilutions: results of a European multi-centre trial. Inflamm. Res. 48 Suppl 1:S17-18.  
(23) Belon et al. (2004) Histamine dilutions modúlate basophil activation. Inflamm. Res. 53:181-188.  
(24) Lorenz y col. (2003) Sensitive flow cytometric method to test basophil activation influenced by homeopathic histamine dilutions. Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd 10:316-324.