

# **L'ISOLAMENTO DEL'HIV— E' STATO VERAMENTE OTTENUTO?**

Eleni Papadopulos-Eleopulos<sup>1</sup> Valendar F. Turner<sup>2</sup> John M. Papadimitriou<sup>3</sup> David Causer<sup>1</sup>

Traduzione di Gianna Traverso

## **Sommario**

A metà del 1995 il Continuum Magazine (Editore, Huw Christie, 172 Foundling Court, Brunswick Centre, Londra WC1N 1QE Regno Unito, Tel. int. + 44 171 713 7071, Fax 7072) offrì un premio di un migliaio di sterline a chiunque fornisse la prova scientifica dell'isolamento dell'HIV: a seguito di questa sfida venne pubblicata una serie di articoli e qui di seguito vi presentiamo i casi contro (Continuum, Settembre/Ottobre 1996 Supplemento pag. 1-24). I punti essenziali dell'Eleopulos e dei colleghi della stampa sono:

1. Nessun ricercatore ha ancora presentato alcuna conferma dell'isolamento di qualsiasi particella, del tipo retrovirale o altro dimostratasi essere un retrovirus mostrando la sua abilità nel riprodurre copie esatte di sé stessa quando posta in una coltura cellulare "non infetta". Sebbene il metodo per l'isolamento retrovirale sia stato largamente discusso e pubblicato dall'Istituto Pasteur nel 1973, nessun ricercatore dell'HIV ha ancora presentato la prova dell'isolamento dell'HIV con questo metodo.
2. Non è corretto parlare di particelle dell'HIV, proteine dell'HIV, RNA dell'HIV o DNA dell'HIV (cDNA) oppure prendere anche in considerazione il concetto di clonazione molecolare o virale o di antigeni dell'HIV senza una tale prova.
3. La scoperta nei fluidi da coltura della trascrizione inversa dell' innesco-stampo (primer-template) A(n).dT15 non è la prova specifica della presenza del retrovirus.
4. Le "proteine dell'HIV" vengono definite come quella parte (approssimativamente il 20%) delle proteine presenti nelle colture/co-culture di tessuti prelevati da pazienti AIDS che reagiscono con alcuni anticorpi presenti in certi sieri di pazienti AIDS. Non è possibile comunque dichiarare che qualsiasi proteina sia un componente di un unico retrovirus esogeno (acquisito dall'esterno) per mezzo di una reazione antigene/anticorpo.
5. Non è dimostrato che alcune delle "proteine dell'HIV" siano codificate dal "genoma dell' HIV". E, per esempio, in un'analisi al computer delle sequenze degli amminoacidi dei complessi proteici della membrana derivati dalle sequenze nucleotidiche di sette isolati di virus dell'AIDS, fu riportato che la proteina gp41, che dovrebbe avere un peso molecolare di 41.000, aveva un peso calcolato da 52.000 a 54.000.
6. C'è disaccordo per quanto riguarda quali siano le proteine "specifiche" dell'HIV e quali siano quindi le proteine significative nel definire l'infezione da HIV sulla base del test anticorpale Western Blot per l'HIV. Attualmente, nel mondo ci sono almeno dieci principali gruppi di criteri per definire un Western Blot positivo per l'HIV e quindi l'infezione da HIV. Pertanto la positività e l'infezione in alcune istituzioni o paesi non è positività o infezione in altri.
7. L'"RNA dell'HIV" e il "DNA dell'HIV" vengono definiti in base alla lunghezza (approssimativamente 10.000 nucleotidi) ed alla composizione chimica (ricca di adenina) di tutto l' RNA presente nelle colture dei tessuti dei pazienti AIDS, NON sulla

base dell'RNA estratto da una particella isolata in precedenza e quindi dimostratasi essere un retrovirus.

8. Nel 1990 si diceva che il genoma dell'HIV consisteva in dieci geni. Quest'anno Montagnier ha riferito che l'HIV possiede otto geni e secondo il Barré-Sinoussi, l'HIV ha nove geni. Nemmeno il numero dei nucleotidi nel "genoma dell'HIV" è costante. Inoltre, ad oggi, sono stati messi in sequenza solo 11 "genomi dell'HIV" a piena lunghezza e di conseguenza, i dati depositati (consignments) del genotipo dell'HIV sono derivati dalle analisi di sequenza di subgenomi che misurano dal 2% al 30% del totale. Il dato è che tali "genomi" variano tra il 3-40%. (Se il 30% del genoma dell'HIV può variare fino al 40%, di quanto varia il 100% del genoma dell'HIV? Nel Western Blot dell'HIV, come può un HIV che produce una serie di proteine rivelare anticorpi che si producono in risposta alla serie di tutti gli altri disparati "genomi dell'HIV"? Quando l'"HIV" diviene una qualche altra entità?). Perciò, non solo non esistono due genomi dell'HIV della stessa lunghezza o composizione nucleotidica, ma non c'è nemmeno una singola entità genetica del "DNA dell'HIV" a descrivere la miriade di "genomi dell'HIV". Si stima inoltre che nei pazienti vi siano da uno a cento milioni di DNA dell'HIV diversi. Non è nemmeno corretto mettere tali DNA sotto l'ombrello di una quasispecie di "genomi strettamente collegati".

9. Anche se c'era la prova dell'isolamento di un unico retrovirus acquisito esogeneamente con un unico segmento di RNA (cDNA), non vi è la prova della clonazione dell'HIV.

10. Ci sono molti meccanismi, tutti ben noti ai retrovirologi e che non hanno niente a che fare con l'acquisizione di un retrovirus esogeno, che possono spiegare tutti i "fenomeni HIV", cioè, la generazione di particelle, proteine e acidi nucleici nei pazienti AIDS o nelle colture/co-culture di tessuti prelevati da pazienti AIDS. Per esempio, i tipi di cellule comuni alle "colture HIV" possono mostrare tali fenomeni indipendentemente dall'essere "infettate dall'HIV".

11. Né i test sugli anticorpi dell'HIV, né i test genomici sono stati valutati in relazione al solo standard aureo scientificamente valido, l'isolamento dell'HIV. Nondimeno, in uno studio, la concordanza fra la sierologia dell'HIV ed il "DNA dell'HIV" variava tra il 40-100% e in un altro studio solo il 74% dei pazienti erano positivi per l'"RNA dell'HIV" del plasma. "In sette laboratori francesi con vasta esperienza nella scoperta PCR del DNA dell'HIV", i dati hanno rivelato che su 138 campioni che mostravano possedere il "DNA dell'HIV", 34 (25%) non contenevano gli "anticorpi dell'HIV", mentre su 262 campioni che non contenevano il "DNA dell'HIV", 17 (6%) possedevano gli "anticorpi dell'HIV".

12. Nonostante quanto sopra descritto, per i retrovirologi, la prova dell'esistenza e della patogenicità di un dato retrovirus dipende dalla dimostrazione di anticorpi specifici alle proteine retrovirali. L'importanza di questo fatto è dimostrata dall'esempio dell'HL23V, il "primo" retrovirus umano scoperto da Gallo a metà degli anni 1970. Vicino al 1980, la dimostrazione che gli anticorpi all'HL23V erano non-specifici, portò alla sua precipitosa fine, tanto che Gallo ora non menziona mai il suo "primo" virus e guarda all'HTLV-I come al "primo" retrovirus umano. In aggiunta alla prova presentata nel 1993 sul saggio di Bio-Tecnologia di Eleopoulos et al, vengono presentati ulteriori dati per cui l'88% dei pazienti AIDS infettati da una o più specie da fungo (*Pneumocystis carinii* compresa) o micobatteriche contengono anticorpi a tali organismi che possono avere una reazione incrociata con le "proteine dell'HIV" trovate nel Western Blot dell'HIV. Non è pertanto possibile dichiarare che tali malattie

sono causate dall'HIV sulla base di un test su anticorpi o che la "sieropositività dell'HIV" in tali pazienti è causata dall' HIV.

\*\*\*

## L'ISOLAMENTO DEL VIRUS - E' STATO VERAMENTE OTTENUTO?

### L'argomentazione a sostegno di una risposta negativa

Eleni Papadopulos-Eleopulos<sup>1</sup> Valendar F: Turner<sup>2</sup> John M.  
Papadimitriou<sup>3</sup> David Causer<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Fisica Medica, <sup>2</sup> Dipartimento di Medicina di Emergenza, Royal Perth Ospital, Perth, Australia Occidentale; Dipartimento di Patologia, Università dell'Australia Occidentale.

*"Ascoltando ambedue le parti di una storia vi convincerete che c'è di più in una storia che in ambedue le parti"* Frank Tiger

L'esistenza precisa di qualsiasi virus, compreso un retrovirus, può essere provata solo isolandolo. Per quasi metà secolo i retrovirus sono stati isolati per mezzo della separazione in bande in gradienti di densità. Si accetta il fatto che le procedure incorporate in questo metodo, che non è affatto perfetto, non siano state seguite dai ricercatori che rivendicano l'isolamento del virus umano da immunodeficienza HIV1. Ciononostante, si dice che al momento ci sia ampia prova che l'HIV è stato isolato e si sia dimostrato che trattasi di un unico retrovirus esogeno. (1) In questo saggio critico abbiamo analizzato i dati rilevanti che hanno la pretesa di provare che l'HIV è stato isolato. Per semplificare la presentazione per i lettori di questo articolo, gli argomenti principali (1) sull'isolamento dell'HIV vengono intitolati nella discussione. Poiché l'argomento è sia complesso che controverso, è necessario presentare dati originali sostanziali e talvolta ripeterli in modo da valutare criticamente le basi del punto di vista secondo cui l'HIV è stato isolato.

1. "Nel 1983 Montagnier et al hanno isolato un retrovirus".

Non c'è alcuna prova nella ricerca del 1983 di Montagnier et al dell'isolamento del virus secondo "il più rigoroso metodo attualmente disponibile". E non hanno nemmeno seguito le "tradizionali... regole Pasteur". Pertanto come hanno isolato un retrovirus? Anche se Montagnier ed i suoi colleghi o altri avessero seguito le "regole Pasteur", dato che "le proteine virali e cellulari e i contaminanti cellulari ....vengono purificati assieme ai virus in gradienti di densità convenzionale", non vi è alcuna ragione per accettare qualsiasi rivendicazione dell'isolamento dell'HIV da parte di qualsiasi gruppo di ricerca che non abbia usato "il più rigoroso metodo attualmente disponibile, cioè la clonazione molecolare del DNA dell'HIV infetto". Comunque, per provare che l'HIV "è stato isolato" per mezzo del "più rigoroso metodo ad oggi disponibile", la clonazione del virus, si deve iniziare con l'RNA dell'HIV (DNA). Dal momento che la proprietà di denominare un RNA "RNA dell'HIV" è subordinata all'isolamento precedente di una particella dimostratasi essere un retrovirus, solo su questa base, "il più rigoroso metodo attualmente disponibile, cioè la clonazione del DNA infettivo dell'HIV", non può provare l'isolamento dell'HIV.

2. "la transcriptasi inversa associata a tali particelle"

Non c'è alcun singolo studio che provi che l'enzima presente nel "mezzo di crescita" o anche nel materiale che in gradienti di densità in sucrosio si associa a 1,16 gm/ml, (la densità che definisce le particelle retrovirali) e che catalizza la trascrizione dell'RNA nel DNA, sia un costituente di particelle di

qualsiasi specie, ancor meno di particelle del tipo retrovirali o un unico retrovirus. La sola associazione fra "particelle" e "transcriptasi inversa" (RT) viene da esperimenti che mostrano che alcune colture/co-culture da pazienti AIDS manifestano sia le particelle, molte delle quali non sono nemmeno di tipo retrovirale, che la trascrizione del stampo-innesco dell'RNA sintetico A(n).dT15. Tuttavia, ciò non costituisce prova dell'esistenza dell'RT o RT come di un costituente di una particella retrovirale. Inoltre, dato che:

(a) la presenza della transcriptasi inversa (RT) è provata indirettamente, cioè, dimostrando la trascrizione del stampo-innesco A(n).dT15 dell'RNA;

(b) il stampo-innesco A(n).dT15 può essere trascritto non solo dall'RT, ma anche da altre polimerasi cellulari del DNA. Tutte le polimerasi cellulari del DNA, alfa, beta e gamma possono copiare l'A(n).dT15. Infatti, nel 1975, una Conferenza Internazionale sulle polimerasi eucariote del DNA che comprendeva Baltimore e Gallo, 3 definì la polimerasi  $\gamma$  del DNA, "un componente delle cellule normali" 4, che si è scoperto essersi diffuso accidentalmente" 2, la cui attività può essere aumentata da molti fattori compresa la stimolazione del PHA 5, come l'enzima che "copia l'A (n).dT15 con alto rendimento, ma non copia bene il DNA"; 3 è impossibile dire che la polimerasi nel "mezzo di crescita" o nel materiale che si associa a 1,16 gm/ml che catalizza la trascrizione inversa dell'A (n).dT15 è l'RT o un numero di altre polimerasi cellulari del DNA.

3. "...anzi, ciascuno di questi criteri potrebbero riflettere un altro retrovirus e alcuni di questi criteri, eg, particelle e proteine potrebbero riflettere materiale interamente non-virale".

Sebbene gli esperti di HIV/AIDS, compresi Montagnier, Gallo e Barré-Sinoussi affermino che l'RT è "unico dei retrovirus" e "il contrassegno di un retrovirus", (6-8) in questo caso non è vero, fatto accettato da alcuni degli scienziati più famosi.(9) "La transcriptasi inversa (RT) si è innanzitutto rivelata come un catalizzatore essenziale nel ciclo biologico. Comunque, negli anni passati, si sono accumulate prove che dimostrano che gli RT sono coinvolti in un numero sorprendentemente alto di eventi trascrizionali mediati dall'RNA che comprendono sia le entità genetiche virali che quelle non virali ... la possibilità che la trascrizione inversa abbia inizialmente preso posto nella prima era arcaica è supportata da un grande numero di fatti e dall'ipotesi che l'RNA abbia preceduto il DNA come materiale cellulare genetico".(10) Secondo Varmus: "alla trascrizione inversa è stato assegnato un ruolo centrale nella riproduzione degli altri virus (epatite B e virus del mosaico del cavolfiore) e nella trasposizione e generazione di altri tipi di DNA eucariotici". (11) "I virus dell'epatite B (HBV) sono piccoli virus a DNA che producono infezioni epatiche persistenti in una varietà di ospiti animali e riproducono dei genomi a DNA tramite la trascrizione inversa di un intermedio a RNA. Tutti i membri di questa famiglia contengono un open reading frame (ORF), "P" (per pol), che è omologo ai geni retrovirali del pol" (pol=polimerasi). 12 "Il virus dell'epatite B (HBV) assomiglia, in molti aspetti, ai retrovirus, compreso l'HIV. In particolare ambedue i virus contengono la transcriptasi inversa e si riproducono tramite un intermedio dell'RNA". Per questa ragione alcuni hanno suggerito che l'infezione da epatite B dovrebbe essere trattata con gli stessi agenti antiretrovirali dell'infezione HIV. Attualmente esiste la prova che dimostra che sebbene il principale organo colpito dal virus dell'epatite B sia il fegato, cellule diverse dagli epatociti "compresi i linfociti e monociti del sangue periferico, possono diventare infettati dall'HBV" 14. La stimolazione dei linfociti in generale e la stimolazione del PHA in particolare è associata alla produzione del virus dell'epatite B da parte dei linfociti del sangue periferico in pazienti infettati dall'HBV compresa la riproduzione virale nell'infezione da epatite B cronica dell'infanzia". (15,16) Secondo Doolittle et al, "ci sono molte entità dotate di

una transcriptasi inversa differente dai retrovirus, compresi gli elementi mobili trovati in una grande varietà di eucariociti, alcuni virus vegetali ed animali a DNA ed anche alcuni introni".(17) In una delle sue più recenti pubblicazioni, uno dei virologi più noti, Robin Weiss dell'Istituto di Ricerca sul cancro, Londra, UK, ha scritto: "Ora sappiamo che un gruppo di elementi genetici più ampio di quello dei retrovirus utilizza la trascrizione inversa ad un certo stadio di riproduzione; questi includono gli epadnavirus (compreso il virus dell'epatite B), i virus a mosaico del cavolfiore ed i retrotrasposoni di eucarioti e procarioti. La lamivudina può pertanto trovare posto nel trattamento delle infezioni da epatite B come pure in quelle da HIV.18 In altre parole, l'RT non sembra essere più specifico ai retrovirus dell'ATPase, un enzima che ora sappiamo essere onnipresente, ma che prima della scoperta dell'RT veniva usato sia per scoprire che per quantificare i retrovirus. 19 Poiché in tutta la letteratura dell'HIV, per HIV si intende niente di più che la scoperta delle "particelle dell'HIV", delle proteine e dell'RT (e frequentemente una sola di esse), e poiché ciascuno o tutti questi fenomeni "possono riflettere nell'insieme materiale non-virale", non ne segue quindi che l'HIV potrebbe riflettere materiale interamente non-virale?

4. "Gli antigeni e le proteine dell'HIV associate a tali particelle".

Fino ad oggi nessuno ha presentato la prova che gli "antigeni dell'HIV o le proteine" siano costituenti di particella del retrovirus o anche di una particella di tipo-retrovirale tantomeno un unico retrovirus, l'HIV.

5. "Gli anticorpi contro il ceppo virale (dell'HIV) di Montagnier - standard globale di tutti i "test dell'HIV".

5.1 Nel saggio del 1983 intitolato "Isolamento di un retrovirus T-linfotropico da un paziente a rischio per sindrome acquisita da immuno-deficienza (AIDS)", 20 dove Montagnier ed i suoi colleghi riportavano l'"isolamento" del loro ceppo di HIV, le cellule ottenute dalla biopsia di un linfonodo di un uomo gay con linfadenopatia (sindrome linfadenopatica [LAS] vennero messe in coltura con il PHA, l'IL-2 e l'antisiero all'interferone umano. (Per quanto riguarda quest'ultimo si era precedentemente dimostrato che nei topi portava ad una "produzione di retrovirus aumentata di un fattore da 10 a 50". Dopo 15 giorni si scoprì l'attività dell'RT impiegando il innesco-stampo sintetico A(n).dT15. La trascrizione inversa dell'A(n).dT15 è stata considerata la prova che un retrovirus era presente nelle cellule del linfonodo. La scoperta della stessa attività nel sopranatante di una co-cultura delle stesse cellule con linfociti da un individuo sano fu considerata la prova che si potesse trasmettere il retrovirus. In un altro esperimento, il polibrene e il sopranatante dalle co-culture furono aggiunte a colture di linfociti di un cordone ombelicale di due, tre giorni. Dopo 7 giorni si scoprì "un titolo relativamente alto" della trascrizione A(n).dT15. Ciò fu considerata la prova non solo della trasmissione ma anche dell'isolamento. Che quello che era stato appena isolato fosse un retrovirus fu in seguito indicato dalla sua densità in un gradiente di densità con sucrosio, che era di 1,16, e dalla sua marcatura con con l'uridina [3H] (fig. 1)". Nella figura 1 è stata presentata la prova che l'A(n).dT12-18 poteva essere trascritto per mezzo del materiale dal supernatante delle colture delle cellule ombelicali che, nei gradienti di densità in sucrosio, si associavano a 1,16 gm/ml.

I linfociti "infettati" del cordone ombelicale, come pure le cellule "che producevano l'HTLV vennero lisate. Le proteine da un "estratto cellulare" ottenuto dai lisati avevano reagito con i sieri dal paziente con linfadenopatia, un altro paziente con "adenopatie multiple", un individuo sano, una normale capra ed antisiero di capra "all'HTVL-I p24". Molte proteine da sia dai tipi di cellule, ma specialmente dai cordoni ombelicali "infettati", reagivano con TUTTI i sieri. Tuttavia le cellule del cordone ombelicale "infettato" non reagivano con l'antisiero all'"HTLV-I p24". Le proteine dal supernatante di coltura che si associava a 1,16 gm/ml reagivano anche con i sieri ma,

invece dell'antisiero di capra anti-p25, gli stessi usavano sieri da un altro donatore sano. Nelle striscie (di WB) pubblicate è difficile se non impossibile distinguere qualsiasi tipo di banda reattiva con ciascun siero. Nel testo si afferma: "si possono vedere tre principali proteine: la proteina p25 e le proteine con pesi molecolari di 80,000 e 45,000" nella striscia con il siero dal paziente con il LAS. Montagnier et al hanno inoltre riferito che la "microscopia elettronica dei linfociti del cordone ombelicale infettato mostrava particelle caratteristiche immature con sviluppo con densità a mezzaluna (del tipo C) in corrispondenza della membrana citoplasmatica". Non diedero nessun dato della microscopia elettronica (EM) sull'associazione materiale a 1,16 gm/ml, ma conclusero: "Un retrovirus appartenente alla famiglia dei virus della leucemia delle cellule umane T recentemente scoperti (HTLV), ma chiaramente distinto da ciascun precedente isolare, è stato isolato da un paziente caucasico con segni e sintomi che spesso precedono la sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS). Questo virus è un tipico virus da tumore dell'RNA del tipo C, si sviluppa dalla membrana cellulare, preferisce il magnesio per l'attività di transcriptasi inversa, ed ha un antigene interno (p25) simile all'HTLV p24" 20, (quando si è accertato che gli individui che hanno anticorpi che reagiscono a questo "ceppo virale" non progredivano rapidamente verso l'AIDS, senza alcuna prova, il retrovirus tassonomicamente distinto "tipico del tipo-C" diventava un tipico Lentivirus, tassonomicamente distinto).

5,2 LA PAROLA "ISOLAMENTO" DERIVA DAL LATINO "INSULATUS" CHE SIGNIFICA "FATTO DENTRO UN'ISOLA". SI RIFERISCE ALL'ATTO DI SEPARARE UN OGGETTO DA QUALSIASI MATERIALE ESTRANEO CHE NON SIA QUELL'OGGETTO. L'oggetto di interesse non è una proteina e nemmeno un frammento dell'RNA (DNA), ma un unico retrovirus esogeno, l'HIV. Niente di più e niente di meno. Non è stata presentata una tale prova da Montagnier et al. Ovviamente, nel migliore dei casi, la scoperta di fenomeni quali le particelle di tipo virale nelle colture delle cellule, le reazioni degli anticorpi/antigeni e la prova della trascrizione inversa dell'A(n).dT15 possono essere considerati la conferma solo della scoperta di un retrovirus e poi, se e solo se, si può dimostrare che ognuno di essi è specifico ai retrovirus. Questo non si può fare senza aver prima isolato il retrovirus. Perciò non ci si sorprende che Popovic, Gallo ed i loro colleghi non abbiano considerato i dati di Montagnier et al come prova di "vero isolamento". 21(Nei loro saggi del 1984 Gallo ed i suoi colleghi definirono l'isolamento come scoperta di "più di uno di quanto segue": "scoperta ripetuta di un'attività di trascrizione inversa MG2+-dipendente nei fluidi dei supernatanti; virus osservato dal microscopio elettronico (EM); accertata espressione intracellulare di antigeni collegati al virus con anticorpi da donatori sieropositivi o con antisiero di coniglio all'HTVL-III; oppure trasmissione di particelle". (Per trasmissione di particelle si intendeva scoperta dell' RT o di particelle in colture di sangue del cordone ombelicale, midollo osseo o linfociti T del sangue periferico, messi in coltura con supernatanti dalle colture "infettate"). Poiché ciò non è diverso dagli esperimenti che Montagnier ed i suoi colleghi hanno fatto, ne segue che anche Gallo ed i suoi colleghi non hanno provato il "vero isolamento". Infatti, la definizione di Gallo et al di isolamento fa sorgere altre domande che comprendono: Com'era possibile ottenere l'antisiero di coniglio "all'HTVL-III" prima che il virus fosse isolato e com'era possibile, prima che il virus fosse isolato, accertare che sia l'antisiero di coniglio che i sieri di pazienti impiegati per testare materiale dalle colture interagissero specificatamente con il virus? Secondo la loro definizione, si può isolare l'HIV anche se non si è scoperto alcun RT. Com'è possibile dal momento che l'RT è la "caratteristica" dell'HIV? 22.]

E' inoltre significativo che nella richiesta di brevetto del 1986 sua e dei suoi colleghi "Progressi relativi a isolari virali ed il loro uso", Robin Weiss si riferisse al "ceppo dell'HIV" di Montagnier come "al materiale". "Un isolare del virus dell'AIDS così denominato era stato precedentemente riscontrato da Montagnier ed i suoi colleghi nel 1983 in Francia, i quali chiamarono il

materiale "Un Virus Associato a Linfadenopatia"<sup>23</sup>. Inoltre, l'isolamento di un retrovirus dalle colture del cordone ombelicale non è la prova che il retrovirus sia stato introdotto dall'esterno, cioè, che abbia avuto origine dal paziente con linfadenopatia: Tutte le cellule contengono retrovirus endogeni (vedi 6.3.2.). Infatti lo sperma, gli ovuli, la placenta, i tessuti fetali ed embrionali, e, in misura minore, i linfociti del cordone ombelicale, vennero ampiamente studiati poiché si diceva che i retrovirus si tramettevano verticalmente (nella linea delle cellule embrionali) e poiché si pensava giocassero un ruolo significativo nella differenziazione. All'inizio dell'era dell'AIDS vennero riferiti uno o più dei seguenti fenomeni da esperimenti con tali cellule: particelle del tipo retrovirale, attività di trascrittasi inversa ed antigeni retrovirali. 24-26 Perciò tali risultati non possono essere la prova dell'esistenza dell'HIV.

Non è la presenza di anticorpi nei pazienti AIDS, ma nemmeno nei controlli degli individui sani, che reagiscono alle proteine che si associano a 1,16gm/ml, la prova che tali individui siano infettati da un retrovirus esogeno, l'HIV. Per esempio, in uno studio pubblicato quest'anno, uno dei retrovirologi più noti, Reinhard Kurth, dell'Istituto Paul-Ehrlich in Germania, ed i suoi colleghi, riferirono che il 70% dei "pazienti positivi all'HIV", messi a confronto con solo il 3% dei donatori di sangue, avevano anticorpi che reagivano con i retrovirus HTDV/HERV-K. Tuttavia, l'HTDV/HERV-K non è un retrovirus presente solo nei pazienti AIDS, cioè un retrovirus esogeno come si dice esserlo l'HIV, ma l'HTDV/HERV-K è un retrovirus endogeno oppure, come secondo Kurth, un retrovirus presente "in tutti noi". Com'è possibile quindi affermare, basandosi solo su un test su anticorpi, che "il ceppo di Montagnier", se si ammette che Montagnier ha isolato tale virus, non è un altro retrovirus endogeno generato dalle condizioni presenti in questi pazienti? (vedi 6.3.2).

5.3 Evidentemente il gruppo di Montagnier trovò delle reazioni tra i sieri dei pazienti e tre proteine p25 (p24), p45 (p41) e p80 nel materiale associato, ma solo la p24 fu considerata una proteina HIV.

Tuttavia, nel 1984 il gruppo di Gallo riferì che "Nessun antigene dai cloni non infettati reagiva con i sieri fatta eccezione per una proteina con un peso molecolare di 80.000 nell'H17 che legava anticorpi da tutti i campioni di siero umano testato [compreso il siero normale], ma non dal siero del coniglio e della capra". Per questo la proteina p80 fu considerata non specifica. "I nuovi antigeni espressi [reagenti con i sieri negli estratti cellulari] dopo infezione virale e riconosciuti dal siero umano usato per questa analisi comprendevano le p65, p55, p41, p39, p32 e p24. Furono inoltre scoperte una grande proteina con un peso molecolare di approssimativamente 130.000 e una proteina di 48.000". Al contrario di Montagnier, il gruppo di Gallo riferì inoltre che, "con il normale siero umano, non era stato scoperto (non dimostrato) nessun antigene, e concluse, "Questi risultati mostrano chiaramente che gli antigeni scoperti dopo l'infezione virale sono proteine "virus-codificate" o antigeni cellulari specificamente provocati dall'infezione".<sup>27</sup> Gallo ed i suoi colleghi riferirono inoltre che delle proteine dal supernatante delle colture "infettate", in gradienti di densità in sucrosio associati a 1,16 gm/ml, solo due proteine, la p41 e la p24, reagivano con i sieri dei pazienti e conclusero che "queste molecole sono i componenti principali della preparazione virale. La p24 e la p41 possono pertanto considerarsi proteine strutturali virali".

Nei due anni successivi alla loro scoperta dell'HIV, sebbene il gruppo di Montagnier avesse evidentemente fatto ripetuti tentativi, a differenza del gruppo di Gallo, non poterono scoprire la proteina ad "elevato peso molecolare" che reagiva con sieri diversi, ma che "non era presente nel supernatante delle cellule di controllo non infettate". Negli esperimenti riportati nel 1985, invece di usare i linfociti del cordone ombelicale, usarono cellule "infettate" H9 e CEM, due linee cellulari leucemiche e le misero in coltura (le marcarono), con cisteina radioattiva 35, cisteina S (un costituente essenziale degli amino-acidi delle proteine umane). Riferirono che nel

supernatante "una proteina di approssimativamente 110-120K poteva essere specificamente immunoprecipitata dai sieri da pazienti pre-AIDS o AIDS, in aggiunta alle proteine del nucleo e non dai sieri di donatori di sangue sani o di quelli che lavoravano nei laboratori. La proteina era assente nei supernatanti dei linfociti non infettati T, nelle "linee" cellulari T oppure B". Dimostrarono inoltre che la proteina 110K era una glicoproteina (gp110). Per ragioni non specificate, pensavano che la proteina 110K avesse un precursore cellulare.. Per dimostrare ciò, invece di usare le linee cellulari CEM o H9, crearono "un ibrido cellulare, tra i linfociti normali T4 e la linea cellulare MOLT-4, che venne poi "infettata" con il LAV e messa a coltura con cisteina radioattiva. I sincizi risultanti erano lisati e le proteine venivano fatte reagire "con il siero LAV-positivo". "Dopo una marcatura di 3 ore, venne evidenziata una banda di 150K, dopo una marcatura più lunga (12 ore) venne evidenziata una banda di 135K". Curiosamente, questo fatto fu interpretato come l'indicazione che lo stesso [135] era derivato dal precursore 150K" e che "sia nel citoplasma che nella membrana cellulare, la gp150 si convertiva nella forma della gp135 .... Nel corso della morfogenesi del virus, la gp135 si convertiva in gp 110-120 per parziale rimozione enzimatica dei carboidrati, senza dissociazione \*proteolitica\*. La gp110 associata al virus [Non una singola parte dei loro dati era derivata anche da una particella di tipo virale o da materiale che si associava a 1,16 gm/ml. Tutto ciò derivava sia da cellule infette che dal supernatante da coltura] può essa stessa essere ulteriormente trattata durante l'azione del virus ... oltre alla principale associazione 110-120K riscontrata dopo la marcatura del virus, tre altre piccole associazioni rispettivamente di 70K, 40K e 34K potevano essere eccezionalmente immunoprecipitate dai sieri dei pazienti. Dal momento che alcuni di questi sieri non hanno fatto precipitare alcuna proteina gag, si può affermare che tali proteine sono antigenicamente collegate alla gp110 e sono prodotti di dissociazione di quest'ultima."<sup>28</sup> Si può mettere in discussione questa conclusione sotto molti aspetti. E' sufficiente citarne solo due:

(a) Il supernatante e le cellule da coltura non possono essere considerati sinonimo di un retrovirus.

(b) Sebbene Montagnier et al non avessero fatto commenti, i loro dati mostrano che molte proteine, compresa una p40 trovata nel supernatante di cellule "non infettate" sia CEM che H90, reagiscono con i sieri da pazienti con linfadenopatia.

In qualche modo, senza la prova che esse abbiano codificato tramite "il DNA dell'HIV, o appartengano ad una particella di tipo retrovirale, le seguenti proteine, gp160/150, gp 120, gp 45/40, p34/32, p24, p18/17 trovate nelle cellule, nei supernatanti, oppure nell'associazione a 1,16 gm/ml in gradienti di densità con sucrosio divennero note come proteine dell'HIV. In altre parole, contrariamente a qualsiasi ragionamento scientifico, si è presupposto che i sieri dell'AIDS contenessero anticorpi specifici all'HIV e le proteine con cui queste proteine reagiscono vennero definite proteine specifiche dell'HIV.

5.4 Le "glicoproteine dell'HIV, gp 160, gp 120 e gp41.

(a) Nel 1983 [20] ed anche nel 1984 Montagnier ed i suoi colleghi[29] dichiararono che sebbene la p45/41 reagisse con i sieri dei pazienti, questa proteina non era virale, ma era la proteina cellulare onnipresente, "l'actina". E' interessante che anche quest'anno, il criterio usato da Montagnier per definire un Western Blot positivo all' HIV sia: "la presenza di anticorpi contro prodotti del gene dell'env (gp160, gp120) e la reazione ad almeno un prodotto del gene del gag (criterio WHO)"[30]. Tuttavia, ad oggi, nessun altro criterio, nemmeno il criterio WHO, esclude la p41. Il criterio WHO è: associazione di 2 env (precursore, gp esterna, o gp transmembrana) con o senza qualsiasi altra associazione (transmembrana=gp41).<sup>31</sup> Al contrario di Montagnier, Gallo considera la gp41 la proteina più specifica dell'HIV.

Nel 1985, Gallo ed i suoi colleghi, confrontando il quarto open reading frame (ORF) del "DNA dell'HIV" che hanno chiamato env-lor, con i geni env

di altri retrovirus, riferirono che "Il predetto prodotto del quarto reading frame env-lor divide molti fattori in comune con i precursori dei geni degli involucri di altri retrovirus, il più singolare dei quali è una regione idrofobica vicino al centro della proteina .... Anche l'area degli amino-terminali del prodotto di traslazione del quarto open reading frame assomiglia ai precursori della proteina dell'env di altri retrovirus .... riteniamo che il quarto open reading frame codifichi un precursore dell'env .... Nella sua forma avanzata probabilmente si fende in una grande proteina della membrana esterna fortemente glicosilata lunga circa 481 amino-acidi ed una proteina della trasmembrana, lunga 345 amminoacidi che può essere glicosilata. La dimensione di questi prodotti precitati si adatta alla scoperta di una grande proteina glicosilata dell' Mr 120-160K nelle cellule infettate dall'HTLV-III che è probabilmente il precursore del gene dell'env glicosilato ed una più piccola, la gp41 associata al virione che è probabilmente la proteina della membrana". 32 Tuttavia, in uno studio pubblicato nel 1987 da Gallo ed i suoi colleghi, in cui hanno effettuato un'"analisi effettuata al computer" delle sequenze degli ammino-acidi dei complessi delle proteine dell'involucro derivati dalle sequenze del nucleotide di sette isolari del virus AIDS", si riferiva che, "Sebbene nell'insieme le dimensioni e le strutture delle sette proteine della superficie siano piuttosto simili, le sequenze dedotte degli ammino-acidi differiscono sostanzialmente. Mediamente, solo il 66% degli ammino-acidi vengono conservati nella parte esterna della proteina ... gp41, la parte della trasmembrana del complesso della proteina dell'involucro mostra più dell'80% degli ammino-acidi conservati, ma la "gp41 dovrebbe essere, secondo calcolo, da 52.000 a 54.000 dalton". 33 Anche se si è trovato che il peso molecolare delle predette glicoproteine dalla lunghezza del quarto ORF dell'"HIV" è identico a quello della proteina presente nel Western Blot (41,000), l'asserzione da parte di Gallo che l'interazione della gp41 con gli anticorpi trovati nei sieri dei pazienti AIDS sia la prova che la gp41 è \*codificata\* dal "genoma dell'HIV, e che, sia la gp41 che gli anticorpi siano specifici ai retrovirus, è in contrasto con quanto Gallo andava dicendo nel 1981.

A metà degli anni '70, Gallo ed i suoi colleghi riferirono l'isolamento del primo retrovirus umano, l'HL23V. Infatti, la prova dell'"isolamento" dell'HL23V superò quello dell'HTLV-I e dell'HIV in almeno due aspetti. A differenza dell'HIV, il gruppo di Gallo: (a) riferì la scoperta dell'attività di trascrittasi inversa in leucociti freschi, non messi a coltura; 34 (b) pubblicò una micrografia elettronica di particelle similvirali che si associano ad una densità in sucrosio di 1,16 gm/ml. 35. A seguito della scoperta dell'HL23V, alcuni ricercatori tentarono di determinare i suoi test che utilizzavano in prevalenza anticorpi (36), mentre altri erano interessati a stabilire la specificità delle reazioni degli anticorpi. I primi comprendevano due dei più noti esperti in HIV, Reinhard Kurth e Robin Weiss, ed i loro colleghi che, per questo scopo usavano " il Simian Sarcoma-Associated helper virus (SSAV) ed il ceppo M7 del virus endogeno di babuino (BEV) per studiare i sieri umani per anticorpi specifici: è stato inoltre incluso un virus (HL23V-1) isolato in origine da leucociti di sangue periferico messi a coltura di un paziente con leucemia acuta mieloide. Si è dimostrato che l'HL23V-1 comprende un misto di due virus, uno strettamente collegato all'SSAV, l'altro al BEV e si è trovato che "Un esame di sieri umani da individui sani rivelava la presenza di anticorpi ricorrenti in modo naturale che reagiscono negli esami di radio-immuno-precipitazione con proteine di virus del tipo C di mammiferi", comprese le proteine interne (gag) e quelle dell'involucro (env) dell'HL23V, SSAV e BEV e concludevano, "Gli studi sierologici ivi presentati e condotti da altri forniscono la prova indiretta che il modo infettivo di trasmissione resta una possibilità reale negli umani, e suggerisce che l'infezione con un "oncornavirus" [retrovirus] può essere estremamente diffusa. 37 Tre anni dopo, nel 1980, due gruppi di ricerca, 38,39 uno dal Laboratorio di Biologia Cellulare e Molecolare, Istituto Nazionale Cancro e l'altro dal Laboratorio di Oncologia Virale, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, che impiegavano le "glicoproteine virali", scoprirono che gli anticorpi presenti nei sieri umani che reagivano con queste proteine erano "dirette

contro strutture di carboidrati" e concludevano che "I risultati supportano l'idea che gli anticorpi in questione siano il risultato dell'esposizione a molte sostanze naturali che possiedono antigeni che cross reagiscono largamente e non sono il risultato di un'infezione umana diffusa con oncovirus capaci di riprodursi". Nel 1981 Gallo accettò la prova che gli anticorpi che reagivano con proteine dell'HL23V erano diretti non contro le proteine, "ma contro le frazioni di carboidrati che vengono introdotte dalla cellula ospite come un evento post-trascrizionale, e che sono pertanto specifici delle cellule e non specifici del virus". 40 Questa scoperta fu talmente significativa che oggi nessuno, nemmeno Gallo, considera l'HT23V come il primo retrovirus umano, o anche un retrovirus. Infatti, nel 1981, quando Gallo ed i suoi colleghi segnalavano la presenza negli umani di anticorpi verso quello che adesso si chiama il primo retrovirus umano, l'HTLV-I, (secondo Weiss, "Il primo retrovirus 'umano' ad essere isolato nel 1971 è stato un virus umano schiumoso (HFV) da una linea cellulare da carcinoma nasofaringeo", 18) il titolo del saggio era, "Anticorpi in sieri umani reagenti contro una proteina strutturale interna del virus del linfoma delle cellule umane T". 40 In questo studio Gallo ed i suoi colleghi hanno descritto il ritrovamento di anticorpi diretti contro una "importante proteina interna strutturale (p24) dell'HTLVCR" e dichiarato che tali anticorpi erano "specificamente diretti alle proteine dell'HTLVCR e non a determinanti specifici delle cellule - in altre parole, le reazioni immunologiche non sono quelle riportate nei sieri umani contro glicoproteine di virus animali i quali (sieri), mancando della specificità verso il virus, sono diretti contro i residui di carboidrati della glicoproteina".

(b) Fin dal 1989, ricercatori di New York dimostrarono che nelle analisi del Western Blot, "i componenti visualizzati nella regione di 120-160 kDa non corrispondono alla gp120 od al suo precursore, ma piuttosto agli oligomeri della gp41". E' stato inoltre dimostrato che il campione WB ottenuto è subordinato a molti fattori comprese la temperatura e la concentrazione di sodio dodecyl-solfato usato per rompere il "virus puro". "I risultato è stato quello di confusione sull'identificazione di queste associazioni per conclusioni inesatte negli studi sperimentali. Nello stesso modo, alcuni campioni clinici possono essere stati erroneamente identificati come sieropositivi, basandosi sull'ipotesi che queste associazioni riflettevano reattività specifica contro due distinti componenti virali e corrispondevano ad un criterio di positività vera o probabile. L'identificazione corretta di queste associazioni influenzerà gli standard da stabilirsi per la positività del Western Blot: è necessaria una reinterpretazione dei risultati pubblicati." 41.42 (Poca cosa se si fosse fatta più attenzione a questo rapporto!). Infatti, se, come si asserisce, i Western Blot dell'HIV vengono preparati da lisates dei virioni purificati dell'HIV, sarebbe quindi impossibile trovare la p160 e la p120 nelle striscie poiché:

(i) Tutti i ricercatori sull'HIV sono d'accordo con Montagnier e Gallo che la gp160 è un precursore della gp120 e la dp41 e a differenza di queste due ultime proteine, viene trovata solo nelle cellule infettate e non nelle particelle mature;

(ii) Sebbene siano stati resi pubblici molte micrografie elettroniche di particelle di tipo virale in materiale non separato in bande, nessuno, 43,44 nemmeno il CDC, 45 o Hans Gelderblom ed i suoi colleghi che hanno studiato queste particelle in modo molto approfondito, ha provato l'esistenza nelle colture di particelle separate da cellule che posseggano estroflessioni (spikes\*. In una delle sue pubblicazioni più recenti Gelderblom ed i suoi colleghi hanno stimato che, immediatamente dopo essere state liberate, "le particelle dell'HIV" posseggono una media di 0,5 estroflessioni per particella, ma hanno anche sottolineato che "era possibile poter osservare strutture simili alle estroflessioni anche quando non era presente nessuna gp120, cioè, falsi positivi." 46 Si accetta il fatto che la gp120 sia presente solo nelle estroflessioni (spikes). Poiché non esiste la prova della presenza di estroflessioni nelle particelle libere da cellule, non è possibile che la gp120 sia presente nel Western Blot.

## 5.5 La "proteina pol dell'HIV", p31, p34.=20

Nel 1987 Henderson ha isolato le p30-32 e p34-36 di "HIV purificato tramite doppia separazione in bande" in gradienti di densità con sucrosio. Confrontando le sequenze degli ammino-acidi di queste proteine con proteine DR di istocompatibilità di Classe II, conclusero che "le catene alfa e beta del DR sembravano identiche rispettivamente alle proteine p34-36 e p30-32;(47).

## 5.6 La "proteina gag dell'HIV", p24

Secondo Montagnier, la p24 è la proteina dell'HIV, e per almeno tre anni dopo l'introduzione del test sugli anticorpi dell'"HIV", una banda della p24 trovata nel WB fu considerata da molti laboratori, compreso il CDC, come la prova dell'infezione da HIV. Attualmente si è ampiamente provato che gli anticorpi che reagiscono con la p24 sono onnipresenti sia nei sieri umani che in quelli animali, e l'interpretazione che ne deriva è che la p24, gli anticorpi, o ambedue, siano non-specifici all'HIV o che una grande parte sia di umani che di animali sia infettata dall'HIV. Per esempio, se l'associazione della p24 nel WB è considerata la prova dell'infezione da HIV, si ha quindi come risultato che circa il 30% degli individui che subiscono una trasfusione con sangue negativo all'HIV ne diventano infettati. (48) Poiché, secondo il Gruppo di Ricerca Clinica del vaccino dell'AIDS,(49) "La presenza della banda della p24 era comune fra volontari a basso rischio non infettati e complicava l'interpretazione dei risultati dei test del Western blot", l'infezione da HIV dovrebbe essere comune a individui sani a rischio zero. Infatti, in conseguenza a tale prova, dal 1987, con forse solo due eccezioni, Montagnier ed i ricercatori che conducevano il Multicenter AIDS Cohort Study negli Stati Uniti, in nessuna parte del mondo nessun laboratorio considera una reazione fra la p24 nel WB e gli anticorpi presenti nei sieri, la prova dell'infezione da HIV. Tuttavia, quando si verifica la stessa reazione tra un anticorpo alla p24 del WB ed il siero di un paziente, si considera prova di viremia, e quando si verifica tra un anticorpo alla p24 e materiale presente in una coltura cellulare, si considera la medesima reazione la prova dell'isolamento dell'HIV!

Ovviamente, il ritrovamento di una proteina, anche se riconosciuta come specifica del virus, in sieri o anche colture, non costituisce prova di isolamento o di viremia. Che tale ritrovamento sia non-specifico può essere meglio illustrato da alcuni esempi. Nel 1992, Jorg Shuppbach, l'autore principale di uno dei primi quattro saggi del 1984 pubblicati dal gruppo di Gallo sull'isolamento dell'HIV, riferiva che tutte le colture di sangue di 49/60 (82%) "individui presumibilmente non infettati ma sierologicamente imprecisati e 5/5 dei donatori di sangue sieronegativi vennero trovati positivi alla p24".(50) Se la p24 è una proteina dell'HIV deve allora essere presente in tutti i pazienti AIDS se non in tutti i pazienti sieropositivi e non nelle persone non a rischio di sviluppare l'AIDS. Nel 1989, David Ho ed i suoi colleghi usarono la misurazione della p24 nel siero e nelle colture di cellule non-infettate messe a coltura con plasma da pazienti "infettati", per valutare il virus attivo, "l'HIV-1 infetto", la viremia, la portata virale. Il siero da 14/53 pazienti le cui colture di plasma erano positive, era negativo alla p24. "Perciò, la coltura del plasma era più sensibile della misurazione dell'antigene della p24 nel siero nel riscontrare la presenza di HIV-1 libero da cellule nel sangue". Riferirono inoltre che il trattamento con l'AZT per quattro settimane portava a "una riduzione del 94% nella portata del virus libero da cellule. Anche Jackson et al che sostengono un tasso globale del 98,3% nell'"isolamento dell'HIV", possono trovare la p24 nel siero del 42% dei pazienti AIDS, del 37% dei pazienti ARC e del 17% di individui sieropositivi asintomatici (52), che è un tasso molto più basso che nei trapiantati di organi non infettati dall'HIV. In un trapiantato renale (il

donatore era negativo per gli antigeni alla p24), che 3 giorni dopo il trapianto aveva sviluppato febbre, debolezza, mialgia, tosse e diarrea, tutti i "campioni batteriologici, parassitologici e virologici restavano negativi (compreso la PCR dell'HIV). Il solo risultato positivo era l'antigenemia della p24, positiva ai kits degli antigeni Abbot in titoli molto alti di 1000 pg/ml per analisi policlonali e 41 pg/ml per quelle monoclonali.

Detta antigenemia era totalmente neutralizzabile con l'antisiero Abbot anti-p24 ... due mesi dopo il trapianto, tutte le analisi per l'antigene-p24 divennero negative, senza la comparsa di anticorpi all'HIV. Cinque mesi dopo il trapianto il nostro paziente rimane asintomatico, la funzione renale è eccellente, l'antigenemia alla p24 ancora negativa e gli anticorpi all'HIV ancora negativi.(53) Usando due kits, l'Abbot ed il Diagnostico Pasteur, in uno studio, si trovò che la p24 era presente in modo transitorio nei 12/14 dei trapiantati di rene. Titoli massimi variavano da 850 a 200 000 pg/ml 7-27 giorni dopo il trapianto. Erano anche positivi due trapiantati di cuore e 5/7 di trapiantati al midollo spinale, sebbene i titoli fossero più bassi e variassero da 140-750 pg/ml. La scomparsa della p24 impiegava più tempo nei trapiantati di rene (6 mesi circa) che in quelli di midollo osseo (4-6 settimane circa). Secondo gli autori: "ciò può dipendere dalle differenze nella terapia da immunosoppressione". Discutendo le loro scoperte scrivevano: "L'osservazione di una proteina 25-30kD che si associa ai sieri umani policlonali anti-HIV dopo immunocontagi con sieri reattivi fa sorgere molti quesiti. Questa proteina potrebbe essere relativa ad un responso dell'ospite immune agli innesti ed ai trapianti ... La sua prima scoperta dopo il trapianto poteva indicare delle implicazioni della terapia da immunosoppressione... Si poteva perciò confrontare la proteina 25-30kD con l'antigene alla p28 descritta recentemente con sequenza linfotropica-endogena del virus connesso alla cellula-T umana... La caratterizzazione di questa proteina 25-30kD può rappresentare un importante contributo alla scoperta dei retrovirus endogeni collegati all'HIV-1".(54) Il disaccordo tra Montagnier e Gallo sul fatto che le proteine fossero effettivamente le proteine dell'HIV non era limitato alla gp41 ma includeva la p24. Montagnier ripeteva sempre che "non esisteva alcuna cross-reattività tra la p24 dell'HIV ed altri anticorpi comprendenti anticorpi agli HTLV-I, II". Fino al 1985 lo stesso sosteneva che c'era "un'omologia molto stretta tra il LAV e l'HTLV-III, ma un'assenza di omologia con l'HTLV-I e -II".(28) Comunque nel 1985 scriveva: "Abbiamo inoltre confrontato le sequenze degli ammino-acidi derivati delle proteine LAV con quelle dei retrovirus dell'HTLV-I ed altri e non abbiamo trovato alcuna omologia significativa fatta eccezione per i campi pol e gag che in genere si conservano tra i retrovirus".(55)

Gallo ha sempre sostenuto che esiste omologia tra i geni gag dell'HTLV-I, II e dell'HIV e che i molti fattori in comune tra tutti i "retrovirus umani" includono "una piccola proteina costituente principale del capsido (p24/25), il determinante antigenico con cross-reattività alla p24 scoperto con antisieri eterologhi (coniglio) o anticorpi umani monoclonali.(57) Perciò, gag sta per antigeni gruppo-specifici. Ritornando al 1974, Gelderblom ed i suoi colleghi scrissero: "Mentre gli antigeni dell'involucro virale sono principalmente specifici al ceppo virale, il volume delle proteine interne del virione con peso molecolare (mw) tra 10.000d e 30.000d sono specifici del gruppo (gs) dei virus che hanno origine in una data specie animale (antigeni gs-spec.). Si scoprì che il costituente della principale proteina degli oncornavirus dei mammiferi di tipo-C (retrovirus) con un peso molecolare della portata di 30.000d, oltre all'antigene gs-spec., possedeva un determinante antigenico che è comune nei virus del tipo-C di molte specie mammifere comprese le scimmie e fu perciò denominato antigene dell'interspecie gs (gs-interspec.).(58) Nel 1989 William Blattner, un esperto di HIV/AIDS, affermò: "Può essere fattibile usare sonde di antigeni virali per cercare anticorpi a cross-reattività, poiché certe proteine virali, in particolare le proteine della polimerasi e gag sono altamente conservabili tra le sottospecie di virus".(59) Perciò, anche se la p24 fosse specifica ai retrovirus, non può essere specifica all'HIV.

Se la p24 mantenuta in supernatanti da coltura è un componente di particelle simili, virali o non virali, nei gradienti di densità si dovrebbero quindi trovare tutte le p24 almeno in una banda (frazione), anche se non ad una densità di 1,16 gm/ml. Che questo non sia il caso è stato dimostrato dallo stesso Montagnier. In un esperimento Montagnier ed i suoi colleghi hanno diviso il gradiente di densità in sedici frazioni. Il valore massimo dell'RT fu riscontrato nelle frazioni cinque e sei, mentre la p24 e la gp110 erano presenti in tutte tranne tre (1,2,3) frazioni. 28

5.7 Il ruolo dell'actina e della miosina nella formazione della particella.

Non vi è alcuna ragione scientifica per definire che una proteina presente in una cellula, supernatante di coltura, o anche separazione in bande materiali a 1,16 gm/ml in gradienti di densità con sucrosio, è retrovirale basandosi sul fatto che reagisce con gli anticorpi in sieri di pazienti AIDS, come hanno fatto Montagnier ed il gruppo di Gallo. Secondo Gelderblom, i sieri di pazienti AIDS sono "polispecifici"(60,61) ed attualmente si è ampiamente dimostrato che questi sieri reagiscono ad una pleora di antigeni self e non-self compresi le proteine ed i linfociti "non-infettati". Perché non dovrebbero pertanto reagire alle "proteine dell'HIV", anche se tali proteine sono proteine cellulari, oppure ad una varietà di antigeni ricombinanti o sintetici? Se le proteine nelle colture/co-culture di tessuti derivati da pazienti AIDS e che reagiscono con i sieri di pazienti AIDS sono davvero retrovirali, quindi che cosa sono le proteine nelle cellule e nei supernatanti "non-infettati" che Montagnier ha detto ripetutamente che reagiscono anche con i sieri di pazienti AIDS? Sulla base della reattività ai sieri dei pazienti AIDS, solo il 20% delle proteine che si associano a 1,16 gm/ml possono essere considerate "proteine dell'HIV" e, come affermano gli esperti HIV/AIDS, senza averne la prova, vengono codificate dal "DNA dell'HIV".(47,62) Anche se ci fosse la prova che particelle pure (isolate) dell'"HIV" sono presenti a 1,16 gm/ml, allora tutte le proteine che si associano a 1,16 gm/ml dovrebbero essere incorporate in tali particelle. Tuttavia, poiché solo il 20% di queste proteine sono proteine dell'"HIV", sorge il seguente interrogativo, qual'è l'origine ed il ruolo del restante 80% delle proteine in tali proteine e da quali geni sono codificati? Perché sono solo il 20% delle proteine virali e non-cellulari? Perché non tutte e viceversa?

Se la proteina gp41 presente nella banda del Western blot e che reagisce con i sieri dei pazienti AIDS potrebbe essere l'actina della proteina onnipresente, perché non si dovrebbe dunque considerare la proteina p24 una delle "catene leggere della miosina, un'altra proteina ugualmente onnipresente, dato che in particolar modo:

(a) Matsiota, Montagnier ed i loro colleghi all'Istituto Pasteur hanno dimostrato che i pazienti AIDS e quelli a rischio hanno alti livelli di anticorpi a questa proteina;(63)

(b) attualmente esiste ampia prova che la pleora delle proteine cellulari (la beta-2 microglobulina, le catene alfa e beta dell'antigene dei linfociti umani (HLA) DR, CD71, CD63,CD43, CD8, "i principali ricettori di aderenza dei leucociti LFA-1 (CD11A/CD18) e CD44) che sono presenti nelle particelle dell' HIV", includono l'actina e la miosina.(64-68) Infatti, negli ultimissimi anni ricercatori provenienti da numerose istituzioni espressero il punto di vista per cui la polimerizzazione dell'actina (o interazione dell'actina/miosina) "funge da intermediario nell'innesto" e nella liberazione dell'HIV. Ricercatori di New York e Filadelfia trovarono che il trattamento con colchicina delle cellule "MOLT4/HIV-1IIIB", "induceva la polarizzazione dei linfociti, la ridistribuzione dell'actina-F all'interno di uno pseudopodo e la secrezione dell'HIV dallo pseudopodo" e che si "osservavano le particelle esclusivamente sull'apice dello pseudopodo".(65) Due degli studi che hanno esaminato il ruolo dell'actina e della miosina nell'innesto e rilascio delle "particelle dell'HIV" sono di ricercatori provenienti dal Giappone. In una pubblicazione gli autori concludevano: "Dal momento che l'actina-F è essenziale per il mantenimento della forma della cellula della funzione cellulare, la polarizzazione dell'actina-F potrebbe cambiare la

configurazione della membrana cellulare o la fragilità cellulare, che può essere essenziale per la liberazione dell'HIV". In un altro studio gli autori "hanno dimostrato che la miosina e l'actina sono collocate nel punto di innesto delle particelle virali. In particolare la miosina era concentrata sulla stessa area della membrana del citoplasma come le macchie dense delle particelle virali. In contrasto, l'actina era ampiamente distribuita sulla membrana del plasma e si trovava sempre nelle aree in cui erano presenti particelle virali". Concludevano: "l'actina potrebbe partecipare con la miosina ad un processo attivo che porta alla liberazione delle particelle virali dalla membrana". Dal momento che questi ricercatori, come molti altri, sono dell'opinione che l'inizio dell'interazione di una miosina-actina richieda un aumento di calcio libero intracellulare", hanno condotto un esperimento preliminare usando due chelanti del calcio, uno il BAPTA che ritengono chelare solo calcio intracellulare libero e l'altro, l'EGTA, che secondo il loro punto di vista chela solamente il calcio libero sulla parte esterna della cellula. Hanno scoperto che "la liberazione dell'HIV-1 si sospendeva in modo più pronunciato quando sia" il calcio interno che quello esterno veniva chelato, e che l'inibizione era più forte con il chelante esterno che con quello interno. "In base a questi risultati, possiamo supporre che il [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> potrebbe entrare nella cellula per mezzo della stimolazione dell'innesto virale stesso al punto di innesto... può essere difficile trovare un aumento del [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>...poiché il meccanismo di innesto procede in modo continuo e lento in una regione molto ristretta senza alcuna sincronizzazione".64

Attualmente esiste inoltre la prova che:

(a) vi è un'associazione tra la ridistribuzione dell'actina polimerizzata, la miosina ed altre proteine cellulari (glicoproteine) e molti processi cellulari compreso l'innesto non legato alla liberazione dell'HIV;(69-73)

(b) la polimerizzazione dell'actina, l'interazione dell'actina-miosina ed il legame reciproco tra i polimeri in generale è regolata dallo stato redox, causa dell'ossidazione che porta all'interazione;(74-76)

(c) sia i pazienti AIDS che le colture provenienti da pazienti AIDS sono alfasoggette ad agenti ossidanti. Infatti, per trovare proteine e particelle dell'"HIV", le colture delle cellule devono essere stimolate (trattate con agenti antiossidanti).(77) Dieci anni fa Montagnier ha scritto: "Pertanto, l'infezione LAV delle cellule T4 in stato di quiete non porta alla riproduzione virale o all'espressione dell'antigene virale sulla superficie cellulare, mentre risulta una stimolazione tramite le lecitine delle cellule stesse nella produzione di particelle virali, espressione antigenica e nell'effetto citopatico.(78)

(d) in presenza di autossidanti non si può osservare alcun fenomeno "HIV".(77,79,80) In uno studio presentato alla Conferenza Internazionale sull'AIDS di quest'anno, alcuni ricercatori di Roma riferivano quanto segue: "I risultati ottenuti impiegando i 3-ABA, i NAC [antiossidanti] ed un trattamento combinato di 3-ABA/NAC insieme sembrano confermare il ruolo di compensazione redox intracellulare nella modulazione della manifestazione dell'HIV. Si è infatti osservata una riduzione significativa nel numero delle particelle virali in colture che hanno ricevuto il trattamento combinato con il NAC/ABA".(81)

In riferimento ai dati sopracitati, non può essere che qualcuno sia tentato di pensare che le particelle e le proteine dell'"HIV" non sono niente di più che "materiale del tutto non-virale", indotte dagli agenti ai quali i pazienti e le colture AIDS sono esposte?

CONCLUSIONE-- La dichiarazione "gli anticorpi contro lo standard globale del ceppo virale dell'HIV di Montagnier di tutti i "test dell'HIV", presuppone la prova di:

(a) l'esistenza di più di un "ceppo virale dell' HIV", compreso uno di Montagnier. Si può ottenere tale prova solo con l'isolamento del retrovirus: Tuttavia, la prova di Montagnier non dimostra l'isolamento di un retrovirus;

(b) l'esistenza delle proteine immunogene specifiche dell'"HIV". Ancora, tale prova si può ottenere solo con l'isolamento del retrovirus;

(c) gli anticorpi specificamente indotti dall'infezione da HIV. E' vero che per scoprire tali anticorpi non c'è bisogno di usare l'HIV o le proteine immunogeniche dell'HIV. Per esempio, i test sierologici sia per la mononucleosi infetta che per la sifilide impiegano antigeni derivati rispettivamente da cellule di sangue rosso di cavallo o cuore di bue, ma ciò nonostante segnalano un'infezione del virus Epstein-Barr e *Treponema pallidum*. Tuttavia, il solo modo per provare che gli anticorpi all'HIV sono diretti contro l'"HIV", cioè, il solo modo per usare il test degli anticorpi per provare l'infezione all'HIV, è quello di presentare la prova che dimostri che gli anticorpi sono specifici dell'HIV. Tale prova si può ottenere solo usando l'isolamento dell'HIV come uno standard aureo: Fino a che non si fa questo, non è possibile affermare che "lo standard globale di tutti i "test dell'HIV"" è la prova dell'infezione da HIV.

## 6. "IL DNA DELL'HIV"

Nel discutere la prova dell'esistenza di un unico agente retrovirale esogeno non si può adottare come premessa iniziale ("DNA dell'HIV-1 e HIV-2 a piena lunghezza...") il fatto che ciò dipenda dalla prova dell'argomento (ragionamento) ("ergo... l'HIV esiste ed è stato isolato"). La designazione a priori di un particolare frammento del DNA come "DNA dell'HIV" prende semplicemente per certa la questione in esame.

### 6.1 LA PROVA MINIMA RICHIESTA PER DIMOSTRARE L'ESISTENZA DEL DNA DELL'HIV

Se "il DNA dell'HIV" è il genoma di un'unica particella retrovirale, il requisito fondamentale è quindi prova dell'esistenza di un'unica entità molecolare "il DNA dell'HIV", cioè, frammenti unici del DNA identici sia nella composizione che nella lunghezza in tutti gli individui infettati. L'affermazione che uno segmento dell'RNA (cDNA) è un'unica entità molecolare che costituisce il genoma di un unico retrovirus può essere accettata se, e solo se, si dimostra che l'RNA appartiene ad una particella con caratteristiche morfologiche, fisiche e riproduttive di una particella retrovirale. La prova di tali proprietà si può ottenere solo isolando le particelle virali putative, cioè, ottenendole separate da qualsiasi altra cosa, estraendo gli acidi nucleici e dimostrando che tali particelle sono identiche (i loro costituenti, compreso i loro acidi nucleici sono identici) ed infette. Le corrette procedure ora, essendo state usate per oltre mezzo secolo per ottenere questa prova, richiedono la dimostrazione di quanto segue:

1. Nelle colture di cellule "infettate" (co-culture) ci siano particelle con un diametro di 100-120nm contenenti "corpi interni condensati (nuclei)" e superfici "tempestate" di protuberanze;<sup>82</sup>
2. In gradienti di densità con sucrosio le particelle si associno ad una densità di 1,16 gm/ml;
3. Alla densità di 1,16 gm/ml queste non siano altro che particelle con le caratteristiche morfologiche delle particelle retrovirali;
4. Le particelle contengano solo RNA e non DNA e che l'RNA abbia regolarmente la stessa lunghezza (numero di base) e composizione, non importa quante volte venga ripetuto l'esperimento;
5. Quando le particelle vengano introdotte in colture secondarie, ma stando attenti al caveat critico descritto qui di seguito;

- (a) le particelle vengano prelevate dalle cellule;
- (b) l'intero DNA venga sottoposto a trascrizione inversa nel

cDNA;

- (c) l'intero cDNA venga inserito nel DNA cellulare;
- (d) il DNA venga trascritto nell'RNA che si trasforma in proteine;

6. Come risultato di 5 le cellule nelle colture secondarie liberino particelle nell'ambiente di coltura;

7. Le particelle rilasciate nelle colture secondarie abbiano esattamente le stesse caratteristiche delle particelle originali, cioè devono avere morfologia identica, associazione a 1,16 gm/ml e contenere lo stesso RNA e le proteine.

Il "caveat" (dimostrazione) è che mentre l'introduzione della maggior parte delle particelle infette nelle colture cellulari e il successivo rilascio di particelle simili è la prova che tali particelle sono veramente infette, questo non è sufficiente per i retrovirus. La base di questa eccezione è il fatto che "uno dei fattori più singolari che distingue i retrovirus da tutti gli altri virus animali è la presenza nei cromosomi di cellule normali non infettate, di genomi con quelli di virus infetti."<sup>(83)</sup> infatti una cellula può contenere il genoma di molti retrovirus. Ritornando al 1975 alcuni retrovirologi hanno riconosciuto che "il fallimento nell'isolare virus endogeni da certe specie può riflettere le limitazioni delle tecniche nella coltivazione in vitro".<sup>(84)</sup> In altre parole la scoperta di un retrovirus nelle colture/co-culture "infettate" sia primarie che secondarie non è la prova che le cellule siano state infettate da un retrovirus esogeno.

Un modo che fa pensare, ma non prova che le cellule abbiano acquisito il virus dall'esterno (retrovirus acquisito in modo esogeno, retrovirus infetto) e che non abbiano incorporato un retrovirus da dati già esistenti nelle cellule normali (retrovirus endogeno), è quello di condurre esperimenti che usino controlli, cioè, di procedere in parallelo con le colture/co-culture di controllo delle colture/co-culture da test. La sola differenza fra il test e le colture di controllo dovrebbe essere l'introduzione di particelle nelle colture da test. In altre parole, introduzione delle particelle a parte, in ogni altro controllo attinente, le colture devono essere condotte in modo identico.

Per esempio:

(a) poiché la scoperta delle sequenze genetiche retrovirali e dell'RT e del rilascio di particelle retrovirali dipende dallo stato metabolico delle cellule, lo stato fisiologico delle cellule usate nelle colture di controllo dovrebbe essere il più somigliante possibile a quello dei pazienti AIDS;

(b) poiché il mero atto della co-coltivazione da solo può portare alla liberazione di particelle retrovirali endogene, se le cellule sono co-coltivate, così dovrebbero esserlo le cellule usate negli esperimenti di controllo;<sup>(85)</sup>

(c) , gli estratti, anche da normali cellule non stimolate, quando aggiunti alle colture possono aumentare l'espressione retrovirale endogena.<sup>(86)</sup>

A causa di ciò, quando le cellule vengono coltivate con l'"HIV" (sopranante o materiale che si associa a 1,16 gm/ml), i controlli devono essere coltivati con materiale analogo da colture cellulari che hanno origine da individui colpiti da malattie simili all'AIDS, cioè, individui affini che siano immunodepressi;

(d) si può accelerare la comparsa del retrovirus endogeno ed aumentare la produzione di un milione di volte stimolando le colture con mitogeni, 87 mutageni, carcinogeni chimici e radiazioni.<sup>(88,89)</sup> Se le colture da test vengono esposte a oppure utilizzano tali agenti, così dovrebbero esserlo i controlli;

(e) dal momento che i pazienti AIDS e quelli a rischio di sviluppare la sindrome vengono esposti a forti agenti ossidanti, <sup>(79,90)</sup> anche le cellule di controllo dovrebbero avere origine da tali pazienti;

(g) per evitare il preconcetto dell'osservatore e nel miglior interesse della scienza, si dovrebbero eseguire esami in cieco delle colture/co-culture (test e controllo).

### 6.2 LA PROVA DELL'ESISTENZA DEL "DNA DELL'HIV"

6.2.1 Nel 1984, nel primo di due saggi, Montagnier ed i suoi colleghi hanno descritto i seguenti esperimenti: "Poiché il LAV può provocare la fusione della cellula-T e poiché l'EBV [virus Epstein Barr] si sa avere un'attività di fusione nelle cellule B, abbiamo eseguito esperimenti da co-infezione di linfociti non frazionati (B e T) con entrambi i virus. Si sperava che si sarebbero formati degli ibridi permanenti delle cellule T infettate dal LAV e le cellule B trasformate dall'EBV e che tali ibridi sarebbero stati in grado di produrre il LAV in modo continuo. Si sono provati diversi regimi. Quello che ha dato origine ad una produzione continua dell'infezione da LAV era il seguente. Tutti i linfociti di F.R. furono dapprima stimolati per 24 ore con la Proteina A e quindi infettati con un ceppo virale di EBV, l'M81, derivato da un carcinoma nasofaringeo. Cinque giorni più tardi, la metà di questa coltura era infettata dal LAV come descritto (1) e quindi divisa in due subcolture: una era messa in mezzo di coltura in cui mancava il fattore di crescita delle cellule T (TCGF: interleukina-2), l'altra in un mezzo contenente TCGF. Come ci si aspettava, la coltura alimentata con TCGF produsse il LAV come rivelato da un icco di attività RT che apparve tra i 12 giorni (6 giorni dopo l'infezione da LAV) e i 21 giorni nel soprannatante. Al contrario, le cellule messe a coltura in assenza del TCGF non producevano alcuna RT rilevabile. Al 19° giorno, nel momento del calo della produzione del LAV, una subcoltura delle cellule alimentate dal TCGF ricevettero cellule T fresche dallo stesso donatore: queste cellule T erano state attivate per 3 giorni con fitoemoagglutinina (PHA) ...Sei giorni dopo (25° giorno) apparve un nuovo massimo di RT, ma al contrario della prima infezione, si potevano vedere chiaramente in questa coltura delle grandi cellule rotonde trasformate dall'EBV, come pure nella coltura di controllo non infettata dal LAV, il che indicava che era già avvenuta l'immortalizzazione delle cellule B dall'EBV. La linea delle cellule B immortalate fu chiamata RF8" (29) [Il riferimento 1 al quale Montagnier si riferisce è il saggio del 1983 in cui Montagnier et al. descrivevano il primo "isolamento" dell'HIV (vedi 5)].

Nel secondo studio, vennero associati in gradienti di densità con sucrosio 200ml di soprannatante da cellule FR8 "infettate dall'HIV", "Si raggrupparono e centrifugarono frazioni contenenti il virus. Non è stato stabilito come gli stessi determinarono l'esistenza del virus, in quale banda (bande) (frazione/frazioni) si trovò il "virus", quali bande, se ce ne furono, si trovarono avere delle particelle, oppure perché ci fu più di una banda (1,16gm/ml) che conteneva il "virus". Il concentrato (pellet) venne messo in incubazione con molte sostanze, le dATP, dGTP, dTTP, dCTP compresa la 32dCTP ed un innesco oligo(dT). Dai cDNA così ottenuti vennero inoltre definiti tre cloni "il pLAV13, il 75 e l'82, che portavano inserti rispettivamente di 2,5, 0,6 e 0,8 kilobasi (kb). Tutti i tre inserti hanno un pattern di restrizione comune ad un'estremità, il che indica un'area comune di innesco. "Il frammento comune HindIII-PstI di 50 coppie di basi (bp) fu messo in sequenza e dimostrò contenere un segmento dell'oligo (dA) che precedeva la coda della clonazione (dC). I cloni sono perciò le copie dell'estremità di 3' di un poli(A) RNA. La specificità della pLAV13 venne stabilita in una serie di esperimenti di ibridizzazione-filtro usando come sonda un inserto tradotto di pLAV13 (nick-translated pLAV13 insert as a probe)." Per prima cosa, "impiegando una tecnica di spot-blot adattato", testarono il pellet ottenuto dal soprannatante dei linfociti normali "infettati dal LAV" e le cellule LEM come pure linfociti non infettati. I pellets "infettati" erano positivi e quelli non infettati negativi. Secondo, la sonda individuò il DNA nei Southern blot dei linfociti T infettati dal LAV e delle cellule CEM. Non si scoprì alcuna ibridizzazione nel DNA da linfociti non infettati o da fegato normale". Non viene fornito alcun dettaglio riguardante il metodo usato per produrre l'"infezione", ma sembrerebbe che le cellule normali e le cellule CEM siano state messe a coltura con il soprannatante da cellule dell'FR8, cioè lo stesso soprannatante che hanno usato per ottenere la sonda! Gli stessi concludevano: "Insieme, questi dati mostrano che il DNA della pLAV13 del LAV è esogeno al genoma umano e scopre le somiglianze sia dell'RNA che del DNA integrato, derivato dalle cellule infettate dal LAV. Pertanto, la pLAV13 è specifica al LAV".(91)

6.2.2 Nel Maggio del 1984, Gallo ed i suoi colleghi pubblicarono quattro saggi. Per "isolare" l'HIV usarono una linea di cellule leucemiche che chiamarono HT. Non è possibile sapere con quali tessuti da pazienti AIDS sia stata messa a coltura questa linea cellulare. Leggendo gli scritti del Maggio 1984 si ha l'impressione che la linea cellulare HT sia stata messa a coltura con fluidi concentrati (sopranatante) che avevano origine da colture individuali, di pazienti AIDS, cellule-T stimolate. A seguito di un'indagine su Gallo si trovò che la linea cellulare HT veniva messa a coltura con fluidi concentrati riuniti inizialmente da colture individuali di tre pazienti ed ultimamente da colture individuali di dieci pazienti, (92) L'indagine su Gallo trovò che questa procedura era "di dubbio rigore scientifico". Uno scienziato descrisse questo procedimento come "veramente folle".(93) Nel 1985 Gallo ed i suoi colleghi scrissero, "La linea cellulare dell'H9/HTLV-IIIB era derivata dalla linea umana HT di cellule-T, seguendo co-colture con linfociti T ottenuti da numerosi pazienti AIDS, e contiene molte forme diverse di HTLV-III".(94)

La scoperta della trascrizione inversa dell'A(n).dT15 nel soprannatante, fu considerata la prova che le cellule HT venivano infettate da un retrovirus, l'HIV, che aveva origine dai tessuti dei pazienti. Si otteneva un clone, l'H9 della linea cellulare HT "usando sangue irradiato di un donatore sano come alimentatore".(21) Le cellule H9 venivano messe a coltura con soprannatante da cellule HT infettate dall'"HIV". Il soprannatante H9 veniva associato in gradienti di densità con sucrosio ed il materiale che si associava a 1,16 gm/ml che, senza prove, Gallo ed i suoi colleghi ritenevano essere sinonimo di particelle retrovirali, veniva "lisato con sodio dodecyl solfato(SDS), assimilato con proteinasi K, e direttamente cromatografato su una colonna di oligo(dt) cellulosa. Il risultante polyadenylate l'RNA contenente il [poli(A)] veniva usato come template per sintetizzare il DNA complementare codificato-32P (cDNA) in presenza di primers oligo(dT). La dimensione del cDNA risultante variava da 0,1 a 10 kb. Quando questi DNA codificati venivano ibridizzati all'RNA contenente-poli(A) purificato da cellule infettate [cioè, cellule messe a coltura con gli stessi soprannatanti dai quali si otteneva la sonda] e cellule non infettate dall'H9 come pure altre linee cellulari umane non infettate, solo le cellule infettate H9 contenevano sequenze omologhe dell'RNA come dimostrato da bande distinte dell'RNA dopo l'ibridizzazione Northern. La figura 1 mostra che le preparazioni del cDNA da HTLV-IIIB e HTLV-IIIZ davano campioni identici, scoprendo specie di circa 9,0, 4,2 e 2,0 kb... Queste bande sono simili in dimensione a quelle corrispondenti alla dimensione genomica dell'RNA messaggero (mRNA) e degli RNA messaggeri di env ed alle sequenze pX precedentemente osservate nelle cellule infettate con l'HTLV-I, compatibili con la anticipata parentela di questi virus. Inoltre, venivano scoperte con una sonda del cDNA dell'HTLV-III bande virali del cDNA delle cellule infettate da HTLV-II ed ancora le dimensioni del loro mRNA erano come quelle dall'HTLV-I!"(56)

In un altro studio di Gallo e colleghi, il DNA extracromosomico di cellule "infettate" H9 veniva estratto e "analizzato per il suo contenuto di DNA virale non integrato" usando il cDNA codificato-32P come una sonda virale. Si scoprì dapprima il DNA virale lineare non integrato dopo 10 ore [di "infezione"] ed era inoltre presente nei tempi successivi. La figura 1 mostra un Southern blot della campionatura di 15 ore. Una banda di circa 10 kilobasi (kb) nel DNA non digerito rappresenta la forma lineare dell' HTLV-III non integrato". Ancora in un altro studio Gallo ed i suoi colleghi riferivano che: "Poiché si trovò che al provirus dell'HTLV-III mancavano i siti di restrizione dell'Xba I, si costruì una libreria genomica usando il DNA dell'H9/HTLV-III Xba I-assimilato, e questo venne esaminato con una sonda di cDNA dell'HTLV-III per ottenere cloni molecolari del provirus integrato di lunghezza massima con sequenze cellulari laterali. Di tali cloni ne furono ottenuti quattordici da una libreria arricchita di 106 fagi ricombinanti, e due di questi erano caratterizzati e purificati da placca batterica. La figura 1 illustra le \*appe di restrizione di questi due cloni, denominati lamdaHXB-2 e

lamdaHXB-3. L'intera lunghezza del provirus HTLV-III è approssimativamente di 10 chilobasi... Per stabilire se il genoma dell'HTLV-III contiene sequenze omologhe al normale DNA umano, l'inserito virale dell'lamdaXB-3... è stato isolato, tradotto e usato per sondare il DNA cellulare infettato e non infettato dall'HTLV-III. In condizioni standard di ibridizzazione ... questa sonda \*si è ibridizzata al DNA\* dalle cellule dell'H9/HTLV-III, come pure da altre cellule infettate dall'HTLV-III, ma non al DNA da cellule non infettate H9, cellule non infettate HT (la linea di origine dalla quale è stato clonato l'H9), o i normali tessuti umani (dati non dimostrati). Questa scoperta si accorda con i risultati di altri esperimenti nei quali la forma non integrata (intermedio replicativo) dell'HTLV-III era usata come sonda e dimostra che l'HTLV-III è un retrovirus esogeno mancante di sequenze di acido nucleico derivate dal DNA umano".(96)

6.2.3 Nel 1984, Levy ed i suoi colleghi misero a coltura il PBMC da paziente sofferente di sarcoma di Kaposi con l'IL2, il polibrene e la PHA. Si testò il soprannatante per l'RT, le cellule per la reazione con siero da paziente BRU dell'Istituto Pasteur e "furono esaminate dal microscopio elettronico alcune colture virali". La scoperta di un risultato positivo in "ciascuno di questi test" fu considerata la prova dell'isolamento del virus. Il soprannatante da una di queste colture fu "inoculato nel PMC umano fresco, stimolato 3 giorni prima con fitoemagglutina. Entro sei giorni il soprannatante di questa coltura aveva un'alta attività di RT e si disse che ciò rappresentava "l'isolato virale ARV-2".(97) La linea cellulare HUT78 fu messa a coltura con l'ARV78 "La produzione del virus veniva monitorata misurando l'attività di transcriptasi inversa". Quando c'era un'attività massima dell'RT, il supernatante veniva centrifugato ed il pellet risospeso, dopo il trattamento con la DNAasi, veniva centrifugato in gradienti di densità con sucrosio. L'acido nucleico da ciascuna frazione veniva sottoposto a elettroforesi su gel di agarosio. Lo strato del gel contenente una "specie di RNA di circa 9 kb veniva asportata e dosata per ottenere "una sonda radioattiva del cDNA". Il Dna dalla linea cellulare HUT78 messa a coltura con l'ARV-2" veniva assimilata con enzimi di restrizione, sottoposti ad elettroforesi in agarosio gel e al Southern blot usando la "sonda radioattiva del cDNA". Non si scoprì nessuna banda specifica nei diversi frammenti del DNA da cellule non infettate ... mentre si osservarono bande nelle cellule infettate... il DNA non assimilato da cellule infettate conteneva una specie a 5,5 kb, una specie debole a 6 kb ed una banda marcata al limite di esclusione del gel (>15 kb). Sugeriamo che le specie del DNA da 5,5 kb e 6kb rappresentino il DNA virale non integrato nella configurazione circolare contenente rispettivamente una o due lunghe ripetizioni terminali (LTR); l'ampia banda superiore (>15kb) rappresenta il provirus integrato nel DNA delle cellule ospiti". In un esperimento addizionale "il DNA cellulare completo da cellule infettate dall'ARV-2 veniva parzialmente assimilato con l'ECORI; il DNA cellulare di 9-15 kb veniva clonato in un vettore batteriografico EMBL-4 lamda e un fago ricombinante vennero identificati con la sonda del cDNA specifico al virus". In mezzo ai fagi ricombinanti ottenuti vi erano lamda-9B e lamda-7A, ciascuno dei quali era di 9,5 kb.(98)

#### 6.2.4 RIASSUNTO E DISCUSSIONE

E' ovvio che sebbene Montagnier, Gallo e Levy ed i loro rispettivi colleghi si riferiscano alla purificazione o all'isolamento delle particelle dei virioni o dei virus, nessuno di questi gruppi ha presentato la prova dell'isolamento di particelle retrovirali o anche dell'isolamento di particelle di tipo virale, il primo ed assolutamente necessario passo per provare l'esistenza del genoma retrovirale. Al tempo in cui scrivo, non lo ha fatto nessun altro gruppo di ricercatori HIV/AIDS. Trovare qualche RNA che si associa a 1,16 gm/ml, estrarre dallo stesso una frazione ricca di poli (A), oppure un frammento di una data lunghezza, anche se si trova che è della stessa lunghezza e sequenza, e riferirsi ad esso come all' HTLV-III, LAV, ARV non costituisce tale prova. Si deve sottolineare che anche se l'RNA viene incorporato in una particella che con gradienti di densità con sucrosio si

associa a 1,16 gm/ml, non è ancora la prova che si tratti di RNA retrovirale. Secondo John Coffin, uno degli esperti più noti di genoma retrovirale, vi sono particelle "con un complemento pieno di proteine virali, ma le particelle contengono un gruppo di RNA cellulari e solo circa l'1% RNA genomico ... per l'insieme di particelle non è necessario il genoma ... in sua assenza si possono sostituire altre molecole dell'RNA.(83) E' importante notare che sebbene tutti i gruppi, di Montagnier, di Gallo e di Levy facciano riferimento al materiale da soprannatanti di coltura che in gradienti di densità con sucrosio si associano a 1,16 gm/ml come particelle virali, virioni, ed all'RNA ed alle proteine a quella densità come a RNA o proteine "collegate alle particelle", nessuno dei gruppi ha presentato la prova dell'esistenza a tale densità di qualsiasi particella, del tipo retrovirale od altro, pura (isolata) od altro. Al contrario detti ricercatori hanno messo a coltura linfociti da pazienti AIDS e li hanno stimolati (attivati) con una grande varietà di agenti. La trascrizione inversa dell'A(n).dT15 nel soprannatante da coltura era considerata prova di infezione da retrovirus oppure anche prova di isolamento. Soprannatanti da dette colture vennero introdotti nelle colture di linee cellulari leucemiche o trasformate.

Con i soprannatanti da dette colture gli stessi svolsero due tipi di esperimenti: (a) I soprannatanti vennero associati in gradienti di densità con sucrosio. All'associazione di 1,16 gm/ml (e talvolta ad un'altra banda (bande), almeno negli esperimenti del gruppo di Montagnier, ciò non è stato reso chiaro) trovarono frammenti dell'RNA di una certa lunghezza (sebbene a due a due non avessero la stessa lunghezza) o erano ricchi di adenina, (frammenti ricchi di poli(A)), e chiamarono gli stessi "RNA dell'HIV", il "genoma dell'HIV". Usando un primer (dT) l'"RNA dell'HIV" veniva trascritto in un DNA complementare (cDNA);

(b) I soprannatanti vennero introdotti in un altro set delle linee cellulari trasformate o leucemiche come pure in colture stimolate di normali cellule-T. Il DNA proveniente da queste cellule, come pure il DNA dalle colture alle quali non veniva aggiunto alcun soprannatante, vennero ibridizzate usando sonde dal cDNA. Si ottennero risultati positivi solo con il DNA da cellule alle quali venivano aggiunti i soprannatanti. Questa dimostrazione venne interpretata come prova che il "DNA dell'HIV", il retrovirus, aveva origine dai pazienti AIDS e che tali pazienti lo acquisivano effettivamente dall'esterno, cioè il retrovirus era esogeno.

Ci sono molti problemi legati a questi esperimenti ed alla loro interpretazione. Tra i molti interrogativi che la loro conclusione fa sorgere, i più ovvii sono i seguenti:

1: Si dice che l'HIV è un retrovirus ed i retrovirus sono particelle che contengono tra le altre cose, l'RNA. Com'è quindi possibile asserire che l'RNA che si associa a 1,16 gm/ml, "l'RNA dell'HIV", è il genoma di un retrovirus senza dimostrare che è un costituente di una particella, virale o non virale che si associa a tale densità?

2. L'RT non è specifico al retrovirus ed infatti l'A(n).dT15 può essere trascritto all'inverso da tutte le polimerasi del DNA alfa, beta e gamma. E' quindi possibile considerare la trascrizione inversa dell'A(n).dT15 come prova di isolamento dell'HIV od anche scoperta di un retrovirus? Anche se il processo di trascrizione inversa è specifico ai retrovirus, può la scoperta di un processo essere considerata prova dell'isolamento di un oggetto, in questo caso, di particelle retrovirali?

3. I soprannatanti da colture di cellule conteranno sia il DNA che l'RNA compresi alcuni racchiusi in scorie cellulari (frammenti) specialmente se la viabilità cellulare non è al cento per cento come nel caso delle colture usate dai tre gruppi. Gli RNA possono comprendere l'RNA messaggero (che è ricco di adenina), come pure RNA nucleico eterogeneo con peso molecolare elevato. Questi RNA, oltre ad avere un peso molecolare elevato ed eterogeneità nella dimensione, hanno anche il poli(A), con il poli(A) attaccato alla estremità di 3'della molecola, e può essere RNAasi resistente. L'actinomomicina inibisce la sua sintesi ed interferisce anche con la sua particolare trasformazione e scomposizione. Dalla virologia animale si sa

inoltre che l'RNA non retrovirale ed anche il DNA si associa a 1,16 gm/ml.(100). Com'è dunque possibile asserire che solo perché un RNA si associa a 1,16 gm/ml ed è ricco di adenina, oppure ha una data lunghezza, è "RNA dell'HIV"? Se questo RNA è un "RNA dell'HIV", che cos'è dunque l'altro RNA ed il DNA che si associa pure a questa particolare densità? Se questi ultimi sono cellulari perché non lo è anche l'RNA del poli(A)?

4. Per definizione, i retrovirus sono particelle infette che contengono solo RNA. Quando entrano in una cellula l'RNA viene inversamente trascritto nel DNA, che viene quindi integrato nel DNA cellulare come un provirus, il che significa che il "DNA dell'HIV" sarà presente solo nella cellula ed in nessun'altra parte. Eppure molti esperti di HIV compreso Gallo hanno dimostrato che sia i sopranatanti di colture cellulari "infettate che le "particelle dell'HIV", cioè la materia che si associa a 1,16 gm/ml, contengono "DNA dell'HIV" che "può integrarsi direttamente nel DNA cromosomico dell'ospite".(101-102) Sorge quindi il seguente interrogativo: è il "DNA dell'HIV" il risultato della trascrizione inversa dell'"RNA dell'HIV" o lo è viceversa?

5. Si accetta il fatto che l'RNA dell'HIV sia localizzato in un nucleo circondato da un "involucro lipidico-bistratificato derivato da una membrana cellulare della cellula ospite ricca di gp120 viralmente codificata ed una proteina myristylata, p17. La cosiddetta connessione nucleo-involucro (CEL) unisce il nucleo all'involucro". Uno dei fatti più conosciuti in biologia è che il nucleo condensato (cromatina) è trascrizionalmente inattivo. Questa è una delle ragioni per cui i virus, compresi i retrovirus, per moltiplicarsi, devono entrare nelle cellule in cui la loro cromatina è decondensata. Tuttavia in uno scritto pubblicato nel 1993 da Hui Zhang e colleghi, compreso Poiesz, dal Suny Health Science Center di Syracuse, New York, si diceva:"Abbiamo dimostrato che in assenza di detergente, una grande quantità di DNA virale resistente alla DNAasi può essere sintetizzata dentro virioni di HIV-1 intatto, il che indica che questo fenomeno non dipende dalla perturbazione dell'involucro virale [per non parlare della decondensazione della cromatina]. La sintesi del DNA virale nascente avveniva in virioni purificati incubati a 37=F8 in fluidi fisiologici umani privi di cellule compreso il plasma seminale, il latte materno ed i fluidi fecali".(103)

Ciò significa che o (i) i "virioni dell'HIV-1 intatto" svolgono una funzione che nessun altro sistema biologico con cromatina molto condensata e protetta può svolgere oppure (ii) l'"RNA dell'HIV" trovato nei sopranatanti o nei "virioni purificati" è presente in una forma incorporata oppure (iii) gli "RNA dell'HIV" vengono sintetizzati ex novo nelle colture cellulari (vedi 6.3.5);

6. Attualmente vi è ampia prova che qualsiasi RNA o DNA presente nel sopranatante, senza tener conto delle sue origini, specialmente quando le cellule vengono stimolate da polycationi e agenti ossidanti verrà \*assorbito\* dalle cellule (vedi 7.1). Com'è quindi possibile asserire che un segno di ibridizzazione positiva nelle cellule messe a coltura con lo stesso "DNA dell'HIV" contenente sopranatante come il sopranatante dal quale ha avuto origine la sonda del "DNA dell'HIV", ma non in altre cellule, sia la prova che il "DNA dell'HIV" è il genoma di un retrovirus esogeno?

7. Il primo passo assolutamente necessario per provare che il "DNA dell'HIV" ha origine dalle cellule dei linfociti di pazienti AIDS e di quelli a rischio, è di effettuare esperimenti di ibridizzazione usando il DNA dei loro linfociti freschi, non messi a coltura e il "DNA dell'HIV" come sonda. E' difficile capire perché né il gruppo di Montagnier e nemmeno quello di Levy non abbiano riferito di tali esperimenti. Il gruppo di Gallo lo ha fatto ed i risultati erano negativi (vedi 6.4.4.). Com'è quindi possibile asserire che il "DNA dell'HIV" sia il genoma di un retrovirus esogeno che ha origine da pazienti AIDS e di quelli a rischio?

Leggendo il saggio fondamentale sull'isolamento dell'HIV intitolato "Scoperta, Isolamento e Produzione Continua di Retrovirus Citopatici (TVL-III) da pazienti con AIDS o Pre-AIDS", si ha l'impressione che la linea cellulare leucemica HT che Gallo, Popovic ed i loro colleghi hanno usato, fosse una nuova linea cellulare e quella che loro hanno stabilito. L'indagine su Gallo ha rivelato che la linea cellulare HT(H9) è la stessa usata dal

gruppo di Levy, l'HUT78, una linea cellulare leucemica stabilita in un altro laboratorio. Tuttavia, si è ottenuta ampia prova dell'esistenza di retrovirus umani endogeni da esperimenti su cellule leucemiche e trasformate. Esiste la prova che sia i linfociti H9 che quelli B trasformati in EBV rilascino particelle di tipo retrovirale anche quando non "infettate da HIV".(104) In seguito, veniva stabilita la linea cellulare HUT78 (H9) da un paziente con "malignità di cellule mature T4", una malattia che, secondo Gallo è causata dal retrovirus endogeno, l'HTLV-I. Quindi, nel lontano 1983, proclamò di avere dimostrato che la linea cellulare HT (H9) conteneva sequenze provirali dell'HTLV.(105) Secondo alcuni ricercatori americani, i linfociti B di sangue umano periferico normale trasformati in EBV contengono trascritti relativi all'HTLV-I.(106) Poiché tutte le particelle retrovirali per definizione si associano a 1,16 gm/ml, ammesso che tutti i gruppi abbiano un retrovirus a tale densità, com'è possibile affermare che il retrovirus che ha origine dai linfociti B trasformati in EBV sia l'HIV di un nuovo retrovirus, e non uno che era già presente? Si può asserire che l'"RNA dell'HIV" e perciò le sonde ed i primer che hanno origine dallo stesso siano l'RNA ed i primer di un unico genoma retrovirale esogeno?

9. Il dogma biologico stabilisce che il DNA venga sintetizzato su un template del DNA, l'RNA su un template del DNA, e le proteine su un template dell'RNA. In altre parole, il solo modo per una cellula di acquisire nuove entità di acido nucleico è secondo loro quello di essere introdotto dall'esterno, esogeneamente da un altro tipo di cellule, da un agente infetto oppure da un acido nucleico sintetico. Se il dogma biologico è corretto allora l'"RNA dell'HIV", sia esso un'entità molecolare cellulare o virale, dovrebbe avere origine dai linfociti oppure dalle linee cellulari leucemiche di pazienti. Tuttavia, quando il "cDNA dell'HIV" venne usato come sonda, non uno dei gruppi riportò risultati positivi di ibridizzazione da una qualsiasi cellula e nemmeno dai linfociti di pazienti AIDS. Sorge quindi il seguente interrogativo, esiste un'unica entità molecolare, il "DNA dell'HIV"? Che cosa significa e da dove ha origine?

### 6.3 SPECULAZIONI SUL "DNA DELL'HIV"

Se si desidera speculare sulla natura e l'origine dell'RNA (cDNA) derivato da colture contenenti tessuti di pazienti AIDS e di quelli a rischio, e che si associa a 1,16 gm/ml, vi sono molte possibilità comprese le seguenti:

6.3.1 Sebbene ad oggi non esista tale prova, è possibile che il segmento dell'RNA, attualmente chiamato "RNA dell'HIV", sia il genoma di un retrovirus esogeno, l'HIV. Tuttavia, perché ciò venga considerata una prova, oltre a soddisfare tutti i requisiti nel 6.1, si deve dimostrare anche che:

- (i) l'unico segmento dell'RNA si può ottenere da individui particolari;
- (ii) quando si usa l'RNA (ocDNA) come sonda per testare linfociti freschi, non messi a coltura, si ottiene un test positivo solo da cellule fresche di individui che hanno anche una coltura positiva;
- (iii) che negli animali e negli uomini, il retrovirus viene trasmesso orizzontalmente (animale ad animale, persona a persona).

6.3.2 Il genoma di un retrovirus endogeno, cioè, un segmento di RNA con un template corrispondente del DNA presente nel DNA cellulare di animali non infettati e che venga trasmesso di generazione in generazione verticalmente (dai genitori alla prole tramite linea cellulare di germi) e che in presenza di certe condizioni possa manifestarsi ed incorporarsi in particelle retrovirali.

Per molti decenni si è saputo che il DNA animale contiene sequenze "strettamente legate o identiche a quelle dei virus infettivi". Tuttavia, il genoma umano veniva considerato un'eccezione e fino al 1994, sia Gallo che Fauci erano dell'opinione che "... non vi sono retrovirus endogeni umani conosciuti".(107) Infatti, negli anni 70 e 80 dopo l'asserzione di Gallo della scoperta dell'HL23V, dell'HTLV-I ed in seguito dell'HTLV-III e specialmente dopo l'asserzione di Montagnier della scoperta dell'HIV, si produsse un interesse considerevolmente maggiore nei retrovirus con il risultato che "divenne sempre più chiaro che il DNA dell'uomo come quello di altri

vertebrati, contiene molti genomi retrovirali integrati", (25), (108) e che in molti casi si manifestano i geni "compresi i trascritti dell'mRNA relativi al DNA retrovirale endogeno a piena lunghezza" (109, 110) con quadri di lettura aperta per le proteine gag, pol ed env. (111) Dal 1987, molti ricercatori riportarono la manifestazione del genoma del retrovirus endogeno umano, l'HERV-K, omologo al virus del tumore mammario del topo (MMTV). "In molte linee cellulari, il genoma dell'HERV-K si esprimeva come RNA di un poli(A)+ da 8,8 chilobasi che sembra essere il trascritto a piena lunghezza di questo genoma". Quando la linea cellulare del cancro al seno umano T47D venne "coltivata in RPMI 1640 integrato con il 10% di siero fetale di vitello, la manifestazione del genoma dell'HERV-K fu insignificante". Tuttavia, quando si trattarono le cellule con estradiolo e poi progesterone, produssero "particelle similretrovirali e proteina solubile che condivideva determinanti antigenici con il prodotto genetico dell'env dell'MMTV". (112) A sostegno della loro tesi "che un RT endogeno umano poteva mediare movimenti genetici che portavano a leucemia e cancro", ricercatori dell'Università Hahnemann, Filadelfia, compreso David Gillespie, per un lungo periodo collaboratore di Gallo, "dimostrarono la presenza di un enzima simile a trascrittasi inversa in particelle retrovirali da pazienti affetti da trombocitemia essenziale, policitemia vera, e leucemia mieloide cronica. In seguito fu dimostrato che il genoma umano contiene 50 copie di HERV-K. L'HERV-K è un elemento retrovirale endogeno umano di classe I che contiene quadri di lettura aperti di gag, pol ed env ... come pure regioni intatte di LTR... Espressioni di trascritti genomici di un RNA dell'HERV da 9 kb furono scoperte in linee cellulari umane ... Siamo stati in grado di provare per la prima volta la manifestazione del gene pol dell'HERV-K in leucociti di sangue umano. Il gene pol dell'HERV-K si è manifestato in cellule di sangue periferico da due serie di individui non-leucemici. La prima serie consisteva in sette donatori normali, mentre la seconda serie consisteva in 3 pazienti con PV e tutti manifestarono il gene pol dell'HERV-K. Quattro delle 5 diverse sequenze nucleotidiche contenevano quadri di lettura aperta eterogenei per il pol come rilevato dalla protezione sia dell'RT-PCR che della RNAasi. A differenza dei donatori normali che manifestano raramente i provirus dell'HERV-K, le analisi del pol dell'HERV-K da pazienti PV mostrava un'espressione selettiva di una famiglia ristretta di relativi provirus". (113) Nel 1995, Gallo ha ammesso che la cellula umana contiene genomi retrovirali, ma ha anche insistito sul fatto che sono difettosi, "I retrovirus vengono trasmessi o geneticamente (forme endogene) oppure come agenti infettivi (forme esogene). Allo stesso modo delle altre specie animali, gli uomini hanno ambedue le forme... Il DNA di molte specie, uomini compresi, ospitano copie multiple di diversi provirus retrovirali. Le sequenze umane provirali endogene sono tutte virtualmente difettose e comprendono circa l'uno per cento del genoma umano. (114) Il punto di vista riguardante l'incompletezza non è condiviso nemmeno da Reinhard Kurth che, con i suoi colleghi, hanno studiato ampiamente i retrovirus endogeni umani (115) ed hanno dimostrato che le sequenze dell'HERV-K vengono trascritte e che la linea cellulare del teratocarcinoma umano, GH, che contiene tali sequenze, quando fu esaminata dall'EM si trovò che produceva "particelle di retrovirus derivati dal teratocarcinoma umano (HTDV)". Nel 1993 Kurth e colleghi riferirono che nella linea cellulare GH, "si potevano identificare quattro specie di mRNA virale, compreso un mRNA a piena lunghezza. Gli altri tre RNA subgenomici sono generati da singoli o doppi eventi concomitanti... Le analisi sequenziali di genomi espressi di HERV-K hanno rivelato geni gag non difettosi, un prerequisito per la formazione di particelle. Vennero inoltre osservati quadri di lettura aperta nel pol e nell'env. Gli antisieri alle proteine gag dei ricombinanti dell'HERV-K macchiavano le particelle dell'HTDV nel microscopio immunoelettronico, collegandoli alla famiglia dell'HERV-K". Discutendo le loro scoperte, scrissero: "Nei Northern blot si può dimostrare la manifestazione dell'HERV-K solo nelle linee cellulari del teratocarcinoma, ma non in altre linee umane. Studi preliminari del PCR dell'RT ci fanno supporre, tuttavia, che l'HERV-K si possa manifestare in molte se non in tutte le cellule umane a livelli troppo

bassi per essere individuati nei Northern blot. La base delle differenze quantitative significative nell'espressione tra cellule di teratocarcinoma ed altre linee cellulari non è chiara. È intrigante speculare sul fatto che un fattore (fattori) cellulare possa regolare la sintesi dell'mRNA dell'HERV-K che dipende dal tipo di cellula o dallo stato della differenziazione. In questo contesto, si dovrebbe ricordare che altri elementi retroviroidi (ERV-9, RTLVL-H, LINE-1) si manifestano anche di preferenza nelle cellule umane del teratocarcinoma" (116) È interessante notare che Montagnier ed i suoi colleghi hanno riportato il loro "genoma dell'HIV" da una linea cellulare trasformata, che la linea cellulare HUT78 di Levy e colleghi è una linea cellulare umana leucemica e che la linea cellulare H9 di Gallo e colleghi non è altro che l'HUT78, e perciò deve avere l'HTLV-I come pure il retrovirus endogeno. È ugualmente importante notare che sebbene Kurth et al non avessero riscontrato alcuna omologia sequenziale tra l'HERV-K ed il "virus linfotropico umano T" o HIV, molti ricercatori riportarono sequenze dell'HTLV-I nel genoma umano comprese linee cellulari derivate dal teratocarcinoma.

In uno scritto pubblicato nel 1985 ricercatori di un grande numero di istituzioni negli USA compresi il Laboratorio di Immunologia e Biologia dei Tumori, l'Istituto Nazionale del Cancro, Bethesda, riferirono che "il DNA umano contiene copie multiple di una nuova classe di genomi retrovirali endogeni. L'analisi del clone del DNA di un ricombinante umano (l'HLM-2) contenente un tale genoma provirale si rivelò essere un mosaico di sequenze retroviral-collegate dall'organizzazione e dalla lunghezza di genomi retrovirali endogeni conosciuti. La ripetizione del lungo terminale dell'HLM-2 si ibridizzò con la ripetizione del lungo terminale del virus di scimmia scoiattolo, un virus di tipo D. I geni gag e pol dell'HLM-2 condividono un'ampia omologia con quelli del retrovirus M432 (un retrovirus di tipo A-collegato), il virus del tumore della mammella del topo (un retrovirus di tipo B) e il virus del sarcoma Rous aviario (un retrovirus di tipo C). Le analisi delle sequenze nucleotidiche rivelarono regioni nel gene pol dell'HLM-2 che erano identiche per il 70% al gene pol del tumore della mammella del topo. Una porzione del gene env dell'HLM-2 putativo ibridizzava con la regione corrispondente del genoma virale M432". La regione pol dell'HLM-2 rivelò omologia con l'HTLV-I che, secondo gli autori, "non è endogeno alle cellule umane, ma viene trasmesso orizzontalmente come il virus di un'infezione provocante tumore negli uomini". (117)

Nel 1987 ricercatori del Canada riportarono la scoperta di un Genoma "Endogeno Umano" di Tipo Retrovirale con sequenze pol di Tipo C e sequenze gag relative ai Virus Linfotropici Umani cellulari-T, l'HTLV-I e l'HTLV-II. (118) Nel 1989 ricercatori del Dipartimento di Biochimica, Università di New York, dimostrarono che "il DNA umano contiene un ampio spettro di trascrittasi inversa retrovirus-connessa che codifica sequenze, comprese alcune che sono chiaramente correlate al virus di tipo I e tipo II della leucemia cellulare umana, alcune che sono relative alla famiglia L-I di lunghe sequenze nucleotidiche sparpagliate ed altre che sono relative ai DNA provirali endogeni umani precedentemente descritti. Inoltre, le sequenze del virus umano leucemico cellulare-T legato al tipo I appaiono trascritte sia nelle cellule normali umane T che nella linea cellulare derivata da un teratocarcinoma umano. (119) In uno scritto pubblicato nel 1989, ricercatori degli USA riassunsero le loro scoperte sperimentali come segue: "Sono state clonate sequenze endogene legate al tipo I (HRES) del virus umano leucemico cellulare-T da una libreria genomica umana. L'HRES 1/1 è presente nel DNA di tutti i donatori normali esaminati. Dalle analisi delle sequenze nucleotidiche, l'HRES 1/1 contiene due potenziali quadri di lettura capaci di codificare una p25 ed una p15. Una regione laterale 684 a 5' dal primo codone ATG della p25 contiene un "TATA-box", un segnale di poliadenilazione, un sito legato al primer putativo tRNA, ed invertita si ripete nei siti che sono tipici di una lunga ripetizione terminale retrovirale... Il sito genomico dell'HRES-1/1 nelle cellule linfatiche è trascrizionalmente attivo",

compresi i linfociti di sangue periferico umano normale trasformati in EBV, le linee cellulari leucemiche, le cellule del melanoma ed i tessuti embrionali. In un saggio pubblicato nel 1992 da ricercatori dell'Ungheria e della Bretagna intitolavano "Sequenze, relative al virus linfotropico cellulare-T umano (HTLV), l'HRES-1, codificano una proteina 28-kDa: un possibile autoantigene per gli anticorpi reattivi al gag dell'HTLV", "nel genoma umano venne documentata la presenza di una sequenza endogena relativa al virus umano linfotropico cellulare-T (HTLV), l'HRES-1". Il sito genomico dell'HRES-1 è trascrizionalmente attivo e contiene quadri di lettura aperta... Vennero notati anticorpi a peptidi sintetici specifici all'HRES-1 in pazienti con MS, sclerosi progressiva sistemica (PSS), SLW, sindrome di Sjogren (SJS), e crioglobulinemia (ECG). I dati fanno presumere che l'HRES-1 possa servire da autoantigene e corrisponda ad un target naturale degli anticorpi reattivi alle proteine del nucleo dell'HTLV-1".(120)

6.3.3. Il genoma di un retrovirus assemblato ex novo da ricombinazione genetica e cancellazione di:

- (a) sequenze retrovirali endogene;
- (b) sequenze retrovirali e cellulari;
- (c) geni cellulari non-retrovirali.

Nella letteratura virologica vi è ampia prova che dimostra che quando una cellula contiene due provirus, si può trovare una progenie che possiede il genoma di uno, ma le proteine strutturali dell'uno o di ambedue i virus presenti. All'inverso, l'RNA può essere virale, ma almeno alcune delle proteine possono essere cellulari. In altri casi, le particelle non hanno affatto un genoma, oppure uno o più geni ne sono sprovvisti (virus geneticamente difettosi). Ci può essere una miscelazione genetica tra genomi virali o tra geni virali e cellulari.(83,121) Secondo alcuni retrovirologi distinti come Weiss e Temin, si possono presentare dei genomi retrovirali per la ridisposizione di DNA cellulare causata da molti fattori, compresi i processi patogeni, un punto di vista che propone i retrovirus come effetto e non causa della malattia.(12,123) Secondo Varmus, "I genomi retrovirali si ricombinano ad alta frequenza (classe di stima dal 10 al 30% per ciascun ciclo di moltiplicazione) e si pensa che gli RNA eterodimerici siano degli intermedi, con la ricombinazione che si verifica durante la trascrizione inversa. La ricombinazione appare fortemente favorita dall'omologia, ma il ricongiungimento avviene occasionalmente anche tra sequenze non collegate, per es., durante l'ultima fase di trasduzione genetica dai retrovirus. Quando si coltivano virus in cellule che contengono provirus endogeni collegati, trascritti trasferibili (packageable) per quei provirus possono prendere parte alle reazioni di riassociazione con il virus esogeno. Ciò è più drammaticamente rivelato dallo stato dei mutamenti delle cancellazioni nel genoma di un virus endogeno in un modo che assomiglia superficialmente a quello della conversione del gene". In alcuni animali si sono ottenuti dei provirus "durante una recente riproduzione dei ceppi virali in laboratorio" e "in alcuni casi, si sono instaurati provirus endogeni o sono aumentati di numero durante le osservazioni sperimentali"(121(in corsivo)). Nel lontano 1974, sulla base delle prove allora disponibili, Howard Temin propose che i genomi retrovirali ribodeossivirici avevano origine da "normali componenti cellulari". La relazione tra i diversi gruppi di ribodeossivirici riflette la relazione tra i componenti cellulari dai quali si sono sviluppati i virus e l'evoluzione convergente dei virus. In altre parole, c'è una relazione tra i ribodeossivirici poiché i ribodeossivirici si sono sviluppati dalle cellule con le quali gli stessi avevano una relazione derivante da antenati comuni. Un possibile meccanismo di detta evoluzione è descritto nella Fig. 5". Nella legenda alla Fig. 5 Temin ha scritto. "Una sezione di un genoma cellulare subisce una modifica nel successivo DNA (W) a RNA (-) a trasferimenti del DNA fino a che non diventa un genoma del ribodeossivirico. Dapprima, queste sequenze si sviluppano come parte di un genoma cellulare. Dopo essere fuoriuscite come un virus, si sviluppano in maniera indipendente come un genoma virale. La scala del tempo può essere di milioni di anni

nella linea embrionale e di giorni nelle cellule somatiche.(122) Temin ha ribadito il suo punto di vista in una più recente pubblicazione.(124)

Nel 1975, Gallo, Gillepsie ed i loro colleghi hanno scritto: "anche se l'RNA di retrovirus di Classe II mostra un'omologia minima al DNA cellulare dell'ospite non infettato, l'ibridizzazione di acidi nucleici tra virus leucemici di classe II da diverse specie dà un campione che è lo stesso della connessione filogenetica tra i loro ospiti naturali...Abbiamo proposto che questi ed altri risultati favoriscono l'interpretazione che tutti i virus tumorali dell'RNA siano derivati da geni cellulari, una proposta in accordo con la teoria virogena... Da analisi dell'RNA di virus che si infettano e si riproducono in un nuovo ospite, si è anche ottenuta la prova che indica che il genoma dei virus di tipo C può essere sostanzialmente cambiato dall'ospite, probabilmente per mezzo della riassociazione con il DNA dell'ospite"(125) Alcuni anni dopo, Coffin scrisse: "La stretta relazione delle proteine dei virioni come pure l'omologia globale dell'acido nucleico deve significare che i virus tumorali aviari sia esogeni che endogeni (retrovirus) derivano da un antenato comune".(126)

Nel 1991 ricercatori dell'Università di New York pubblicarono un saggio intitolato, "Implicazioni Evolutive del Retrovirus Endogeno Primate". Discutendo i dati disponibili al momento scrivevano, "Una recente analisi dettagliata filogenetica di retrovirus endogeni ed esogeni (compresi i retrotrasposoni) fa fortemente presupporre che un gruppo di sequenze retrovirali esogene contribuisce periodicamente alla generazione di virus esogeni, e che la presenza di retrovirus endogeni primate è probabilmente legata ai retrovirus esogeni più direttamente di quanto si possa aver pensato".(127)

6.3.4 Il "nuovo" RNA trovato nel soprannatante da coltura cellulare ed il materiale dallo stesso che si associa a 1,16 gm/ml, l'RNA dell'HIV, può non aver niente a che fare con un genoma retrovirale. Può essere un RNA ottenuto dalla trasposizione, cioè, per alcune sequenze che si ripetono del DNA (trasposoni) che vengono introdotti altrove nel genoma, o per RNA particolare (trasposoni) che sono dapprima trascritti nel DNA e quindi vengono inseriti in modo analogo nel genoma. La retroposizione può "impiegare meccanismi cellulari per la retroposizione passiva, come pure retroelementi contenenti transcriptasi inversa". I retroelementi possono essere elementi simil-retrovirali oppure elementi non virali.(128,129) Non solo la retroposizione può "formare e riformare un genoma eucariotico in molti modi diversi"(128), ma i retroelementi non virali possono essere simili agli elementi retrovirali. Secondo Doolittle et al dell'Università della California, San Diego, "... l'intero gruppo degli agenti portanti-trasmissione inversa, compresi i retrotrasposoni ed i retrovirus autentici, è stato recentemente chiamato, "retroidi". Le comparse in sequenza per molti altri lavoratori fa sorgere un piccolo dubbio sul fatto che le transcriptasi inverse di tutti i "retroidi" qui considerati siano omologhe, cioè a dire, le somiglianze delle sequenze non sono il risultato di cambiamento o di convergenze. I nostri propri confronti confermano quella nozione generale, non solo per le transcriptasi inverse, ma anche per le ribonucleasi, endonucleasi e proteasi, sebbene dovrebbe essere inteso che non tutti i "retroidi" contengono tutti e quattro gli enzimi... Tutti questi elementi hanno fattori addizionali in comune con i retrovirus inclusi i caratteristici LTR (lunghe ripetizioni terminali) ed i siti primer che sono complementari ai vari tRNA. Come i retrovirus, molti contengono proteine distinte che si associano all'acido nucleico e di particelle del nucleo; nelle fotografie elettroniche vi è una considerevole somiglianza a capsidi retrovirali... Al riguardo il solo fattore che distingue regolarmente molti di questi retrotrasposoni dai retrovirus autentici è l'assenza di una proteina dell'involucro".(17)

6.3.5 Sebbene sia passato mezzo secolo da quando il Premio Nobel, Barbara McClintock, scoprì il fenomeno della trasposizione che può portare

alla comparsa di nuovi genotipi e fenotipi, attualmente in generale si accetta ancora il fatto che in qualsiasi momento qualcuno trovi un particolare segmento di RNA in una cellula, per esempio in un linfocito-T, a meno che l'RNA o il DNA siano stati introdotti dall'esterno, incuranti del loro stato fisiologico o stress al quale sono stati sottoposti, conterranno un segmento corrispondente del DNA. In altre parole, il DNA (i geni) in una cellula non è variante e tutte le molecole nella cellula sono subservitori ad una lunghezza coordinata del DNA. Comunque, secondo la McClintock, il genoma può essere ristrutturato e non solo per trasposizione. Nella sua lettura del Nobel dell'8 Dicembre 1983, diceva, " la rapida riorganizzazione di genomi può sottolineare la formazione di alcune specie. La nostra attuale conoscenza ci suggerirebbe che queste riorganizzazioni hanno origine da un qualche "shock" che ha forzato il genoma a ristrutturarsi in modo da sopraffare una minaccia alla sua sopravvivenza... Più certamente una ristrutturazione genomica significativa accompagnava la formazione di nuove specie". Lo "shock genomico" che dà origine a nuove specie può essere "prodotto sia da incidenti che avvengono nell'ambito della cellula stessa, oppure imposti dall'esterno quali infezioni virali, incroci di specie, veleni di vario tipo, oppure anche ambienti alterati come quelli imposti dalla coltura dei tessuti. Siamo al corrente di alcuni incidenti che colpiscono il DNA ed anche dei loro meccanismi di riparazione, ma molti altri potrebbero essere difficili da riconoscere. Potrebbero essere necessarie delle regolazioni omeostatiche se questi incidenti accadono frequentemente. Molti di tali incidenti e le loro rettifiche non sarebbero scoperti fino a quando un qualche evento od osservazione non dirigesse l'attenzione verso di essi... Senza dubbio, emergeremo da questo periodo rivoluzionario con punti di vista modificati su componenti di cellule e su come essi operano, ma solo comunque per attendere la comparsa della prossima fase rivoluzionaria che porterà ancora dei cambiamenti sorprendenti nei concetti"(130)[in corsivo e vedi questo riferimento per gli esempi].

Negli anni 80 si è scoperto un grande numero di fenomeni che hanno portato a cambiamenti sorprendenti nelle concezioni comprese le seguenti: fino alla fine degli anni 70, il concetto prevalente era che un discreto, contiguo segmento di DNA è un gene strutturale che codifica le informazioni genetiche per specificare la fabbricazione di una singola proteina e che la sequenza lineare dei nucleotidi in questo segmento del DNA corrisponde direttamente alle sequenze lineari dei nucleotidi dell'RNA ed agli aminoacidi nella proteina. La prima scoperta che ha contraddistinto tale credenza fu la scoperta che le sequenze base del DNA che codificavano per una data proteina non erano in un segmento continuo del DNA, ma si potevano sparpagliare con altre sequenze base non codificanti, cioè i geni sono spaccati, "geni-in-pezzi". Si è presupposto un grande numero di meccanismi per avvalorare detta osservazione. In una tale spiegazione si ipotizza che l'intero segmento del DNA viene trascritto in un pezzo dell'RNA, quindi si recidono le regioni non codificanti (introni) e si congiungono le regioni codificanti (esoni) per fare l'RNA del messaggero appropriato.(131) Non ci sono regole che stabiliscano un limite superiore sul numero degli introni in un "gene", alcuni geni possono avere fino a 16 o più introni. E non vi sono nemmeno regole che riguardano la lunghezza degli introni, sebbene in generale, gli introni siano più lunghi degli esoni, la lunghezza degli esoni "raggiungendo il massimo a circa 40 o 50 amino-acidi... essendo l'introne più corto lungo 50 basi, mentre il più lungo raggiunge circa 50,000 bp".(132)

Secondo Gilbert gli introni rappresentano i "punti caldi" per la riassociazione e si possono creare nuovi geni "attraverso l'accoppiamento di esoni per riassociazione mediata da introni", si perdono gli introni e si formano esoni più complicati"(133) Attualmente esiste la prova che dimostra che almeno alcuni introni sono elementi genetici mobili, elementi intercambiabili, si auto-congiungono, spesso contengono quadri di lettura capaci di codificare una proteina comprendendo "regioni di omologia alla transcriptasi inversa sparse su un segmento di approssimativamente 250 amino-acidi in mezzo all'ORF

di ciascun introne.(134) La scoperta di geni spaccati "dimostra che l'apparato genetico della cellula sia più complesso, più dinamico di quanto ciascuno di noi abbia immaginato".(132) Un altro punto di vista fortemente sostenuto era la credenza che tutte le reazioni cellulari e di conseguenza la rottura dei geni, venissero catalizzate da un enzima delle proteine. All'inizio degli anni 80 si trovò che l'RNA può tagliare, rompere e riunire se stesso, come pure riunire gli RNA diversi da sé.(135-138)

6.3.6 Uno dei punti di vista più forti sostenuti in biologia è la credenza che gli acidi nucleici abbiano un'abilità intrinseca a istruire le loro proprie sintesi e che gli acidi nucleici non si possano sintetizzare in assenza di un template di acidi nucleici. Manfred ed i suoi colleghi in Germania hanno condotto un lavoro teorico e sperimentale esteso sull'auto-riproduzione molecolare.(139) Nel loro lavoro sperimentale hanno usato il virus batterico (phage) Qb. In aggiunta al suo genoma, una molecola semplice dell' RNA di 4500 nucleotidi, il virus ha una molecola dell'RNA di 220 nucleotidi conosciuta come "minivariante di Spiegelman" che, come l'RNA genomico, viene riprodotta in sistemi di laboratorio senza cellule da un enzima chiamato replicasi Qb. Miscelando gli ioni di Mg<sup>2+</sup>, i trifosfati del nucleoside ATP, la replicasi dei GTP, UTP, Qb e l'RNA del template, potevano ottenere la riproduzione dell'RNA, ma una scoperta totalmente insospettata fu che l'RNA si sintetizzava ancora, anche in assenza del template. Fecero molti esperimenti per provare questo fenomeno e per escludere la possibilità della presenza di un template iniziale dell'RNA e conclusero, "Finalmente eravamo convinti di avere di fronte a noi le molecole dell'RNA che si erano sintetizzate ex novo dall'enzima della replicasi Qb. La cosa più sconcertante era che il prodotto ex novo aveva una composizione uniforme che in ogni prova propendeva ad essere simile od anche identico alla minivariante di Spiegelman". Quando il miscuglio libero del template fu in seguito diviso i molti scompartimenti isolati dove venivano mantenute le condizioni ottimali per la sintesi ex novo trovarono che "ciascun componente aveva una popolazione uniforme di prodotto ex novo, i prodotti differivano da scompartimento a scompartimento. In seguito tuttavia le analisi rivelarono che le sequenze diverse non erano completamente scollegate... C'era un prodotto finale definito, uniforme per qualsiasi serie di condizioni sperimentali, ma qui vi erano prodotti ottimali diversi tanto quanto vi erano diverse condizioni sperimentali. Uno dei prodotti ottimali sembrò essere la minivariante di Spiegelman... Altri prodotti di ottimizzazione vennero adattati alle condizioni che avrebbero distrutto gli RNA, come un'alta concentrazione di ribonucleasi, un enzima che riduce in pezzi l'RNA.. Alcune varianti vennero adattate così bene da \*to odd\* gli ambienti che gli stessi avevano un'efficienza riproduttiva di 1000 volte quanto quella delle varianti adattate ad un ambiente normale... Qualsiasi RNA formato per chimica non-ordinata (noninstructed) sarebbe stato riprodotto per chimica istruita dal template ad un ritmo proporzionale all'attuale concentrazione di RNA. Il risultato sarebbe stato quello di una crescita esponenziale. Inoltre, anche se solo un singolo template fosse formato inizialmente per sintesi non-istruita, ci sarebbe presto un ospite di diverse sequenze, poiché sarebbe inevitabile fare degli errori (mutamenti, inserimenti e cancellazioni del punto) nel corso della riproduzione. Da allora in ciascuna generazione ci sarebbe stato non solo un numero maggiore di componenti dell'RNA, ma anche una maggiore varietà di sequenze dell'RNA. Che cosa sarebbe accaduto dopo? Alcuni dei mutanti sarebbero stati copiati più rapidamente di altri o sarebbero stati meno soggetti ad errori nella copiatura e la loro concentrazione sarebbe aumentata più rapidamente. Prima o poi sarebbero subentrati questi mutanti a crescita più veloce... Da allora i risultati della competizione per l'auto-riproduzione dovevano essere la sequenza principale insieme ad un immenso stuolo di mutanti derivati dalla stessa e dalla quale non aveva alcuna via di uscita. Chiamiamo quasispecie l'intera distribuzione di mutanti. E' la distribuzione dei mutanti della quasispecie a sopravvivere alla competizione degli RNA auto-riproduttori e non solo una sequenza principale o le molte altre equivalenti che sono i geni più adatti nella

distribuzione. L'essenza della selezione degli stessi è la stabilità della quasispecie."(140) Secondo Eigen ed i suoi colleghi, la lunghezza massima di una sequenza principale dell'RNA è dell'ordine di 10.000 nucleotidi.(139,141)

6.3.7 Un principio basilare della biologia molecolare è che la sequenza primaria dell'RNA riproduce fedelmente la sequenza primaria del DNA dal quale viene trascritta. Tuttavia, negli anni 80 fu scoperto l'editing dell'RNA, "definito in generale come un processo che cambia le sequenze nucleotidiche di una molecola dell'RNA da quella del template del DNA che lo codifica". Nel processo si può adattare un trascritto non-funzionale, producendo un mRNA traducibile, o modificare un mRNA già funzionante in modo tale che generi una proteina di sequenze di amino-acidi alterati. Talvolta l'editing è così esteso che la maggioranza delle sequenze in un mRNA non sono codificate genomicamente ma sono generate post-trascrizionalmente producendo la "situazione paradossale di un trascritto che perda la complementarietà sufficiente a ibridizzarsi al suo proprio gene!".(142-144) Secondo Nancy Maizels ed Alan Weiner del Dipartimento di Biofisica e Biochimica Molecolare presso la Yale University, "il dogma centrale è sopravvissuto a tempi duri. La scoperta della trascrittasi inversa ha corretto, ma non ha violato il dogma centrale di come i geni producano proteine; gli introni hanno qualificato la conclusione che i geni sono necessariamente collineari con le proteine che gli stessi codificano; la riorganizzazione somatica del DNA dei linfociti ha fatto sorgere dei dubbi sulla stabilità dei genomi eucariotici... e l'RNA catalitico ha messo in dubbio la preminenza delle proteine ed ha respirato una nuova vita nel vecchio mondo dell'RNA". Tuttavia, la scoperta dell'editing dell'RNA "potrebbe essere vicina ad assestargli un colpo mortale".(145)

6.3.8 CONCLUSIONE Il ritrovamento di un nuovo segmento dell'RNA o DNA e proteine in:

(a) linfociti di individui malati o di individui che siano stati "scioccati" = con agenti come mitogeni fisici e chimici, agenti cancerogeni od ossidanti in generale come nel caso di pazienti AIDS e di quelli a rischio;(77,79,90)

(b) linfociti in colture o co-culture (che potrebbe portare alla comparsa di ibridi, che siano stati ulteriormente "scioccati" con agenti simili, talvolta multipli;

non è la prova che quel dato segmento dell'RNA venga dall'esterno, senza tener conto della sua lunghezza, la presenza del poli(A) ed un grande numero di ORF ("geni").

Dalle prove fornite da Montagnier, Gallo, Levy ed i loro colleghi non è possibile arrivare alla conclusione che gli "RNA dell'HIV" che hanno trovato siano una "nuova specie" di RNA indotta "provocando uno shock" alle cellule o per uno o più altri fenomeni che sono venuti alla luce negli anni 80. Non è nemmeno possibile concludere che i loro RNA siano i genomi di un retrovirus endogeno come hanno fatto. Tuttavia si può fare un certo numero di previsioni:

(a) Se il "DNA dell'HIV" è proprio il genoma di un retrovirus endogeno allora:

(i) ci deve essere la prova dell'esistenza di un'unica entità molecolare "RNA dell'HIV", ed un corrispondente frammento del DNA ("DNA dell'HIV") che abbia un'unica lunghezza ed uniche sequenze nucleiche acide;

(ii) quando il frammento a piena lunghezza del "DNA dell'HIV" viene usato per gli studi di ibridizzazione, tutte le persone infettate dovrebbero dare un risultato positivo.

(b) Se l'RNA estratto che si trovò che si associava a 1,16 gm/ml, l'"RNA dell'HIV", è il genoma di un retrovirus che esiste "in tutti noi", retrovirus endogeno, ancora una volta bisogna dimostrare l'esistenza di un'unica entità molecolare, l'"RNA dell'HIV", ("DNA dell'HIV"). Quando si conducono gli studi di ibridizzazione usando la lunghezza piena dell'unica entità

molecolare come sonda, si dovrebbero riscontrare dei risultati positivi "in tutti noi";

(c) Se l'RNA trovato dai tre gruppi, l'"RNA dell'HIV", è il genoma di un retrovirus messo assieme ex novo dal DNA già esistente nelle cellule, come risultato di condizioni in vivo o in vitro, bisogna ancora dimostrare la prova dell'esistenza di un'unica entità molecolare. Quando viene usata come sonda di ibridizzazione l'intera lunghezza dell'unico frammento di acidi nucleici, si dovrebbe trovare un risultato positivo solo nelle cellule che sono sottoposte esattamente alle stesse condizioni in vivo o in vitro di quelle dalle quali si ottenne l'"RNA dell'HIV" a 1,16gm/ml. Quando per l'ibridizzazione vengono usati solo frammenti dell'"RNA dell'HIV", aumenterà la possibilità di trovare un risultato positivo;

(d) Se l'"RNA dell'HIV" è un'unica specie molecolare non-virale dell'RNA risultante dalla trascrizione di un'unica specie molecolare del DNA, allora quando l'intero frammento dell'"RNA dell'HIV" ("cDNA dell'HIV") viene usato come sonda per gli studi di ibridizzazione, si dovrebbe riscontrare un risultato positivo solo nelle cellule dello stesso tipo di quelle che hanno originato l'"RNA dell'HIV", in tutti gli individui;

(e) Se l'"RNA dell'HIV" non è né il genoma di un retrovirus, né un fedele trascritto di un frammento di DNA presente nelle cellule dalle quali è stato ottenuto, ma è il risultato dello "shock" al quale le cellule sono state esposte, in vivo o in vitro od entrambe le cose, o come risultato dei fenomeni scoperti negli anni 80, quindi:

(i) poiché non è possibile riprodurre esattamente le condizioni in vivo o in vitro alle quali le cellule sono sottoposte, sarebbe difficile se non impossibile ottenere sempre un'unica entità molecolare, l'"RNA dell'HIV", cioè, ottenere sempre un frammento dell'RNA o DNA di lunghezza e sequenze identiche;

(ii) quando si usano come sonde di ibridizzazione i frammenti a piena lunghezza dell'"RNA dell'HIV" o "cDNA dell'HIV" ci sarà solo una minima probabilità di trovare un risultato positivo. Tuttavia, la probabilità aumenterà se vengono impiegati solo piccoli frammenti dell'"RNA dell'HIV" o "cDNA dell'HIV".

#### 6.4. LA PROVA CHE L'"RNA DELL'HIV" APPARTIENE AD UN RETROVIRUS ENDOGENO

I gruppi Montagnier, Gallo e Levy dichiararono che lo speciale RNA che avevano selezionato dall'RNA totale con gradienti di densità con sucrosio associati alla densità di 1,16gm/ml era insolito ai linfociti e che di fatto apparteneva ad un retrovirus esogeno. Sebbene non presentassero la dimostrazione per provare questa affermazione, non si può escludere la possibilità che sia stato proprio così. Poiché attualmente la loro asserzione viene generalmente accettata, si potrebbe aver pensato che oramai gli stessi od altri ricercatori siano stati in grado di fornire ampia prova di conferma. Non sembra essere questo il caso:

6.4.1 Se l'RNA ha origine da un retrovirus endogeno od esogeno deve esistere quindi la dimostrazione che provi che tale RNA sia un costituente di particelle che posseggono almeno le caratteristiche più basilari morfologiche e fisiche dei retrovirus, cioè, "un innesto di diametro di 100-120 nm alle membrane cellulari. I virioni liberati dalle cellule contengano corpi interni (nuclei) e siano costellati di sporgenze (antenne, protuberanze)".(82) Ad oggi non solo nessuno ha dimostrato che l'"RNA dell'HIV" appartenga a tali particelle, ma non c'è nemmeno la prova che particelle di qualsiasi tipo siano presenti nel materiale da colture/co-culture cellulari che si associa alla densità retrovirale di 1,16gm/ml e dalla quale viene selezionato l'"RNA dell'HIV". Inoltre, sebbene siano state dimostrate delle particelle in colture, le colture contengono molti tipi diversi di particelle, ma nessuna mostra AMBEDUE le caratteristiche morfologiche principali,

cioè, "un diametro di 100-120 nm" E superfici che "siano costellate di sporgenze (antenne, protuberanze)".(146)

6.4.2 Se l'RNA dell'HIV è il genoma di un retrovirus esogeno, come i "retrovirus animali esogeni", si dovrebbe essere in grado di trovarlo nel materiale infettato senza la necessità di ritornare all'uso di co-coltivazione o di colture mitogenicamente stimolate. Comunque, nessuno dei fenomeni che si è pensato provassero l'esistenza dell'HIV può essere scoperto a meno che non si impieghino mitogeni o co-culture od ambedue (e talvolta "shock" addizionale), fatto accettato sia da Montagnier che da Gallo.(78,147)

6.4.3 Non si può asserire che l'RNA dell'HIV è il genoma di un unico retrovirus, l'HIV, fino a che non sia presentata la prova che l'HIV è un'unica entità molecolare.

Intorno al 1985 si sapeva che "i geni env dell'ARV e dell'HTLV-III differiscono di oltre il 20%" e che "il gruppo di Gallo ha messo in sequenza un altro isolato dell'HTLV-III e trova che differisce dal primo circa quanto l'ARC".(114,148) Intorno al 1986, Gallo ed i suoi colleghi accettavano il fatto che il "genoma dell'HIV" avesse una "variabilità di gran lunga maggiore" in confronto alla HTLV ed infatti "il ritmo del cambiamento genetico per il virus dell'AIDS è più di un milione di volte superiore di quello per la maggior parte dei genomi del DNA e può essere anche superiore di dieci volte che per alcuni altri virus dell'RNA compresi certi retrovirus ed il virus dell'influenza A". Attualmente si accetta il fatto che "gli isolati a due a due non sono identici. Ciascun isolato contiene molte varianti".(150) In uno o nello stesso paziente i dati genomici in monociti differiscono da quelli in linfociti-T.(151) Ci sono "notevoli differenze" tra il DNA provirale ed il cDNA in uno e nello stesso campione di PBMC, il che non potrebbe essere spiegato se non per un artefatto dell'efficienza della trascrittasi inversa oppure una distorsione della selezione del template".(152) I dati genetici ottenuti in vitro non corrispondevano a quelli ottenuti in vivo, "il mettere a coltura significa disturbare".(153) Secondo i ricercatori dell'Istituto Pasteur "un paziente asintomatico può ospitare almeno 106 varianti geneticamente distinte di HIV, e per un paziente AIDS il numero può essere di più di 108.(154,155) Il "genoma dell'HIV" può variare con il tempo; in un caso in cui i cloni furono tenuti da parte per 16 mesi, tutti i cloni rinvenuti nel secondo campione erano diversi dai cloni nel primo campione.(156) Viene accettato anche il fatto che più del 99,9% dei "genomi dell'HIV" possano essere difettosi.(157)

Secondo Levy, "Il meccanismo responsabile di generare questi vari ceppi virali di virioni è strano. Una possibilità teorica è che le copie provirali non integrate dell'HIV che si accumulano durante un'infezione acuta ripetitiva possano subire una riassociazione genomica efficiente che porta all'evoluzione di varianti infettive.(158) Secondo il parere di Robin Weiss, "la causa della variazione è l'infedeltà della trascrizione inversa, che non ha alcun meccanismo di editing per gli errori trascrizionali", come pure la "riassociazione genetica" specialmente quando si ha la fusione cellulare.(159)

Alla fine degli anni 80, ricercatori dell'Istituto Pasteur concludevano, "è sempre più chiaro che sarà molto difficile descrivere correttamente le caratteristiche dei virus dell'HIV usando singoli cloni molecolari". "È evidente che l'HIV, sia in vivo che in vitro, è straordinariamente complesso e che si deve usare un'approssimazione basata sulla popolazione", un'approssimazione delle quasispecie come definito da Eigen, per descrivere l'HIV. Aggiunsero anche, "Anche con un'approssimazione basata sulla popolazione, si possono studiare solo delle piccole regioni del genoma dell'HIV... Data tale complessità e l'evidente differenza tra quasispecie in vivo ed in vitro, sarà difficile il compito di definire l'infezione da HIV in termini molecolari".(153,160) I dati che sono stati pubblicati da allora confermano le loro conclusioni: Prima degli anni 90, le sequenze dell'HIV venivano

classificate come Africane e Statunitensi /Europee con differenze di sequenza del 20-30 percento tra questi due gruppi.(161). Negli anni '90, ricercatori di HIV iniziarono a dividere il "genoma dell'HIV" in sottotipi A,B,C,D,E, ecc. La base di questo sistema di classificazione è la seguente:

"(a) i sottotipi sono approssimativamente equidistanti l'uno dall'altro nell'env (una filogenia a stella [star phylogeny]);

(b) l'albero filogenetico dell'env è in gran parte conforme agli alberi filogenetici del gag;

(c) si richiedono due o più campioni per definire un sottotipo di sequenza". Tuttavia, "Sono sorti dei problemi nel nominare i sottotipi. Un numero piccolo ma non insignificante di sequenze virali sono ibride, che si riuniscono con un sottotipo di sequenza nel gag ed un altro tipo di sequenza nell'env, per esempio; oppure, per prendere un altro esempio, che si raggruppano sopra diversi segmenti con due o più sottotipi nell'env... Il nominarli diventa problematico quando sorgono forme altamente divergenti di un dato sottotipo: tali forme sono talvolta designate come A', B', F', ecc.". È sempre più necessario avere dei dati sequenziali sia dal gag che dall'env che codificano sequenze quando si sta rivendicando una nuova forma o sottotipo".(162)

Verso la metà di quest'anno sono stati descritti "almeno dieci"(A-J) genotipi dell'HIV-1 principali(M) prevalenti e di bassa prevalenza e vengono ancora dichiarati dei nuovi genotipi.(8,163) Secondo i ricercatori del Laboratorio di Ricerca e Divisione di Retrovirologia della Fondazione Henry M. Jackson, Walter Reed Army Institute, USA, "La grande maggioranza dei depositi genotipici per l'HIV-1 sono basati su segmenti di sequenze subgenomiche, che circondano tipicamente dal 2 al 30% del genoma", e non nei confronti dell'intero genoma. Ciò accade perché è inutile ottenere sequenze genomiche a piena lunghezza degli isolati dell'HIV-1 come metodo di routine di genotipizzazione, a causa della poca abbondanza di DNA provirale dell'HIV-1 nei campioni clinici e nelle colture virali su substrato di PBMC, e della relativa inefficienza della reazione a catena della polimerasi quando gli ampliconi si allargano". "La designazione Virus Umano da Immunodeficienza di Tipo-1 (HIV-1) ha incluso una complessità inaspettata di forme virali".(163) Secondo i ricercatori del Laboratorio Nazionale Los Alamos, "sebbene possa essere corretta una designazione di sottotipi basata su un gene o su un frammento di gene, si può essere verificata una riassociazione. Tuttavia, ci si dovrebbe curare di non sovrainterpretare la designazione del sottotipo. Se si deve discutere la designazione dei sottotipi di isolati virali basata sui dati ivi presentati, ci si dovrebbe riferire alla designazione come 'regione dell'ansa (loop) al di sopra del V3 'somigliante al B' piuttosto che come 'sottotipo-B'".(164) Una e la stessa persona potrebbe essere "infettata" con più di un sottotipo.(165) Ciò significa che attualmente non è possibile dire che cosa siano le differenze sequenziali, sia qualitative che quantitative, tra diversi sottotipi di HIV-1. Ciò nonostante, esistono alcuni dati suggestivi. Nel 1993 alcuni ricercatori di diverse istituzioni "riferirono che nei genotipi A-G dell'HIV-1 le distanze del gag intra-genotipico avevano una media del 7%, mentre le distanze inter-genotipiche avevano una media del 14%... Il livello massimo di variabilità nel gag è ancora ben al di sotto di quanto osservato per la regione env dell'HIV-1".(166) Due ceppi virali di HIV-1, chiamati ANT70 e MVP5180 furono isolati nel 1987 e nel 1991 rispettivamente da pazienti del Cameroon. Furono classificati come sottotipo 0 dell'HIV-1. Nel 1994 fu presentata la prova che "indicava che il sottotipo 0 era endemico nel Cameroon e nel Gabon".(167) Le "analisi sequenziali del DNA dell'MVP-5180 mostravano che la sua organizzazione genetica era quella dell'HIV-1, con una somiglianza del 65% all'HIV-1 e del 56% alle sequenze di consenso dell'HIV-2. Il gene env dell'MVP-5180 aveva delle somiglianze all'HIV-1 e all'HIV-2 rispettivamente del 53 e del 49%... Il confronto della sequenza degli amminoacidi dell'MVP-5180 con quella del virus dello scimpanzé del Gabon mostravano delle somiglianze nei geni gag, pol ed env rispettivamente del 70, 78 e 53%. vennero trovate delle somiglianze del 70,

76 e 51% all'HIV-1 dell'Uganda (U455) e del 54,57 e 34% all'isolato D205 dell'HIV-2". I ricercatori della Germania e del Cameroon che condussero questo studio espressero il parere che "Possono esistere anche più HIV divergenti. E' probabile che tali HIV divergenti vengano trasmessi per vie normali ( contatto sessuale ed ematico e trasmissione madre-neonato), che portano ad una più ampia distribuzione. Dovranno tener conto dello sviluppo del vaccino e della sensibilità e specificità dei test diagnostici".(168) Sembra pertanto che questo ne sia il caso. Lo scorso anno, David Ho e soci studiarono un paziente australiano con "infezione primaria". "Poiché i sierconvertitori ospitano una popolazione generalmente omogenea di virus", rimasero sorpresi quando trovarono che era "co-infettato", "dall'HIV-1 del sottotipo B multiplo... Le distanze genetiche medie tra il gruppo I ed il II, il I ed il III, ed il II ed il III erano rispettivamente del 9,6, il 16,5 e il 18,4%... Una popolazione di sequenze era chiaramente distinguibile dalle altre sul basic di analisi filogenetiche. Inoltre, vennero trovate anche delle sequenze che suggerivano la riassociazione tra due o tre popolazioni virali distinte."

Il fatto che il "DNA dell'HIV" possa essere "Anche più divergente" di quanto si accetti generalmente viene meglio illustrato in uno studio pubblicato nel corso di quest'anno da ricercatori degli Stati Uniti. Poiché gli inibitori della proteasi stanno diventando i farmaci preferiti per il trattamento di individui "infettati da HIV", e poiché "i mutamenti che avvengono in modo naturale nei pazienti infettati da HIV-1 hanno implicazioni importanti per la terapia ed il risultato degli studi clinici", questi ricercatori hanno effettuato un'"analisi delle sequenze sul gene pr [gene della proteasi] in (167) ceppi virali dell'HIV-1 da 102 pazienti mai prima trattati con (naive) inibitori della proteasi raccolti da diverse regioni geografiche degli Stati Uniti. "Dato che l'enzima è di dimensioni relativamente piccole e che i limiti nella sua struttura vengono imposti dalla funzione, era ragionevole concludere che la variabilità sequenziale nell'HIV dovesse essere limitata". Con loro sorpresa scoprirono che "Un totale del 41% dei nucleotidi e del 49,5%(49/99) degli amminoacidi erano variabili. La diversità degli amminoacidi riscontrata in questi isolati virali USA è maggiore di quella precedentemente riportata per i virus di ceppo B dell'HIV-1" ed è anche maggiore di quella riscontrata nei geni pr per tutti i ceppi dell'HIV-1 (40 da 99, il 40% della variazione degli amminoacidi!)(170) Attualmente, più di allora nel 1986 quando Gallo ed i suoi colleghi trassero la conclusione che "Il ritmo dei cambiamenti genetici per il virus AIDS è di un milione di volte superiore di quello per la maggior parte dei genomi del DNA e può anche essere dieci volte maggiore di quello per alcuni altri virus dell'RNA compresi certi retrovirus ed il virus influenzale A", e nel 1989, quando i ricercatori del Pasteur trassero la conclusione che "sarà difficile il compito di definire l'infezione da HIV in termini molecolari", non vi è alcuna prova che dimostri l'esistenza di un'unica entità molecolare "RNA dell'HIV" ("DNA dell'HIV").

Infatti, vi sono un certo numero di ragioni per cui le miriadi di "DNA dell'HIV" incommensurabili non possano essere anche descritte "in termini di popolazioni di genomi strettamente connessi, a cui ci si riferisce come ad una quasispecie".(153) Questi comprendono:

(a) Eigen ed i suoi colleghi svilupparono il modello della quasispecie per descrivere la distribuzione degli RNA che si autoriproducono. Tuttavia si dice che l'"RNA dell'HIV" non sia un RNA che si autoriproduce, ma si riproduca attraverso un intermediato del DNA;

(b) l'RNA autoriproduttivo dei virus sembra "dimostrare una notevole stabilità in alcune situazioni. Il vaccino al poliovirus Sabin del tipo 3 differiva dal suo progenitore neurovirulento a solo 10 posizioni nucleotidiche dopo 53 passaggi in vitro e 21 in vivo nei tessuti delle scimmie. Nel 1977, l'influenza virale A H1N1 riapparve nella popolazione umana dopo 27 anni di inattività con sequenze principalmente identiche a quelle del virus del 1950". Sebbene si sia usato il modello della quasispecie di Eigen per descrivere il genoma dei virus dell'RNA, differenze di sequenza anche dell'1% in questi genomi vengono considerate rappresentare "estrema variabilità". "Molte

forze selettive possono stabilizzare le popolazioni virali. Questi fattori stabilizzanti possono racchiudere la necessità della conservazione della struttura e della funzione delle proteine, una struttura secondaria dell'RNA, siti di glicosilazione e siti di fosforilazione. Anche cambiamenti di un terzo di codone possono essere soggetti a pressioni selettive. Recentemente si è osservata una considerevole conservazione di certe sequenze di proteine principali (protein domain sequences) tra virus a RNA completamente non correlati.(171)

E' quindi possibile descrivere il "DNA dell'HIV" anche se ha una variazione del 10%, per non menzionare il 20 o il 30 o il 40% come è il caso, come una "popolazione di genomi strettamente imparentati, riferendosi come a una quasispecie"?

(c) Definendo il concetto di una quasispecie Eigen ha scritto: "Nella condizione costante che viene eventualmente raggiunta il miglior competitore, denominato sequenza master m, coesiste con tutte le sequenze mutanti da esso derivate per erronea trascrizione. Denominiamo quasispecie questa distribuzione di sequenze". Tuttavia, fino ad oggi nessuno ha provato che:

- (i) c'è una quasispecie dell'HIV" che sia sempre in equilibrio;
- (ii) i "genomi dell'HIV strettamente imparentati" derivino da una sequenza master;
- (iii) sia mai esistita una sequenza master.

6.4.4 Se il segmento dell'"RNA dell'HIV" è il genoma di un virus esogeno che infetta individui con AIDS o quelli a rischio, allora questo RNA (o DNA) dovrebbe essere presente nel tessuto fresco non messo a coltura da tutti questi individui ed in nessun altro. Inoltre, se in questi individui vi è un'infezione massiccia da HIV, come dichiarano alcuni dei più conosciuti esperti di HIV,

(172,173) l'ibridazione del Southern Blot dovrebbe essere più che sufficiente per scoprirla. Il primo di tali studi fu condotto da Gallo nel 1984. Usando una tecnica di ibridazione del Southern Blot testarono molti tessuti di pazienti AIDS, compresi i linfonodi. Riassumendo la loro scoperta scrivevano, "Siamo stati in grado dapprima di isolare l'HTLV-III da sangue periferico o dal tessuto del linfonodo da molti pazienti con AIDS o ARC" (lo isolarono da circa il 50% dei pazienti a cui Gallo si riferiva). "Tuttavia, come ivi dimostrato, il DNA dell'HTLV-III non viene solitamente scoperto per ibridazione del Southern Blotting standard di questi stessi tessuti e, quando lo è, le associazioni sono spesso deboli... l'ingrandimento del linfonodo comunemente trovato nei pazienti ARC e AIDS non può essere dovuto direttamente alla proliferazione di cellule infettate da HTVL-III... L'assenza di sequenze visibili dell'HTVL-III nei tessuti del sarcoma di Kaposi di pazienti AIDS suggerisce che questo tumore non sia provocato direttamente per infezione di ciascuna cellula tumorale con l'HTVL-III... l'osservazione che sequenze dell'HTLV-III vengono trovate raramente, se non del tutto, nelle cellule monucleari di sangue periferico, midollo osseo e milza fornisce la prima prova diretta che questi tessuti non sono infettati pesantemente o largamente con l'HTLV-III sia in AIDS che in ARC".(96) Questi studi furono confermati da molti altri ricercatori. L'aver trovato che quando i risultati erano positivi le associazioni di ibridazione erano "deboli", si interpretò il "basso segnale" come prova che gli individui sieropositivi da HIV contengono il DNA dell'HIV in piccoli numeri di cellule ed ad un basso numero di copie, un'interpretazione che venne generalmente accettata, sebbene Gallo ed i suoi colleghi avessero una spiegazione alternativa, "Teoricamente, l'intensità di questo basso segnale si potrebbe anche spiegare per la presenza di virus omologhi alla lontana all'HTLV-III in queste cellule".(96) Questa spiegazione alternativa è stata ignorata da tutti, compreso Gallo. Tuttavia, in un meeting tenuto a Washington sponsorizzato dall'Istituto Nazionale US di Abuso di Farmaci, Gallo ammetteva:"Non abbiamo mai trovato il DNA dell'HIV nelle cellule tumorali del KS... Infatti non abbiamo mai trovato il DNA dell'HIV nelle cellule-T".(174)

I dati che sono venuti alla luce dal 1984 suggeriscono che la spiegazione alternativa di Gallo ed i suoi colleghi può essere una realtà:

(a) attualmente vi è ampia prova che dimostra che il normale DNA umano contiene sequenze imparentate all'HTLV-I e all'HTLV-II (vedi 6.32);

(b) apparentemente, fino al 1993, Gallo non era al corrente dell'esistenza di retrovirus umani endogeni,(107) il che significa che per "virus omologhi alla lontana all'HTLV-III" potevano aver inteso nient'altro che i retrovirus esogeni che Gallo aveva dichiarato di aver scoperto precedentemente, cioè l'HTLV-I e l'HTLV-II. Tuttavia, ora anche Gallo ammette che le sequenze provirali endogene umane "comprendono circa l'uno per cento del genoma umano";

(c) alcuni dei più conosciuti esperti in HIV compresi Montagnier, Blattner e Gelderblom sono d'accordo che il pol ed il gag "si possano altamente conservare tra sottotipi di virus" (vedi 5.6). In un saggio pubblicato nel 1996 da Reinhart Kurth ed i suoi colleghi si legge, "I retrotrasposoni si sono sviluppati in una varietà di organismi che vanno dai protozoi agli esseri umani. In questi elementi, i geni dell'RT sono legati ai geni che codificano per poliproteine con il potenziale ad auto-aggregarsi ed a formare particelle del nucleo. Queste proteine sono l'equivalente delle proteine del capside retrovirale solitamente chiamate antigeni specifici al gruppo (gag)... Essi (i retrotrasposoni) possono essere sia i derivati che i predecessori dei retrovirus. I retrovirus differiscono dai retrotrasposoni per la presenza di almeno una regione codificante addizionale, il gene dell'involucro (env)".(175) Nel 1984, il gruppo di Gallo riferì che il "genoma dell'HIV" si ibridizzava con i "geni strutturali (gag,pol ed env) sia dell'HTLV-I che dell'HTLV-II). (56) Ovviamente, la scoperta di un "segnale" di ibridazione positiva almeno con un sonda gag o pol dell'"HIV" non è la prova dell'esistenza del "genoma dell'HIV";

Infatti, attualmente esiste anche la prova che dimostra la presenza di sequenze dell'"HIV" in tessuti non infettati:

(i) sebbene non si accetti più il fatto che l'HIV venga trasmesso da o sia presente negli insetti, nel 1986 ricercatori dell'Istituto Pasteur trovarono sequenze del DNA dell'HIV in mosche tsetze, scarafaggi neri e formiche-leoni dello Zaire e della Repubblica Centrale Africana;(176)

(ii) nel 1985 Weiss ed i suoi colleghi riportarono l'isolamento, dalle colture cellulari-T mitogenicamente stimolate di due pazienti con ipogammaglobulinemia comune variabile, un retrovirus che "era chiaramente imparentato all'HTLV-III/LAV". La prova comprendeva WB positivo ai sieri AIDS ed ibridazione con sonde dell'HIV;(177)

(iii) il DNA estratto dalle ghiandole tiroidee da pazienti con malattia di Grave ibridizza con "l'intera regione codificante della p24 del gag " dell'HIV;(178)

(iv) In uno studio volto a risolvere la questione se le cellule neuronali di pazienti con dementia complex AIDS siano infettati dall'HIV, "i cervelli di 10 pazienti con AIDS e dimostrazione neurologica di encefalite virale ed i cervelli di 10 pazienti senza infezione da HIV-1" vennero esaminati usando una sonda gag dell'HIV. "La ribosonda antisense ibridizzava a cellule che si sapeva erano infettate da HIV-1. Ibridizzava a cellule infettate da HIV-1 A3.01 come pure a linfociti splenici e renali ottenuti da autopsie di pazienti che si sapeva avevano l'AIDS. La sonda, tuttavia, non si ibridizzava ai neuroni nelle sezioni cerebrali di 10 pazienti con AIDS... Sorprendentemente, quando abbiamo applicato la sonda gag dell'HIV-1 complementare (control sense) alle sezioni cerebrali di pazienti con AIDS, abbiamo osservato ibridazione specifica alle cellule neuronali. In modo simile, quando vennero esaminate sezioni cerebrali di cinque individui non infettati dall'HIV-1, la sonda "senso"

individuò dei trascritti nelle cellule neuronali. Le nostre analisi sul Southern blot confermarono questi risultati e dimostrarono la presenza di un trascritto poliadenilato da 9,0-kb nei tessuti cerebrali".(179) Pertanto, o i segnali di ibridazione positiva ottenuti con la sonda antisense sono non specifici all'HIV oppure, come hanno concluso gli autori, vi è un trascritto specifico al neurone di 9,0 kb che mostra ampia omologia alle sequenze dell'HIV-1 gag

antisense e che questo trascritto viene espresso in cellule neuronali di individui sia infettati che non infettati dall'HIV-1;

(v) Horowitz et al "descrivono il primo rapporto della presenza di sequenze nucleotidiche imparentate all'HIV-1 nel DNA dell'uomo, dello scimpanzé e della scimmia Rhesus da normali individui non infettati". Hanno "dimostrato la presenza di una famiglia complessa di sequenze imparentate all'HIV-1" nelle specie di cui sopra e hanno concluso che "Ulteriori analisi di membri di questa famiglia aiuteranno a stabilire se sequenze endogene abbiano contribuito all'evoluzione dell'HIV-1 per via di eventi di riassociazione oppure se questi elementi, direttamente o attraverso prodotti proteici, influenzino la patogenesi dell'HIV".(180)

L'inevitabile conclusione è pertanto che gli studi di ibridazione non provano che le cellule-T od altre cellule dei pazienti AIDS e di quelli a rischio contengano un'unica entità molecolare il "DNA dell'HIV".

6.4.5 Nella seconda metà degli anni 80, per salvare il concetto di un "genoma dell'HIV", gli esperti di HIV fecero largo uso di un processo da poco scoperto conosciuto come reazione a catena della polimerasi (PCR). Sebbene la PCR sia uno strumento molto utile nella biologia molecolare, vi sono molti problemi associati al suo uso nello studio del "genoma dell'HIV":

(a) La PCR è una tecnica estremamente sensibile. Scrivendo della sua scoperta con cui ha vinto il Premio Nobel, Kary Mullis, lui stesso ironicamente scettico per le ipotesi sull'HIV/AIDS ha scritto, "Iniziando con una singola molecola la PCR può generare 100 bilioni di molecole simili in un pomeriggio".(181) Con una tale amplificazione non è difficile scoprire anche livelli molto bassi del "genoma dell'HIV". Tuttavia, "un fattore sorprendente dei risultati ottenuti" vicino al 1990 sia con la PCR che con l'ibridazione degli Southern/Northern standard, fu "la scarsità di assenza apparente del DNA virale in una parte di pazienti". (182). In un ulteriore sforzo di salvare il "genoma dell'HIV", negli anni 90 ricercatori del Dipartimento dell'Università di Genetica di Edinburgo introdussero una versione modificata del PCR, il metodo della doppio PCR o PCR nested. La doppia PCR sormonta il problema dell'amplificazione limitata delle rare sequenze del template". Riferirono che, "Usando una doppia reazione a catena di polimerasi che permette la scoperta di una singola molecola di provirus ed un metodo di quantificazione delle molecole provirali, abbiamo misurato le sequenze provirali in individui infettati fino ad un livello di una molecola per 105 PBMC... Come regola generale, solo una piccola parte di PBMC contiene campioni provirali (valore medio di campioni da 12 pazienti uno per 8,000 cellule)... campioni da 7 dei nostri 12 pazienti (60%) contenevano uno o più provirus per 104 cellule... mentre i campioni di tutti (il 100%) i nostri pazienti contenevano uno o più provirus per 80,000 cellule". Concludevano, "Il fattore più sconcertante dei risultati è il livello estremamente basso di provirus dell'HIV presenti nel PBMC circolante nella maggior parte dei casi".(182)

Non vi è alcun dubbio che la PCR "possa ingrandire un ago-DNA in un pagliaio-DNA", ma anche la PCR non può fare miracoli.

In una critica del libro di Neville Hodgkinson, "AIDS Il fallimento della Scienza contemporanea: come un virus che non c'è mai stato ha ingannato il mondo",(183), Sir Jhon Maddox ha scritto, "il virus che non c'è mai stato è stato reso più tangibile" agli inizi del 1985 quando "divenne chiaro che anche nei primissimi stadi dell'infezione da HIV, il virus è lontano dall'essere latente".(184) Maddox si sta riferendo a due saggi pubblicati in Nature nel 1995. Uno di Ho et al dove gli autori dichiarano di aver dimostrato che, in pazienti che non hanno ricevuto il trattamento antivirale, i "livelli virali del plasma variavano da... 15 X 10<sup>3</sup> a 554 X10<sup>3</sup> virioni per ml";(172) l'altro di Wei et al dove si dichiara che i "livelli virali dell'RNA del plasma in 22 soggetti in linea di massima variavano da 104,6 a 107,2 molecole per ml" e si concludeva che il loro studio "fa supporre che l'espressione virale in sè è direttamente coinvolta nella distruzione cellulare del CD4+. I dati non suggeriscono un "meccanismo da spettatore innocente di uccisione

cellulare a causa del quale le cellule non infettate o infettate in maniera latente si armino indirettamente per la distruzione per assorbimento di proteine virali o per reazioni autoimmuni".(173) Queste dichiarazioni provocano due quesiti ovvii:(1) "La maggior parte dei pirogeni esogeni sono microrganismi, i loro prodotti o tossine", ed i "pirogeni endogeni sono polipeptidi prodotti da una grande varietà di cellule nucleate dell'ospite compresi i monociti/macrofagi" ed i "linfociti, le cellule endoteliali, gli epatociti, le cellule epiteliali, i cheratinociti, i fibroblasti, come pure altre cellule... generalmente in risposta a stimoli iniziali provocati da infezione od infiammazione". Inoltre, risultano molti prodotti endogeni nella liberazione di pirogeni endogeni, causando in tal modo febbre. Tali sostanze endogene comprendono complessi di anticorpi agli antigeni, complessi con complemento, prodotti di dissociazione al complemento, metaboliti dell'ormone steroide, acidi biliari ed alcuni citochine.(185) Poiché "il virus [l'HIV] si replica 24 ore al giorno e *da uno al giorno*",(155) e "[vengono] prodotte e distrutte ogni giorno cellule del CDA 2X10<sup>9</sup>" e febbre e "molti dei fattori associati a febbre possono essere riprodotti da infusioni di citochine purificate, compresi il mal di schiena, mialgie generiche, artalgie, anoressia e sonnolenza,(185) è perciò sorprendente che tale infezione "massiccia" e distruzione cellulare possa rimanere ampiamente, se non totalmente, asintomatica per periodi prolungati di tempo in individui sieropositivi all'HIV;

(ii) Se vi è una tale "massiccia infezione da HIV, perché non viene scoperta dalle procedure di ibridazione standard e perché, per scoprire tale "massiccia" infezione, gli autori non usano la PCR che può ingrandire un ago-DNA in un pagliaio-DNA oppure anche la nested PCR, ma sono stati obbligati a determinare "l'RNA virale con nuove prove, "DNA ramificato modificato (bDNA) oppure analisi RT-PCR e confermate dal QC-PCR" per le quali non viene fornito alcun dettaglio?

Uno dei molti problemi(186,187) associati agli studi di Ho e Wei ed i metodi che usano viene illustrato in una presentazione alla XI Conferenza Internazionale sull'AIDS. Ricercatori della Scuola di Medicina, Camden, New Jersey presero un campione singolo di plasma da un paziente "con un conteggio cellulare CD4 di 123 cellule/cmm" e lo divisero in dieci aliquote. L'RNA di ciascun campione era trascritto all'inverso ed il cDNA "era quindi ingrandito con un DNA di controllo interno (imitativo) usando primer gag... il cDNA veniva anche associato dalle reazioni all'RT di dieci individui ed il QC-PCR veniva effettuato 10 volte sul cDNA associato". Riferirono che "Il numero medio delle copie di HIV-1 per le aliquote del plasma dei 10 individui era di 136.000 copie/ml di RNA con una deviazione standard di 76.900 copie/ml (range da 74.200 copie/ml a 334.600 copie/ml). Il numero medio di copie di HIV-1 per il cDNA associato testato 10 volte era di 145.900 copie/ml con uno scarto standard di 61.900 copie/ml (variazione da 84.500 copie/ml a 259.300 copie/ml)... l'RT non è l'origine della variabilità nel QC-PCR dell'HIV-1. Piuttosto, la variabilità è probabilmente dovuta alle differenze nell'allargamento del template target e del controllo interno usati nel test QC-PCR".(188)

Secondo Maddox e Wain Hobson sia Ho che Wei ed i loro colleghi furono in grado di raggiungere le loro sorprendenti conclusioni solo dopo un decennio di ricerca sull'HIV poiché hanno lavorato con matematici e poiché hanno potuto usare "Nuove tecniche per analizzare i bassi livelli del virus elevati a potenza!"(in corsivo) E' ironico quindi che la critica più forte di questi studi sia stata fatta da matematici come Frank Buianouckas del Dipartimento di Matematica e Scienza sull'Informatica, City University, Bronx, New York, USA, e Mark Craddock, Scuola di Matematica e Statistica, Università di Sidney, Australia. "Che cos'è questa viremia di bilioni di particelle di RNA che si può vedere solo con un PCR-derivato non documentato o PCR, ma non con un test funzionale di infettività?".(189) "La mia domanda è questa. Che cosa esattamente occorrerà per far sì che la gente che fa ricerche sull'HIV respinga l'alta tecnologia, metodi non dimostrati, speculazioni arcane sull'interazione molecolare eccetra, eccetra ed a chiedersi 'qualcuno

di voi ha la più pallida idea di che cosa stiamo facendo?"(191) Si può dire che le critiche sui saggi di Ho e di Wei da parte di individui del movimento dei dissidenti sull'HIV/AIDS non fossero inattese, ma è inconcepibile per un gruppo di esperti in HIV criticarne un altro come è successo con gli studi di Ho e di Wei.(191) Nel Luglio 1995, come risultato delle "perplexità" sulle asserzioni di Ho e Wei ed i loro colleghi, "due dozzine di ricercatori AIDS si riunirono a Berkeley, California ... per contestare la dichiarazione, scambiarsi copie dei loro manifesti e godersi la goduria di frequentare per 2 giorni compagni di pensiero "alternativo", che conclusero che HO et al e Wei et al "furono carenti nell'esigere la prova che le loro idee erano giuste"(192)

(b) Secondo i ricercatori dell'Istituto di Ricerca Walter Reed Army, "l'uso esteso della reazione a catena della polimerasi (PCR) per ritrovare il DNA provirale dell'HIV-1 ha favorito le analisi di corti ampliconi che vengono recuperati in modo più efficiente con questa tecnica".(193) Infatti, nella grande maggioranza dei casi, la presenza del "genoma dell'HIV" viene provata amplificando corte "regioni non varianti" di un "gene virale, solitamente del gene gag. Tuttavia poiché si accetta il fatto che una proporzione significativa dei "genomi dell'HIV" siano in difetto, il trovare un frammento di un gene non è la prova dell'esistenza dell'intero gene ed ancor meno della esistenza dell'intero genoma "DNA dell'HIV" o "RNA dell'HIV", un punto accettato da molti ricercatori HIV/AIDS.

(c) Se esiste un'unica entità molecolare "DNA dell'HIV", allora i primer stessi dovrebbero essere in grado di amplificarla, senza curarsi di dove si trovi tale DNA unico. Secondo gli stessi ricercatori, "A causa dell'estesa diversità genetica dell'HIV-1,

le opportunità di identificare un singolo paio di primer capace di amplificazione di diversi sottotipi sono limitate"(193,194). Infatti, i risultati dell'amplificazione ottenuta con primer per diversi geni da una sottospecie non sono in completo accordo. Per esempio, nel primo PCR dell'HIV", vennero usate due paia di primer per amplificare il gene gag e si trovò che "alcuni campioni riportavano un risultato positivo con solo una delle due paia di primer"(195) Si dice che negli USA ed in Europa gli individui siano quasi esclusivamente infettati dalla sottospecie B. Ancora ricercatori dell'Università di Edimburgo trovarono che "i risultati ottenuti con i primer gag ed env non erano in completo accordo. In 5 dei 28 replicati, veniva riprodotta sia la sequenza gag che env, ma non ambedue"(182) Fu effettuato uno studio sul PCR di 40 individui usando i primer dalle regioni LTR, gag ed env da parte di ricercatori Francesi compresi ricercatori dell'Istituto Pasteur: Al di fuori di 38 campioni positivi, "34 erano gag positivi (90%) mentre si scopriva l'env e l'LTR in casi inferiori, rispettivamente 24 campioni (63%) e 18 campioni (47%)... 11 dei 40 campioni erano positivi con tre paia di primer, 16 con due paia di primer e 11 con solo un paio di primer".(196)

Tale discrepanza può essere dovuta a:

- (i) "una reazione falso-positiva", che gli autori stessi presumono ma che ritengono improbabile;
- (ii) "la nota variabilità genomica dell'HIV". Se questo ne è il caso, allora non si può parlare di "genoma dell'HIV" essendo un'unica entità molecolare. Pertanto, se si prende in considerazione tale variabilità, allora ciò può essere dovuto solo alla perdita di un'immensa varietà di coppie di primer che impedisce a tutti gli Homo sapiens di essere "infettati dall'HIV";
- (iii) il genoma è difettoso.

(d) non si può ottenere alcuna informazione significativa da un test finché il test non venga standardizzato e si dimostri che è riproducibile. Tali dati non sono attualmente disponibili per la PCR. Infatti, poiché vi sono molte sottospecie di "HIV" e si devono usare primer diversi per sottospecie diverse o anche la stessa sottospecie, diventa estremamente improbabile che si possano mai ottenere tali dati.

(e) Sicuramente il parametro più importante di un test è la sua specificità, cioè, quanto spesso un test è negativo quando la condizione di cui si va alla ricerca è assente. Per la PCR si deve avere la prova che i primer:

(i) appartengano ad un unico retrovirus come definito nei procedimenti descritti al punto 6.1;

(ii) le sequenze dei primer vengano trovate solo in un unico retrovirus ed in nessun altro posto;

Non esiste tale prova per i primer dell'HIV". Infatti poiché non è possibile dire che cosa siano le sequenze del "DNA dell'HIV", ne segue che non è nemmeno possibile essere specifici su che cosa i primer rappresentino. Anche se si afferma che il "DNA dell'HIV" e perciò i primer sono specifici ad un retrovirus dal momento che:

(a) la maggior parte dei primer dell'"HIV" hanno origine dalle linee cellulari leucemiche HUT78 (H9), CEM e cellule EBV-trasformate;

(b) vi è la prova che le cellule leucemiche e le cellule EBV-trasformate contengono retrovirus endogeni, compresa la linea cellulare CEM;(88)

(b) la liberazione di retrovirus endogeni può essere causata dai metodi usati per "isolare l'HIV";

(d) Gallo stesso ha riferito che la linea cellulare HUT78 (H9) "conteneva sequenze provirali dell'HTLV [-I] (105)

(e) non esiste alcun metodo per separare un retrovirus da un altro;

è impossibile dire che le sonde del "DNA dell'HIV" siano HIV, o sonde del DNA di un retrovirus endogeno oppure anche un retrovirus esogeno HTLV-I;

(iii) in un campione di (RNA) i primer si legano solo a sequenze dell'HIV e non a qualsiasi altra sequenza non-omologa all'HIV o non-omologa. Ancora, non esistono tali dati.

Inoltre, accertato che:

(a) "circa l'uno per cento del genoma umano" consiste in sequenze endogene retrovirali;

(b) esistono omologie tra i geni di retrovirus endogeni ed esogeni, specialmente nei geni gag e pol, e tra

questi geni e retroelementi cellulari;

è molto improbabile il legame dei primer dell'HIV".

Anche se si sono provati i punti (i)-(iii) si può ancora determinare la reazione PCR, cioè dimostrare che non è stato ottenuto alcun risultato positivo in individui che non siano infettati da HIV. Ciò si può determinare solamente usando l'isolamento dell'HIV come un gold standard indipendente, cioè, confrontando la PCR con le procedure sotto descritte (vedi 6.1). Questo non è stato fatto, fatto accettato da uno dei ricercatori HIV/AIDS meglio conosciuti William Blattner "Una difficoltà nel testare la specificità e la reattività dei retrovirus umani (HIV compreso) è l'assenza di un 'gold standard'finale".(59)

(f) Attualmente alcune prove ottenute senza l'uso di un gold standard illustrano che la reazione PCR è non-specifica:

(i) C'è stato solo uno studio in cui sono state esaminate la riproduttività, la reattività e la specificità del PCR. In questo studio, il gold standard impiegato non era l'isolamento dell'HIV, ma lo status sierologico (il Western blot dell'HIV). In questa indagine, Christine Defer del Laboratorio di Ingegneria Molecolare, Centro Regionale di Trasfusione di Sangue, compresi i colleghi dell'Istituto Pasteur, ha studiato la validità del test PCR nei "Laboratori Seven French, con larga esperienza nella scoperta col PCR del DNA dell'HIV. Furono testati quattro gruppi di individui: quelli con risultati inequivocabili al test HIV-positivo" (ELISA confermato con Western blot); "individui a basso rischio di infezione HIV che si presentavano con un anticorpo al Western blot isolato e persistente"; "individui sieronegativi all'HIV-1 (all'ELISA) a basso rischio di infezione da HIV (donatori di

sangue)", ed "individui sieronegativi (all'ELISA) ad alto rischio di infezione da HIV (contatti omosessuali di un partner sieropositivo all'HIV)". Da "due diverse lastre cellulari mononucleari di sangue periferico... ciascuno consistente in 20 campioni", gli autori confrontarono i risultati del PCR

in soggetti sia sieropositivi che sieronegativi. Si trovò che la PCR non era riproducibile, "si osservarono risultati finto-positivi e finto-negativi in tutti i laboratori (la concordanza con la sierologia variava dal 40 al 100%), ed "il numero dei risultati positivi del PCR non differiva in modo significativo tra i sieronegativi ad alto ed a basso rischio";(197)

(ii) Il ritrovamento di una PCR positiva negli eosinofili fu interpretato "suggerire che gli eosinofili possano agire come cellule ospite per l'HIV-1".(198) Tuttavia, "Gli eosinofili formaldeide-fissati non si legano specificamente con le sonde dell'RNA malgrado la digestione con enzimi proteolitici e l'acetilazione... Quando le preparazioni vengono trattate con quantità di ribonucleasi adatte a distruggere l'RNA virale rimane il legame eosinofilo(199);

(iii) Un gruppo di ricercatori riferirono che "Mentre valutavamo un procedimento incrociato di PCR per la scoperta dell'HIV, trovammo che i primer per il gene dell'HIV-1 amplificano le sequenze umane satellite del DNA in una piccola proporzione di donatori di sangue per produrre un frammento che è vicino per dimensione al frammento autentico PCR dell'HIV in gel colorati con ethidium-bromide;(200)

(iv) Controlli ed anche tamponi e reagenti possono dare segnali PCR positivi all'HIV;(201)

(v) Monociti da pazienti HIV+ nei quali non si può scoprire nessun DNA dell'HIV, anche con la PCR, diventano positivi per l'RNA dell'HIV dopo coltura con normali cellule-T Con-A-attivate";(202)

(vi) generalmete viene accettato il fatto che una volta infettati dall'HIV, si è sempre infettati. Tuttavia un PCR positivo diventa negativo quando l'esposizione a fattori di rischio è discontinua.(203)

In uno studio di 327 lavoratori nel settore sanitario esposti, a causa di punture di siringa, al "virus umano da immunodeficienza", 4 avevano "uno o più test PCR positivi". Altri 7 avevano "un risultato indeterminato del test PCR sul campione iniziale. Gli ultimi campioni per tutti gli 11 erano negativi "nessuno si era sieroconvertito o aveva sviluppato antigenemia alla p24" e "tutti i soggetti rimanevano sani".(204,205) Mentre la dimostrazione di tale eventualità è sporadica negli adulti, è invece molto più spesso riscontrata nei bambini. Tuttavia non viene usato la PCR per diagnosi di routine nell'infezione da HIV negli adulti e raramente, se mai, ripetuto. A differenza degli adulti, la PCR viene usato molto spesso nei bambini, poiché si verifica il caso che la "diagnosi dell'HIV" viene complicata dalla persistenza di anticorpo materno acquisito passivamente".

Vicino al 1995 numerosi studi nei bambini(206-209) hanno rivelato la conversione di un PCR positivo ad uno negativo. Uno dei rapporti più recenti venne pubblicato nel 1995 da ricercatori francesi. In un gruppo di 188 bambini di sei anni "infettati" che fu analizzato retrospettivamente, 12 (il 6,7%) "manifestarono infezione da HIV". Ciascun bambino aveva almeno due risultati positivi di PCR a due separati momenti nel primo anno, seguiti da numerosi (superiori a 7) risultati negativi del PCR. Per la PCR i ricercatori usarono coppie di primer per le regioni dei geni gag, pol ed env; ed il test veniva considerato positivo "se almeno due geni erano amplificati". Commentando i loro risultati gli autori scrivevano, "Sono state usate due diverse stanze con aria condizionata per l'estrazione del DNA, la preparazione, l'ampiamiento ed il blotting del tampone-PCR.Gli ampliconi non sono stati mai trasferiti nell'area riservata alle sequenze non amplificate. Perciò i risultati positivi del PCR non sono probabilmente dovuti a contaminazione ... Ciò nonostante, poiché i nostri test vengono effettuati su cellule non manipolate, è impossibile la contaminazione delle colture che porti a risultati falsi positivi del PCR ... Riteniamo pertanto che la probabilità di contaminazione ripetuta su campioni successivi provenienti dallo stesso bambino sia scarsa". Gli autori "non poterono trovare alcuna correlazione

tra gli anticorpi sia neutralizzanti che quelli cellulari dipendenti dagli anticorpi mediante citotossicità e la manifestazione dell'HIV". Di 139 nati da madri HIV positive ma che erano "negativi in modo evidente", "otto erano positivi al PCR una volta per un singolo gene virale (pol), tre erano positivi due volte per il gene pol e una volta delle tre era anche positiva per il gene gag in un singolo test".(210)

Nel 1989, discutendo i loro studi sui retrovirus umani, ricercatori dell'Università di New York scrissero, "Senza tener conto dell'origine dei retrovirus umani, la loro presenza porta a questioni pratiche e teoriche. Attualmente, il principale fatto pratico è che l'uso effettivo del PCR come procedura di test per l'HTLV-I, l'HTLV-II e le infezioni da HIV deve sempre includere controlli appropriati per assicurarsi che nessuna sequenza endogena contribuisca a segnali positivi. Come precedentemente notato, i primer unici dell'HIV corrispondenti alla regione di trascrittasi inversa ben conservata mostrata nella figura 1 funzionano bene nell'ampiamiento del PCR del DNA HeLa anche a temperature di aggregazione (annealing) di circa 60° ... Un'altra questione pratica è che l'uso del PCR per determinare la possibile eziologia retrovirale di una varietà di malattie umane può essere complicato da retrovirus endogeni. Anche se i DNA vengono usati per template del PCR, si devono considerare le attività trascrizionali di sequenze endogene".(119) In un articolo pubblicato quest'anno dove discute le diagnosi di laboratorio dell'"infezione da HIV", Philip Mortimer ha scritto, "Esistono altri metodi diagnostici, p.es. il test antigenico, e l'amplificazione provirale del DNA e dell'RNA, ma è necessario che queste innovazioni nelle diagnosi dell'HIV si confrontino con il test anti-HIV e dovrebbero essere respinte fino a che non soddisfino una necessità che il test degli anticorpi non riesce ad incontrare.(211) Secondo i ricercatori dell'Università di Londra, "L'uso della reazione a catena della polimerasi (PCR) per le diagnosi dell'infezione da HIV sta diventando sempre più largo e sebbene non ancora interamente attendibile in confronto alla sierologia, è stato particolarmente valido contro i facenti uso di droghe intravenose sieronegativi all'HIV".(200) Se è necessario che la PCR si confronti con il test degli anticorpi all'"HIV" poiché è meno affidabile della sierologia, allora, dato che attualmente non vi è alcuna dimostrazione che attesti che un test positivo degli anticorpi all'"HIV" sia la prova di infezione da HIV,(89) non vi è altra scelta se non di essere d'accordo con Shoebidge et al che "fino a quando non verranno portati avanti ulteriori studi molecolari e biologici, non si potrà essere sicuri di che cosa sia realmente la manifestazione del DNA dell'HIV-1, anche quando si dimostri che è l'HIV-1.(212) Nell'analizzare la biologia molecolare dell'"HIV" non si può fare a meno di riflettere sulle parole di Sir John Maddox, "Non c'è il pericolo, in biologia molecolare, che il cumulo di dati vada talmente oltre l'assimilazione in una struttura concettuale che i dati si dimostreranno eventualmente un intoppo? Parte del problema è che l'eccitazione per la caccia lascia poco tempo alla riflessione. E ci sono sovvenzioni per produrre dati, ma difficilmente ve ne sono per soffermarsi sulla meditazione".(213)

**CONCLUSIONE** -- I dati presenti non provano l'esistenza di un'unica entità molecolare "il DNA dell'HIV" che costituisce il genoma di un unico retrovirus acquisito dall'esterno, l'HIV.

E non vi è neppure alcuna prova dell'esistenza di una "quasispecie dell'HIV". E non è nemmeno possibile dire che cosa esattamente rappresentino i diversi "DNA dell'HIV", le sonde ed i primer derivati da questi DNA e le sequenze nel DNA cellulare con le quali essi ibridizzano.

7. "L'isolamento dell'HIV: L'esistenza del retrovirus HIV fa presumere che l'HIV possa essere isolato dal DNA cromosomico di cellule infettate. Tale predizione è stata confermata come segue: i DNA dell'HIV-1 e dell'HIV-2 a

piena lunghezza sono stati preparati da cellule infettate dal virus e clonati in plasmidi batterici (Fisher et al., 1985; Levy et al., 1986; Barnett et al., 1993). Tali cloni sono totalmente privi di proteine virali e cellulari, e contaminanti cellulari che copurificano con virus purificato da gradienti di densità convenzionale. Pertanto, questi cloni sono anche privi dell'RNA dell'HIV genomico. I cloni infetti del DNA dell'HIV-1 e dell'HIV-2 infettano in modo fecondo le cellule umane per iniziare la riproduzione dell'HIV (Fisher et al., 1986; Barnett et al., 1993). Tali cellule transfettate contengono DNA specifico dell'HIV e producono particelle che contengono trascrittasi inversa; gli antigeni specifici dell'HIV (Fisher et al., 1985; Levy et al., 1986) hanno diametri di 100 nm al microscopio elettronico (Fisher et al., 1985), come ci si aspetta per i retrovirus".

7.1 Prima che la dimostrazione citata venga discussa nei dettagli, per evitare incomprensioni, sarà d'aiuto definire alcuni termini comprendenti la clonazione del DNA, la transfezione e la clonazione del virus, come pure la dimostrazione che si deve presentare per proclamare la prova di questi fenomeni:

Plasmidi - elementi che si riproducono liberamente, cromosomici circolari presenti nei batteri. Essi si duplicano indipendentemente dall'elemento principale cromosomico e vengono frequentemente usati per "trasportare" un frammento del DNA nella cellula.

Clonazione del DNA - la produzione di copie identiche di un frammento di DNA, qualsiasi frammento di DNA, da un frammento di DNA ancestrale congiungendolo in un veicolo adatto alla clonazione, per esempio un batteriofago o plasmide.

Transfezione - l'introduzione di DNA esogeno nelle cellule e la sua abilità di riprodursi ed esprimersi in queste cellule, cioè, la trascrizione del DNA nell'RNA, traduzione dell'RNA nelle proteine. Il materiale genetico non deve essere di origine virale e la trascrizione può essere ottenuta con vari metodi.

Nel lontano 1969 si sapeva che questi metodi possono comprendere "l'infezione delle cellule con batteri e virus, la formazione di ibridi di due tipi di cellule per fusione, il trapianto di nuclei isolati singoli in uova ed embrioni, la microintroduzione di nuclei e frazioni di mitocondri e assunzione pinocitica di DNA purificato". In quell'anno Margit Nass dell'Università della Pennsylvania, avvantaggiandosi "delle proprietà fagocitiche dei fibroblasti dei ratti (cellule L) fatti crescere in coltura di sospensione", dimostrò che "i fibroblasti dei ratti (cellule L) in coltura di sospensione incorporavano cloroplasti isolati di spinaci e violette africane e mitocondri isolati di fegato di pollo... Le cellule verdi si dividevano come cellule normali. Cloroplasti verdi si susseguivano per cinque generazioni cellulari o 5 giorni, in tale periodo le cellule ibride erano grandemente inferiori alle cellule di progenie non verde".(214) Nel 1989 si realizzò che la liberazione del DNA nelle cellule poteva essere facilitata dai reagenti policationici come il destrone poli-DEAE e la poliornitina. "Si aggiunge semplicemente un'aliquota di reagente acquoso all'esperimento della coltura del tessuto assieme al DNA o RNA di interesse".(215) (E' interessante che le colture/cocolture derivate da tessuti di pazienti positivi all'HIV o AIDS vengono trattate con il polibrene di policatione e/o agenti ossidanti che possono portare alla formazione di cationi). Nel 1990, ricercatori dell'Università del Wisconsin dimostrarono "che l'iniezione di RNA o DNA puro nel muscolo scheletrico del topo si conclude in una espressione significativa di geni "reporter" all'interno delle cellule muscolari... vettori di espressione dell'RNA e del DNA contenenti geni per acetiltransferasi del cloranfenicolo, luciferasi, e galattosidasi beta venivano iniettati separatamente nel muscolo scheletrico del topo in vivo. Si scoprì prontamente l'espressione delle proteine in tutti i casi e non era necessario alcun sistema speciale per questi effetti. L'estensione dell'espressione dei "costrutti" sia di RNA che di DNA era paragonabile a

quella ottenuta dai fibroblasti transfettati in vitro in condizioni ottimali".(216)  
L'anno dopo un altro gruppo di ricercatori degli Stati Uniti dimostrò che dopo l'iniezione nei cuori animali "del gene luciferoso della lucciola accoppiato alla catena pesante della miosina... il cuore può venire transfettato in vivo con maggiore efficienza del muscolo scheletrico"(217)

La clonazione del virus - l'introduzione nelle cellule di materiale genetico, il DNA o l'RNA per cui si sia provato in anticipo che è il genoma di un virus seguito dall'apparizione nelle stesse cellule di virus identici in ogni aspetto ai virus dai quali ha avuto origine il materiale genomico. Prima di poter rivendicare la prova della clonazione di un retrovirus, si deve:

(a) Ottenere una particella(particelle) separata da qualsiasi altra (isolata) e dimostrare che la particella contiene, fra altre molecole, proteine ed acidi nucleici (RNA), e che la particella(particelle) è proprio una particella infetta (vedi 6.1);

(b) Dimostrare che vi è una relazione diretta tra gli acidi nucleici delle particelle e le proteine, cioè le proteine vengono codificate dagli acidi nucleici (il genoma virale);

(c) Introdurre il genoma virale (RNA o DNA) nelle cellule e dimostrare che il DNA (cDNA) viene integrato nel DNA cellulare e viene trascritto nell'RNA e che l'RNA viene tradotto nelle proteine (transfetta le cellule);

(d) dimostrare che le cellule producono particelle e che le proteine delle particelle vengono codificate dagli acidi nucleici delle particelle;

(e) Dimostrare che gli acidi nucleici delle particelle e le proteine sono identici a quelli della particella ancestrale e che anch'esse sono particelle virali;

(f) Poiché tutte le cellule contengono genomi retrovirali, che in circostanze appropriate possono venire espresse nella coltura, cioè, sia le cellule nella coltura dalla quale si sono ottenute le particelle originali che le cellule transfettate possono liberare particelle retrovirali identiche anche se non vi è alcuna clonazione, quando si cerca di clonare un retrovirus una coltura del controllo è di significato quintessenziale. La sola differenza tra il controllo e le cellule transfettate con il genoma virale dovrebbe essere che nelle colture dei controlli si dovrebbero usare alcuni altri geni per la transfezione. Questo perché, in condizioni di coltura adatte, possa risultare proprio l'atto della transfezione nell'espressione retrovirale compresa la produzione di particelle retrovirali. E' ovvio che la clonazione del retrovirus non è sinonimo dell'isolamento del retrovirus, infatti, per la clonazione si deve isolare il virus due volte, la prima volta per ottenere il genoma virale e la seconda per provare che le particelle, se ve ne sono, liberate dalla cellula dopo l'introduzione del genoma virale, sono identiche a quelle dalle quali si è ottenuto originariamente il genoma.

7.2 Nel 1985 Fisher, Gallo ed i loro colleghi pubblicarono un articolo intitolato, "Un clone molecolare dell'HIV-III con attività biologica".(94) Il clone dei fagi  $\Delta$ HXB-(6.2.2) contenente provirus a piena lunghezza (-[segno a forma di onda]10 chilobasi, kb) con sequenze cellulari fiancheggianti (lunghezza totale 12,7 kb) venne inserito nel plasmide pSP62. "In modo simile, un frammento da 13,7 kb Eco RI di  $\Delta$ CH-1 (un clone molecolare contenente -[segno a forma di onda]9,0 kb di sequenze provirali dell'HTLV-1) fu inserito in "un altro plasmide, il pSV2gpt. "Questi costrutti del plasmide [pHXB-2D, pCH-1gpt] furono quindi transfettati nei batteri del DH-1 ed usati negli esperimenti di fusione dei protoplast. Furono usati come controlli il pCH-1gpt ed ancora un altro plasmide non contenenti "nessuna sequenza dell'HTLV (pSVneo)". (Non hanno spiegato il perché abbiano usato tre diversi plasmidi.). Cellule mononucleari di sangue del midollo spinale stimolate dalla PHA "vennero quindi fuse con i protoplasti batterici che portavano "i plasmidi". Si stabilirono per ciascun plasmide tre fusioni parallele usando cellule da individui diversi". (Non è chiaro se abbiano usato cellule provenienti da 3 o 9 individui, nell'ultimo caso questa è una ragione in più per cui le condizioni di clonazione non potevano essere state identiche).

(a) Il mezzo esaurito "fu concentrato 10 volte e testato per la presenza di transcriptasi inversa" usando l'A(n).dT15, ai giorni 5, 11, 14 e 18 dopo la fusione. Se le condizioni usate per la transfezione fossero identiche e se la trascrizione indicasse la presenza di un retrovirus, allora ci si aspetterebbe che l'RT sia presente nelle colture con il pHXB-2D e nelle tre colture con il pCH-1gpt. Tuttavia, si riportò l'attività sintetizzante del DNA solo nelle due colture con il pHXB-2D, (l'attività in una di esse era meno della metà dell'altra a ciascun punto di campionatura) e non viene fatta alcuna menzione riguardante l'attività nella terza coltura. Inoltre, per qualche ragione sconosciuta, si riportò l'attività sintetizzante del DNA solo per 18 giorni dopo la transfezione quando si diceva che fosse al massimo. Al contrario dell'attività dell'RT, la vitalità delle cellule nelle colture si determinò ripetutamente iniziando prima della transfezione e fino a 32 giorni dopo. I risultati vennero riportati come il mezzo delle tre colture per ciascun plasmide. Se la vitalità delle cellule fosse determinata dall'espressione del retrovirus presente nelle colture e se l'HIV e l'HTLV-I possedessero le proprietà attribuitegli, allora ci si dovrebbe aspettare che il numero delle cellule nelle colture contenenti pSV2neo rimanesse costante, nelle colture contenenti pHXB-2D diminuisse e nelle colture con pCH-1gpt aumentasse. Riferirono che tra il 18° ed il 32° giorno il numero delle cellule in grado di sopravvivere diminuiva in tutte le colture. La diminuzione era più pronunciata nelle colture con il "clone dell'HIV" ed apparve prima, "il 18°giorno, tuttavia, il numero delle cellule in grado di sopravvivere nelle colture transfettate con il pHXB-2D era caduto drammaticamente". In altre parole, la morte cellulare più alta avveniva prima della produzione massima dell'HIV (RT) ed anche prima che il "DNA dell'HIV" intero fosse integrato nel DNA cellulare (vedi sotto). Inoltre, poiché non si scoprì apparentemente alcuna attività dell'RT in una delle tre colture con il pHXB-2D, in questa coltura il numero delle cellule avrebbe dovuto rimanere costante.(=20)

(b) I risultati degli studi sull'ibridazione vengono dati solo per il pHXB-2D ed anche per solo una delle tre colture con questo plasmide. "La presenza delle sequenze dell'HTLV-III fu dimostrata con le analisi del Southern blot" usando l'"inserto" dal clone molecolare  $\Delta$ BH-10, "un clone incompleto virale dell'HTLV-III." "Una banda da 10-kb, corrispondente al virus lineare non integrato, fu scoperta nei campioni di DNA non assimilato preparati 14 giorni dopo la transfezione. L'assimilazione con l'XbaI rivelò tre bande distinte a 11,10 e 5,2 kb... queste bande rappresentano probabilmente le forme rispettivamente tagliate circolari, lineari e chiuse circolari dell'HTLV-III... L'assimilazione con l'HindIII, un enzima che taglia il genoma dell'HTLV-III sei volte ha prodotto bande a 4,5, 2,0 (doppietta), 1,7 e 0,6 (una doppietta)... Questo modello di restrizione è chiaramente diverso da quello dell'H9/HTLV-IIIb... Non vennero osservate "macchie" molecolari della massa relativamente ampie quando il DNA venne assimilato con il BamHI. Tuttavia, non abbiamo alcuna prova diretta che il DNA dell'HTLV-III tranfettato venga integrato nel genoma cellulare dell'ospite... In esperimenti nel corso del tempo (Fig.36), il DNA isolato da una singola coltura 6,11,14, 18 e 31 giorni dopo la transfezione con il pHXB-2d venne assimilato con il BamHI ed analizzato per le sequenze dell'HTLV-III. Sei giorni dopo la transfezione si scoprì un frammento del DNA da 8,6 kb come banda debole; 18 giorni dopo la transfezione fu possibile scoprire un frammento del DNA da 1,5 kb in aggiunta al frammento da 8,6 kb... 31 giorni dopo la transfezione non si scoprì alcuna sequenza dell'HTLV-III". Malgrado queste scoperte, gli esperimenti nel corso del tempo furono interpretati "come la prova che le cellule originariamente transfettate con il pHXB-2D sono in grado di produrre virus completamente infetto che viene quindi trasmesso all'interno della coltura"!

(c) I linfociti del cordone ombelicale transfettati dal pHXB-2D vennero fatti reagire con "anticorpi monoclonali contro le proteine p24 e p15 collegate al gag dell'HTLV-III... la massima espressione venne osservata 15 giorni dopo la transfezione, quando il 4-11% ed il 5-9% delle cellule erano reattive con l'anticorpo alla p15 ed alla p24, rispettivamente (dati non dimostrati)... A

confronto, tra le colture dell'H9/HTLV-III, una proporzione molto più ampia di cellule (70-90%) era positiva per la p24 e la p15". Oltre ai molti problemi associati all'interpretazione di una reazione positiva degli anticorpi/antigeni specialmente con le cellule del cordone ombelicale e gli antigeni del gag (anticorpi), come provanti l'infezione da HIV, è inoltre interessante notare che:

(i) le reazioni massime degli anticorpi/antigeni precedettero l'attività massima riportata dell'RT e le bande di ibridazione;

(ii) Non viene fatto alcun accenno riguardante la reazione degli anticorpi con le cellule transfettate dalla pSV2-neo, ma le cellule del sangue del cordone rimosse 18 giorni dopo la transfusione con la pCH-1gpt (clone dell'HTLV-I) non venivano codificate da questi anticorpi". Tuttavia, come dichiara Gallo:

(a) i geni del gag dell'HIV e dell'HTLV-I sono omologhi;

(b) c'è una cross-reazione tra le proteine p24 dell'HTLV-I e dell'HIV-1;

la scoperta riportata per cui gli "anticorpi monoclonali contro le proteine collegate al gag dell'HTLV-III" non reagivano con le cellule dalla pCH-1gpt è inspiegabile.

Le loro scoperte immunologiche li portarono a scrivere, "La scoperta che, a qualsiasi stadio, solo una popolazione minore delle cellule transfettate viene apparentemente infettata dal virus (<15% di proteine espresse) suggerisce che gli effetti citopatici possano non risultare unicamente dall'infezione virale diretta". Tuttavia, la drammatica caduta delle cellule in grado di sopravvivere nelle colture infettate dalla pHXB-2D dove solo una minoranza di cellule vengono "infettate" è causata direttamente od indirettamente dal "clone dell'HTLV-III con l'attività biologica" (effetti citopatici), poiché tali effetti non sono stati osservati anche nella linea cellulare dell'H9/HTLV-III dove viene infettata una percentuale molto più alta di cellule, ma tali cellule si dividono illimitatamente? Specialmente quando si considera il fatto che la linea cellulare dell'H9 (HUT78) ha origine da un paziente che "aveva malignità di cellule mature T4"(6).(=20)

(d) Fisher e colleghi pubblicarono una fotografia elettronica mostrante particelle simil-virali extracellulari ma non innestanti, alcune delle quali avevano un diametro di 100nm. Tuttavia non provarono che le particelle erano particelle virali od anche che esse avevano altre caratteristiche morfologiche e fisiche delle particelle retrovirali.

7.3 Nel 1986 Levy ed i suoi colleghi pubblicarono un saggio intitolato "Il clone del retrovirus dell'AIDS (ARV-2) si riproduce nei fibroblasti umani ed animali transfettati"(218) Il clone molecolare ^9-B dell'ARV 2 (vedi 6.2.3) venne inserito nel plasmide pSp65. Il p9B-7 così ottenuto ed il ^9B-7 vennero usati per transfettare la linea cellulare umana monocitica U937 come pure le linee cellulari Jurkat e Hut-78. Si scoprì l'ARV per la presenza di "attività dell'RT nel soprannatante da coltura... la produzione dell'ARV fu scoperta nelle cellule JURKAT e U937 dal 36° fino al 44° giorno dopo la transfusione per la presenza di attività di transcriptasi inversa (RT)... Al 5° giorno si scoprì la riproduzione del virus nella linea HUT-78 con attività dell'RT che raggiungeva oltre i 200,000 cpm/ml... Successivamente il virus da ciascuna coltura fu passato alle cellule umane normali periferiche mononucleari stimolate da mitogene (PMC)... L'attività di transcriptasi inversa aumentò ad oltre 106 cpm/ml entro 14 giorni dopo che il virus dalle cellule HUT-78 era passato al PMC umano fresco". Vennero anche transfettate le cellule del NIH 3T3 (topo), MINK (polmone del visone), del COS-7 (scimmia verde africana) e del rhabdomyosarcoma RD-4 (umano). Si scoprì l'attività dell'RT in tutte le cellule tra il 5° ed il 14° giorno dopo la transfusione. "La scoperta del virus fu aumentata dalla co-coltivazione delle cellule dei fibroblasti con PMC umano normale stimolato da mitogeni... aggiunto ogni tre fino a sei giorni". Gli estratti delle proteine del "PMC infettato con il virus recuperato da cellule di MIL transfettato", cellule del COS-7 e HUT-78, furono sottoposti a elettroforesi e reagirono con "il siero

positivo per gli anticorpi all'ARV... Gli estratti delle cellule di HUT-78 infettate ed il PMC contenevano tutti gli antigeni dell'ARV come dimostrato dall'immunoblotting (Fig.2). Questi includevano le proteine dell'involucro gp160, gp120, gp41 e le proteine del gag dal peso molecolare di 55K, 25K e 16 K". Non si riportarono tali reazioni con il PMC "non infettato".

Tuttavia, anche Montagnier ha riferito che almeno una proteina, la gp41 da cellule non infettate reagisce con i sieri dei pazienti. La differenza può essere dovuta al fatto che apparentemente Montagnier ha stimolato le cellule non infettate, ma Levy non l'ha fatto. Inoltre, mentre nelle cellule normali non stimolate i sieri dei pazienti non reagiscono con una proteina p16-18, le stesse proteine vengono rinvenute nelle cellule normali, non infettate, ma stimolate.(219-222) Levy ed i suoi colleghi trovarono anche che "Il virus recuperato da tutte le cellule era citopatico per le cellule dell'HUT-78... Il virus prodotto nelle cellule dell'HUT-78 mostrò effetti citopatici(fusione, degenerazione del pallone) tipici dei retrovirus dell'AIDS". Se gli effetti citopatici sono causati da un virus che si è manifestato come risultato della clonazione, allora Levy et al sono riusciti a provare un effetto dell'HIV sull'HUT-78 che ad oggi nessun altro è riuscito a dimostrare. (E' vero che nel 1986 nessuno, a parte Gallo ed i suoi colleghi, sapevano che l'HUT78 è attualmente l'HT(H9).

7.4 Nel 1993 Barnett, Levy ed i loro colleghi pubblicarono un saggio intitolato "Distinguendo i fattori di un clone molecolare infetto del ceppo di tipo 2 UC1 del virus umano da immunodeficienza altamente divergente e non citopatico". Questo studio di Barnett, Levy et al si riferisce all'HIV-2. Dal momento che si dice che l'HIV-2 è completamente diverso dall'HIV-1, il suo isolamento o clonazione, anche se veri, non è la prova dell'isolamento o della clonazione dell'HIV-1. Ciononostante, dal momento che è stato citato, possono essere utili alcuni commenti. Il "virus clonato molecolarmente (l'HIV-2UC1mc o UC1mc) si è ottenuto come segue: Il DNA cellulare delle "cellule SupT1 infettate da UC1", fu sottoposto a digestione parziale con l'EcoRI. I prodotti della digestione furono frazionati per dimensione su gradienti di NaCl e quindi legati all'EMBL4 digerito con l'EcoRI. Le placche furono esaminate con ibridazione ad un miscuglio di sonde di DNA comprendenti il virus scimmiesco da immunodeficienza del macaco, il clone E2 del cDNA dell'env dell'HIV-2ROD ed una preparazione di HIV-1SF" arricchita con sequenze del gag-pol... Vennero proiettati approssimativamente 2 milioni di placche e si ottennero 12 placche positive seguendo cicli successivi di purificazione ed ibridazione delle placche. Di questi 12 cloni positivi si trovò che solo uno conteneva il DNA provirale dell'HIV-2 a piena lunghezza seguendo le analisi degli enzimi di restrizione. L'UC1mc clonato con Lambda venne transfettato nelle cellule dell'RD per precipitazione di fosfato di calcio e si recuperò il virus infetto seguendo la co-coltivazione di queste cellule con PBMC normale stimolato da fitoemagglutina e questo "virus" venne usato per essere trasferito alle altre linee cellulari. Si ottenne la prova della clonazione del virus e dell'esistenza del "virus infetto" come segue: "Si testarono soprannatanti da coltura ogni 3 o 4 giorni per l'attività di transcriptasi inversa. Si testarono inoltre campioni cellulari per espressione di proteine virali con un test di immunofluorescenza indiretta. Si esaminarono le colture ad intervalli di 2 o 3 giorni con microscopio ottico per gli effetti citopatici come l'apparizione di sincizi, cellule larghe, rigonfiamento cellulare e detriti cellulari. Si stabilirono i calcoli della vitalità cellulare per esclusione con colorante trypan blu. Le analisi dell'immunoblot vennero effettuate come descritto precedentemente usando i lisati del virus preparati per i soprannatanti da colture cellulari di cellule del Molt4/8 infettate dal virus. I sieri provenivano da individui infettati da HIV oppure da un coniglio immunizzato con gp120 di HIV-2St ricombinante". Riferirono, "l'UC1mc cresceva bene nelle linee cellulari-T del Supt1, Molt4/8 e HUT78, ma non mostrava infezione produttiva di cellule (del) Jurkat o CEM... l'UC1mc dimostrava una relativa incapacità ad indurre la formazione dei sincizi, ad uccidere le cellule ed a sottomodulare l'espressione del CD4 delle superfici nelle cellule infettate

(Levy ed i suoi colleghi concordano ora con l'us80 che la perdita apparente delle cellule del CD4 non è dovuta alla loro distruzione da parte dell'"HIV", ma all'abilità delle colture di "sottomodulare l'espressione del CD4 delle superfici"?)... Le dimensioni molecolari delle proteine virali dell'UC1mc e la loro reazione con i vari sieri vennero determinate dalle analisi dell'immunoblot. Mentre la maggior parte delle proteine virali dell'UC1 e UC1mc erano reattive ai sieri da individui infettati dall'HIV-2, la glicoproteina della superficie cellulare dell'Env (gp140: SU) era solitamente poco reattiva a questi sieri a confronto delle gp 140 di altri ceppi virali dell'HIV-2 (p. es. l'HIV-2UC3 mostrato). Al contrario, le molecole delle gp140 dell'UC1mc e dell'UC1 sembravano reagire bene all'antisiero dei conigli specifico dell'Env scatenato contro la proteina ricombinante dell'HIV-2STSU". Per la caratterizzazione molecolare dell'UC1mc, "L'intero genoma dell'UC1mc fu sottoposto ad analisi delle sequenze del DNA per determinare la sua struttura genetica e la relazione della struttura delle sue proteine derivate a quelle di altri ceppi virali dell'HIV conosciuti. Si trovò che la sequenza provirale del DNA dell'UC1mc era lunga 10.271 bp e che la sua struttura genetica nel complesso sembrava simile a quella di altri ceppi virali sequenziali dell'HIV-2... Per analisi di sequenza, l'UC1mc sembrava differire sostanzialmente da molti altri ceppi virali dell'HIV-2. Le differenze erano più evidenti nelle percentuali molto basse di identificazione delle sequenze degli amminoacidi dell'Env; le proteine virali regolatrici Tat, Rev e Nef; e le proteine accessorie virali Vif, Vpx e Vpr. La differenza dell'UC1mc era più sottile, ma tuttavia significativa nelle proteine del Gag e del Pol generalmente più conservate"(223 in corsivo).

## 7.5 COMMENTI

Nè Fisher et al e nemmeno Barnett et al hanno esaudirono le condizioni assolutamente necessarie per affermare la clonazione di un retrovirus, l'HIV. Nè era possibile per loro fare ciò. Per clonare molecolarmente un virus, prima si deve ottenere l'RNA retrovirale e questo può essere ottenuto solo isolando il retrovirus. NESSUN ISOLAMENTO, NESSUNA CLONAZIONE. Tuttavia, ad oggi non solo nessun ricercatore ha isolato un retrovirus unico da tessuti freschi di pazienti AIDS od anche da colture/co-culture contenenti materiali da questi pazienti, ma nemmeno nessun ricercatore ha provato l'esistenza di particelle, virali o non virali, che soddisfino le principali proprietà morfologiche e fisiche dei retrovirus.(146) Fisher et al, Levy et al e colleghi, con vari mezzi, ma con nessuna prova che esso appartenesse ad una particella, qualsiasi particella, estrassero frammenti di DNA, in nessun caso due di essi erano gli stessi per composizione o lunghezza, e lo chiamarono "DNA dell'HIV"(vedi 6.2). Successivamente, cercarono di introdurre il "DNA dell'HIV" nelle cellule usando tecniche ben conosciute per mezzo delle quali è possibile introdurre qualsiasi DNA, virale o non virale, nelle cellule. Senza tener conto di ciò che si intende per "DNA dell'HIV", date le tecniche che usarono, è molto probabile che vi riuscirono. Comunque, la prova si può ottenere solo mettendo in sequenza "il DNA dell'HIV" sia prima che dopo la clonazione nelle cellule e nessuno di questi gruppi lo fece. La sola prova presentata dai ricercatori di cui sopra a questo risultato e perciò alla clonazione del virus è stata:

(a) La scoperta nelle colture cellulari di attività dell'RT (trascrizione dell'A(n).dT15);

(b) Il ritrovamento nelle cellule di proteine ("le proteine dell'involucro gp160, gp120 e gp41 e le proteine del gag del peso molecolare di 55K, 25K e 16K) che reagiscono con gli anticorpi alla p24 e/o con i sieri da pazienti AIDS.(=20)

Tuttavia, fino ad ora, nessuno ha provato che qualsiasi proteina sopra descritta che è presente negli estratti cellulari e che può reagire con i sieri di pazienti AIDS viene effettivamente codificata dai quadri di lettura aperti dell'env e del gag dell'"HIV"(vedi 5). Né la presenza di particelle simil-virali nei soprannatanti da coltura né la trascrizione dell'A(n).dT15 sono la prova

dell'esistenza dell'HIV o di qualsiasi retrovirus endogeno od esogeno (vedi 3.0). Anche se ci fosse la prova che le particelle erano effettivamente retrovirali e che la trascrizione inversa dell'A(n).dT15 veniva provocata da un enzima retrovirale, che le proteine erano proteine retrovirali e che gli anticorpi erano specificamente diretti contro tali proteine, il loro ritrovamento nelle colture cellulari non è la prova della transfezione del "DNA dell'HIV" ed ancor meno della clonazione dell'"HIV". Tutti questi fenomeni possono essere causati da un retrovirus endogeno, specialmente se si considera il tipo di cellule usate, linfociti leucemici e del cordone ombelicale e la condizione, tecniche di stimolazione chimica e di co-cultura. Secondo Kurth ed i suoi colleghi, "durante gli anni passati si è accumulata la prova indiretta che alcuni luoghi provirali endogeni si devono esprimere anche negli esseri umani... L'espressione di informazioni retrovirali venne anche suggerita dalla dimostrazione di attività di transcriptasi inversa e dalla scoperta di antigeni cross-reattivi agli antigeni retrovirali animali in una varietà di cellule e tessuti umani".(116) I sieri di pazienti AIDS contengono anticorpi diretti contro molti auto e non-auto antigeni compresi i linfociti(89,224,225) ed i sieri dal 70% dei pazienti AIDS reagiscono con gli antigeni dei "Virus in tutti noi", cioè, i retrovirus endogeni.(175) In una pubblicazione del 1989 di ricercatori in Svezia, Giappone e USA si legge: "Negli anni 60 e 70 erano disponibili delle nuove tecniche (morfologiche, immunologiche e biologiche molecolari)... non solo per trovare retrovirus esogeni od endogeni, ma anche per collegare l'espressione retrovirale a certe malattie umane... Studi al microscopio elettronico rivelarono particelle con una morfologia retrovirale in molti tessuti umani normali e neoplastici ed anche nel latte, nell'urina e in molte altre effusioni. Vennero sviluppati sensibili radioimmuno-test che portarono alla scoperta di antigeni [comprese le proteine del gag nei sieri di sangue del cordone ombelicale] collegati alle proteine di noti retrovirus esogeni del template del topo e si trovò la trascrizione inversa (RT) in tessuti normali e neoplastici diversi"(108) "Vengono espressi tre mRNA poliadenilati dell'HERV-R [retrovirus-R endogeno umano] (9,7,3 e 3,5 chilobasi) nel primo trimestre e nel periodo di tempo dei villi della placenta. Un'ampia ricerca dell'espressione dell'HERV-R nei tessuti umani rivelò che anche molti altri tessuti esprimevano gli RNA da 9 e 3,5 chilobasi ad un livello circa del 10% di quello nella placenta... La maggiore espressione oltre ai villi placentali era nella linea cellulare leucemica monocitica U937", una delle linee cellulari impiegate da Levy et al. Un'altra delle linee cellulari usate da Levy et al nello studio del 1986, la COS-7, proveniva da una scimmia verde africana. Da allora in poi si è dimostrato che le scimmie verdi africane venivano infettate con il SIV ed anche prima, nel 1983, si diceva che venivano infettate con "il virus della leucemia di cellule-T adulte".(226=20) La linea cellulare dell'RD usata da Levy è una linea cellulare del rabdosarcoma umano e da molti anni si sapeva che queste cellule esprimevano informazioni virali e liberavano particelle simil-retrovirali.(227) Per clonazione, Fisher et al e Levy et al ottennero il loro "DNA dell'HIV" dalla linea cellulare dell'HUT78 (H9). Questa è anche la linea cellulare dalla quale Fisher e colleghi ottennero la maggior parte delle loro prove della "clonazione dell'HIV-1". Anche ammesso che il "DNA dell'HIV" sia proprio retrovirale, per la qual cosa non vi è alcuna prova, non si può sostenere che sia il "genoma dell'HIV". Secondo Gallo la linea cellulare dell'HUT78 (H9) viene infettata dall'HTLV-I.(6) Se così fosse, allora tutte le colture cellulari dell'HUT78 ed i cloni da esse derivate, "infettati dall'HTLV-III" o non -infettati, ed il materiale da queste colture con bande a 1,16 gm/ml, dovrebbero contenere l'HTLV-I e perciò l'RT e le particelle retrovirali. Inoltre, poiché circa il 25% dei pazienti AIDS hanno anticorpi all'HTLV-I e le proteine immunogeniche dell'HTLV-I e dell'HIV hanno gli stessi pesi molecolari, quindi approssimativamente il 25% delle colture dell'HUT78 (H9) non infettate in aggiunta all'RT ed alle particelle, dovrebbero avere, nel Western blot, le stesse bande delle colture "infettate dall'HTLV-III". Perciò, gli estratti cellulari da cellule dell'HUT78 e dai Western blot appariranno erroneamente positivi per l'HTLV-III. Sia i gruppi di Gallo che di Montagnier hanno dimostrato che i geni del gag e del pol

dell'HTLV-I e dell'HIV-I sono omologhi. Ciò significa che la linea cellulare dell'HUT78 dovrebbe avere sequenze del "DNA dell'HIV" anche quando non transfettata con il "DNA dell'HIV".

Al contrario di Fisher et al, Levy non ha svolto studi sull'ibridazione. Tuttavia Fisher, Gallo ed i loro colleghi non hanno potuto trovare la prova che il "DNA dell'HTLV-III viene integrato nel genoma cellulare dell'ospite", un passo assolutamente necessario nella clonazione e nella produzione di retrovirus. E nemmeno nessuno di questi ricercatori ha dimostrato che il DNA viene trascritto nell'RNA. Per transfezione, oltre a provare l'integrazione del "DNA dell'HIV" nel genoma cellulare dell'ospite e la sua trascrizione nell'RNA, si deve anche provare che l'RNA viene tradotto nelle proteine.

**CONCLUSIONE--** Per dichiarare che l'esistenza dell'HIV retrovirale fa presumere che si può isolare il DNA dell'HIV dal DNA cromosomico di cellule infettate", si deve avere prima la prova dell'esistenza di un'unica molecola del DNA che sia il genoma di un'unica particella retrovirale, l'HIV-1, che può essere ottenuta solo isolando la particella retrovirale. Attualmente non vi è tale prova. Fisher et al e Levy et al estrassero una porzione dell'RNA che dal soprannatante di cellule dell'HUT78 "infettate" si associava a 1,16 gm/ml o aveva una certa lunghezza, la trascrissero all'inverso e la chiamarono "DNA dell'HIV-1" (vedi 6.2.2; 6.2.3). Tuttavia, poiché né loro né nessun altro prima o dopo di loro ha dimostrato che questo RNA (cDNA) era anche la parte costituente di una particella, di qualsiasi particella retrovirale od altro, non può essere fondata l'affermazione che il DNA è l'"HIV a piena lunghezza" o "specifico dell'HIV". Negli estratti cellulari delle cellule "transfettate" Fisher et al e Levy et al trovarono alcune proteine con pesi molecolari simili alle "proteine dell'HIV" che reagivano con i sieri di pazienti AIDS. Trovarono inoltre la trascrizione inversa dell'A(d9n)dT15 nel soprannatante cellulare, ma non presentarono alcuna prova che le proteine o l'RT erano costituenti di una particella, virale od altro, e perciò non possono affermare di aver provato che le cellule "transfettate" "producono particelle che contengono transcriptasi inversa, antigeni specifici dell'HIV". Sebbene Fisher et al avessero un micrografo elettronico che mostrava particelle simil-virali nel soprannatante da coltura, non provarono che le particelle erano proprio particelle retrovirali, oppure che avevano anche alcuni dei fattori morfologici e fisici estremamente fondamentali delle particelle retrovirali e che perciò "che potevano riflettere complessivamente materiale non-virale".

Fisher et al, Levy et al e Barnett et al non hanno iniziato con l'RNA (cDNA) di cui avevano la prova che fosse un retrovirus dell'RNA e non hanno ottenuto particelle retrovirali di cui avevano la prova che contenessero lo stesso RNA, un requisito estremamente fondamentale per la clonazione. Infatti diedero prova di non poter affermare la transfezione delle cellule con un DNA, virale o non-virale.

## 8. "L'IDENTIFICAZIONE DELL'HIV"

8.1 "L'esistenza dell'HIV fa presupporre che le cellule infettate contengano un unico DNA, specifico del virus di 9150 nucleotidi che possono essere trovati nel DNA di cellule non infettate".

Il genoma di un retrovirus non può essere identificato sulla base della lunghezza di un frammento dell'RNA (cDNA) e della sua presenza in alcune, ma non in altre cellule.

8.1.1. Usando frammenti di "DNA dell'HIV" come sonde di ibridazione o primer, si sono ottenuti dei risultati positivi sia con l'ibridazione standard che con la PCR dal DNA di cellule umane "non infettate" ed di insetti (vedi 6.4.4.). E' un fatto che:

(a) l'ibridazione di acidi nucleici di retrovirus esogeni "da specie diverse da un campione che è lo stesso di quello della correlazione filogenica tra i loro ospiti naturali", (228) una relazione che portò i retrovirologi a concludere che i retrovirus esogeni "sono derivati dai geni cellulari";

(b) si è provata l'esistenza di retrovirus endogeni umani usando sonde di ibridazione derivate da retrovirus animali endogeni ed esogeni.

Se questo è il caso e se il "DNA dell'HIV" è il genoma di un retrovirus umano esogeno, il genoma umano non-infettato dovrebbe contenere sequenze che ibridizzerebbero con le sonde del "DNA dell'HIV". Ci possono essere due ragioni per cui tali scoperte non sono state riportate più spesso:

(i) molti ricercatori sull'HIV ignorano uno dei requisiti fondamentali della ricerca sperimentale di base, cioè, i controlli. Nei rari casi in cui vengono impiegati i controlli, non sono adatti (vedi 6.1). Negli anni 70 Gallo, Gillepsie ed i loro colleghi andavano dicendo che il successo del "test di ibridazione sembra dipendere dalla storia biologica del virus" e dallo stato fisiologico delle cellule. (125,228) In un vasto studio pubblicato nel 1975 intitolato "La relazione tra i componenti nei virus tumorali dell'RNA del primate e nel citoplasma delle cellule leucemiche umane: induzioni alla leucemogenesi, lo scopo era quello di dimostrare che le cellule della leucemia umana ma non quelle normali hanno proprietà associate ai retrovirus comprese le sequenze genomiche retrovirali. E' stato riferito che "La particella citoplasmica cellulare di sangue leucemico umano che contiene attività di transcriptasi inversa è capace di sintetizzare il DNA in vitro, usando RNA endogeno sia come template che come primer. Questa attività endogena è stata usata per studiare la natura della particella stessa. Molte particelle citoplasmiche intracellulari od organelli (descritte in generale nella Tavola 8)

possono provocare la sintesi del DNA endogeno in vitro. Queste includono i mitocondri, piccole particelle citoplasmiche di bassa intensità, 1,10-1,16 g/cc in gradienti di densità con sucrosio, e piccole particelle citoplasmiche di densità più elevata, 1,17-1,19 g/cc in gradienti di densità con sucrosio... Si sono scoperte piccole particelle nella frazione citoplasmica di linfociti stimolati da fitoemagglutinina da donatori normali... Queste particelle provocarono la sintesi del DNA endogeno e la popolazione del DNA risultante conteneva sequenze collegate ai genomi dei virus tumorali dell'RNA... Vennero trovate sequenze collegate al virus in pazienti con diversi tipi di leucemia, compresi l'AML, il CML, il CML-A ed il CLL... Il tentativo di scoprire sequenze virali nell'RNA di cellule leucemiche ibridando il DNA sintetizzato da virus animali all'RNA isolato da piccole particelle citoplasmiche (l'esperimento di ibridazione reciproca) in nostre mani non riesce a trovare differenze nelle sequenze nell'RNA delle cellule leucemiche e dividendo il sangue bianco periferico umano normale (stimolato dalla PHA). E' stato riferito da altri che le sonde del DNA radiattivo sintetizzate da MuLVR ibridano all'RNA citoplasmico dalle

cellule leucemiche, ma non da quelle di sangue bianco normale.

Una differenza tra i nostri esperimenti e quelli precedentemente riportati è che le cellule umane normali usate come fonte dell'RNA si stanno attivamente separando, mentre molte di quelle usate negli studi precedenti non lo facevano" (125-in corsivo);

(ii) L'"RNA dell'HIV" non è un retrovirus né esogeno né endogeno e nemmeno il frammento del DNA trascritto presente in cellule non-"scioccate".

8.1.2 Si è trovata la maggior parte dei risultati positivi in "cellule non infettate" usando sonde e primer per uno o al massimo due geni oppure anche frammenti del gene. La "grande maggioranza" degli studi sull'HIV comprendono dal "2% al 30% del genoma". (163) Tuttavia, trovare il frammento di un gene od anche un gene non è la prova dell'esistenza del genoma dell'HIV.

8.1.3 Montagnier ed i suoi colleghi riferirono che il "DNA dell'HIV" è di 9=1 1,5 Kb91, mentre Gallo ed i suoi colleghi riferirono che "La lunghezza complessiva del provirus dell'HTLV-III è approssimativamente di 10 chilobasi"(96) Nel primo studio di Levy e colleghi del "genoma dell'HIV", la "banda larga (>15 Kb) rappresenta il provirus integrato nel DNA cellulare dell'ospite"(98) Nel 1995, ricercatori del Pasteur riferirono che si era determinata la sequenza nucleotidica 9193 completa del probabile agente causa dell'AIDS, il virus associato a linfadenopatia (LAV). La struttura genetica derivata è unica; mostra, oltre ai geni retrovirali dei gag, pol ed env, due nuovi quadri di lettura aperti che chiamiamo Q ed F"(229) Nello stesso anno Gallo ed i suoi colleghi riportarono i loro risultati sulle sequenze nucleotidiche dell'"HIV" usando il clone BH10, ma aggiunsero anche, "La sequenza dei rimanenti 182 bp del provirus dell'HTLV-III non presente nel clone BH10 (compresa una porzione del sito che si associa al primer dell'R, V5, tRNA ed una porzione della sequenza del collettore) era derivata dal clone HXB2... E' da notare la presenza del quinto quadro di lettura aperto (nucleotidi 8, 344-8991) denominato 3' orf, presente nel clone BH8, ma troncato nel BH10". "La sequenza nucleotidica completa di due DNA provirali di cellule-T umane leucemiche di tipo III (HTLV-III) ha ciascuna quattro lunghi quadri di lettura aperti, i primi due che corrispondono ai geni del gag e del pol. Il quarto quadro di lettura aperto codifica due polipeptidi funzionali, un ampio precursore della principale glicoproteina dell'involucro ed una proteina più piccola derivata dal quadro di lettura lungo 3' termino-terminale analogo al prodotto del lungo quadro di lettura aperto (lor) dell'HTLV-I e -II... Il provirus dell'HTLV-III è lungo 9.749 base pair (bp)".(32) Nel 1990 si diceva che il genoma dell'HIV consisteva in 10 geni.(230) Quest'anno Montagnier ha riferito che l'HIV possiede otto geni(7) e Barr(=82) Sinoussi(8) che l'HIV ha nove geni.

Fino ad oggi non sono stati riportati due "DNA dell'HIV" della stessa lunghezza ed inoltre si accetta il fatto che molti "genomi dell'HIV" sono difettosi. Anche se tutti i geni possono essere amplificati con la PCR, questo non significa ancora che è presente il "genoma a piena lunghezza dell'HIV". Per esempio, nel 1995 venne amplificato con la PCR il gene nef di 3 dei membri riceventi sangue del gruppo "Bloodbank" di Sidney e del donatore. "I frammenti amplificati risultanti per tre riceventi oscillavano da 410 bp a 680 bp. Un ricevente produsse frammenti di due misure... Il frammento amplificato proveniente dal donatore (D36) era di -(onda)550 bp in lunghezza, il che indicava una cancellazione di -(onda)290 bp... rapportato al frammento da -(onda)840 bp proveniente dal clone molecolare pNL4".(231) Nel 1995 David Ho ed i suoi colleghi "hanno analizzato con la reazione a catena della polimerasi e mettendole in sequenza diretta 57 sequenze virali da 47 individui di origine nordamericana, australiana e haitiana infettati dal virus umano da immunodeficienza di tipo 1 (HIV-1), concentrando l'attenzione sulle regioni V1 e V2 della gp120. C'era un polimorfismo di ampia lunghezza nella regione V1, che rendeva difficile l'allineamento sequenziale. Anche il locus ipervariabile V2 mostrava considerevoli variazioni nella lunghezza, mentre le regioni laterali erano relativamente conservate".(232) Per quanto riguarda Gallo, non è nemmeno un requisito che anche il genoma dell'"HIV" possieda dei geni qualsiasi che siano patogeni, "Ciò presuppone che i virioni difettosi come le particelle prive di RNA e/o le proteine virali espresse in assenza di formazione di particelle contribuiscano alla patogenesi dell'AIDS".(114)

8.1.4 Andando a cercare nella letteratura dell'HIV è sorprendente che ad oggi non sia stato messo in sequenza da cellule fresche non messe a coltura nessun singolo 9150 bp oppure qualsiasi lunghezza del "genoma dell'HIV a piena lunghezza". "La scarsa abbondanza del DNA provirale dell'HIV-1 nei campioni clinici è una barriera alle analisi sul genoma intero del provirus dell'HIV-1 come avviene in vivo". Tutti i "genomi a piena lunghezza" messi in sequenza finora provenivano da cellule messe a coltura, infatti "ne sono derivati genomi dell'HIV-1 a piena lunghezza

completamente messi in sequenza nell'attuale data base di Los Alamos, quasi senza eccezione, da isolati dell'HIV-1 adottati per crescere in linee cellulari-T (leucemiche o trasformate)continue". Dalla fine dell'1995 "sono state riportate solo 19 sequenze comprendenti il genoma da 10 Kb dell'HIV-1, a piena lunghezza e molte derivano dagli isolati dell'HIV-1 del genotipo B espresso in linee cellulari continue. Cinque degli otto sottotipi genetici maggiormente prevalenti dell'HIV sono senza un singolo prototipo, messo in sequenza, a piena lunghezza".(193)

Attualmente si sa anche che:

(a) i pazienti appartenenti a gruppi a rischio di AIDS vengono esposti ad alte dosi di agenti ossidanti e che questi agenti hanno effetti profondi sul DNA esull'RNA;(74, 79)

(b) non si può scoprire l'"HIV" nelle colture fino a quando non vengono trattate con ossidanti chimici o fisici compreso la PHA;

(c) ci sono delle anomalie strutturali e funzionali nel genoma dei linfociti di pazienti AIDS. "I pazienti AIDS hanno mostrato livelli aumentati di sintesi spontanea di riparazione del DNA (3 volte più alta), quantità aumentata di rotture del DNA a catena singola (11-18%), diminuita abilità nel riparare il danno del DNA (2-2,5 volte più bassa) in confronto alle persone sane";(233)

(d) secondo Cherman ed i suoi colleghi, "nel PBMC proveniente da persone infettate da HIV erano presenti popolazioni diverse di frammenti distinti di DNA dell'HIV-1 di dimensioni altamente variabili varianti da 600 bp al provirus a piena lunghezza... I genomi difettosi tendevano a scomparire gradualmente dopo l'attivazione del PBMC con la fitoemagglutina";(234)

(e) secondo gli esperti in HIV, i genomi difettosi vengono "liberati" dalla ricombinazione e questa ricombinazione è una delle cause principali della complessità del "DNA dell'HIV".

Se la ragione è questa, ci si può domandare:

(i) si può escludere la possibilità che i 19 "genomi a piena lunghezza" finora descritti, anche se avevano tutti la stessa lunghezza di 9150 bp e sequenze identiche non siano niente di più che una combinazione (caso) che si trova tra le molte specie molecolari presenti nelle colture, od anche nei linfociti non messi a coltura, che non hanno niente a che fare con un genoma retrovirale e che apparivano come il risultato di condizioni in vivo od in vitro oppure ambedue e di selezione naturale?;

(ii) se vi è un ritmo così alto di ricombinazione tra i genomi dell'HIV, non è possibile che si verifichi lo stesso processo tra i genomi retrovirali endogeni? Se la ragione è anche questa come si può sapere se i 19 "genomi dell'HIV a piena lunghezza" non siano niente di più che la ricombinazione tra sequenze endogene retrovirali, sequenze endogene retrovirali e sequenze cellulari, per esempio, retroelementi non-retrovirali?

Come si è fatto notare, i ricercatori HIV usano raramente i controlli e ad oggi quelli che hanno fatto a meno di usare i controlli appropriati, cioè tessuti o colture derivati da individui similmente malati, non di AIDS, in cui le tecniche sperimentali e le condizioni impiegate siano identiche a prescindere dalla presenza di materiale retrovirale apparente. Tuttavia, se i ricercatori HIV oppure altri capaci di organizzare tali esperimenti sono stati incoraggiati a fare tutti gli sforzi che potevano nel studiare l'"HIV" da linfociti di pazienti a rischio studiando linfociti da pazienti non a rischio, ma:

(a) che siano esposti ad agenti (diversi dall'"HIV") e dosi simili a quelle nei gruppi ad alto rischio;

(b) che presentino anomalie strutturali e funzionali simili come i linfociti da pazienti AIDS o da quelli a rischio;

(c) usando esattamente gli stessi metodi e le condizioni di coltura di quelli usati dai ricercatori "HIV";

si può escludere la possibilità che nel tempo di altri dieci anni questi ricercatori non saranno in grado di riportare "19 genomi dell'HIV a piena lunghezza" in questi individui?

8.2 "Per esempio, Jackson et al testarono le cellule del sangue di 409 soggetti positivi agli anticorpi compresi 144 pazienti AIDS e 265 persone sane. In aggiunta vennero testati 135 soggetti negativi agli anticorpi. Vennero trovate sottospecie di DNA specifico dell'HIV - definite in dimensione e sequenza da primer specifici dell'HIV (segnali di inizio dell'amplificazione della selezione) - in 403 dei 409 positivi agli anticorpi, ma in nessuna delle 131 persone negative agli anticorpi (Jackson et al., 1990)".

Evidentemente, sino al 1987 Jackson et al hanno considerato la scoperta dell'RT (trascrizione inversa determinata per trascrizione dell'A(n).dT15 nelle colture) sinonimo di isolamento dell'HIV! Tuttavia, avevano un "ritmo di isolamento del 57% in pazienti con sindrome da immunodeficienza acquisita". Dal 1988 il "test di transcriptasi inversa venne sostituito con il test di ritrovamento dell'antigene dell'HIV-1 dei Laboratori Abbot", che "scopre in primo luogo l'antigene del nucleo della p24 dell'HIV-1...

Una coltura veniva considerata positiva per l'antigene dell'HIV-1 se due campionature di sopranatanti seriali erano positive, con la campionatura successiva che mostrava un'attività maggiore"! "L'HIV-1 venne isolato dal PBMC di 141 (99,3%) dei 142 pazienti positivi agli anticorpi dell'HIV-1".(235) Nel loro scritto del 1990 Jackson et al riferirono che "Tra il febbraio 1987 e 10 ottobre 1988, vennero messe a coltura cellule mononucleari di sangue periferico (PBMC) provenienti da 409 individui che erano positivi agli anticorpi per l'HIV-1 da Western (immuno) blot (56 pazienti AIDS, 88 pazienti con ARC e 265 individui asintomatici)". Usando una tecnica sensibile precedentemente descritta, il test della p24 sopra citato, riferirono che "si può isolare l'HIV-1 dal 100% (56 di 56) dei pazienti AIDS, dal 99% dei pazienti ARC e dal 98% (259 di 265) degli individui asintomatici positivi agli anticorpi dell'HIV-1". Nessuno dei "131 individui negativi agli anticorpi dell'HIV-1 ha una coltura positiva". Usando lo stesso test della p24 (Abbot) testarono il siero proveniente da 403 dei 409 individui. Il test era positivo in 23/56 (42%) dei pazienti AIDS, 31/88 (57% dei pazienti ARC e 44/259 (17%) dei soggetti asintomatici positivi agli anticorpi. Per ragioni non stabilite un test positivo del siero viene considerato prova del ritrovamento dell'"antigene dell'HIV-1 nel siero" mentre lo stesso test positivo della coltura viene considerato prova dell'"isolamento dell'HIV-1" dalla coltura. Vi sono molte ragioni per mettere in dubbio l'interpretazione della p24:

(a) Il test della p24 è una reazione degli anticorpi/antigeni ed è soggetta a reazione onnipresente secondaria. In questo contesto, anche se (vi sono) "due campionature seriali dei soprananti con la campionatura successiva che mostra una maggiore reazione", anche se doppia o tripla, per esempio, 30 e 60 o 30 e 90, ambedue le letture non possono essere niente altro che letture secondarie. Nemmeno i criteri di Jackson e colleghi sono in accordo con quelli usati da Ho et al che sono ugualmente arbitrari; "Una coltura veniva considerata positiva se la concentrazione dell'antigene della p24 nel sopranatante superava i 1000 pg per millilitro (valore limite tipico approssimativamente di 30pg per millilitro) su una singola determinazione o i =F2 200pg per millilitro su due o più determinazioni".(51) A questo proposito è importante notare che in generale nessuna variazione sperimentale o miglioramento tecnologico nel test della p24 può cambiare la natura che sta alla base del test. Il test scopre unicamente la reazione dell'anticorpo/antigene e la ragione che sta alla base di tale reazione non può essere determinata sulla base di un limite arbitrario. A priori non vi è alcuna ragione per cui le condizioni che portano ad una reazione non-specifica non dovrebbero essere presenti ad un livello sufficiente a guidare la reazione al di sopra del limite, né qualsiasi ragione per prevenire l'inverso, cioè reazione specifica al di sotto del limite.

Il solo modo per risolvere questo problema è di confrontare la reazione con la presenza o l'assenza dell'HIV come determinata dall'assenza del virus. Fino ad oggi, ciò non è stato riportato. Anche senza un gold

standard, la non-specificità del test dell'antigene della p24 è così ovvio che viene accettato da un'autorità sulla sperimentazione dell'HIV non inferiore a quella di Philip Mortimer ed i suoi colleghi dell'UK Public Health Laboratory Service, "L'esperienza ha dimostrato che né la coltura dell'HIV né i test per l'antigene della p24 hanno molto valore nella sperimentazione diagnostica. Possono essere insensibili e/o non-specifici".(236) Il fatto che negli esperimenti con "studi di diluizioni seriali dei sopranatanti da coltura" è più probabile che il test della p24 sia positivo piuttosto che l'RT, non è la prova che il test della p24 sia "almeno 100 volte più sensibile degli esperimenti di transcriptasi inversa". La sensibilità all'HIV si può misurare solo con l'uso dell'"isolamento dell'HIV come gold standard;(237)

(b) Non vi sono ragioni scientifiche e perciò ragioni di senso comune per cui le reazioni come la trascrizione inversa o le reazioni degli anticorpi/antigeni, anche se specifiche dei retrovirus, possano essere considerate prova dell'isolamento virale. Se si considerano questi fenomeni come prova dell'isolamento virale, allora sia il test di gravidanza, (misurazione della proteina gamma HCG nel sangue o nell'urina usando gli anticorpi), oppure la stima degli enzimi cardiaci in infarto miocardico sospetto, si devono anche considerare come prova dell'"isolamento" rispettivamente della placenta o del cuore.

8.2.2 Per migliorare il test della p24, venne testato con la PCR il DNA estratto dal PBMC congelato non messo a coltura dei loro sette "soggetti negativi alla coltura, positivi agli anticorpi" e "23 soggetti eterosessuali negativi alla coltura, negativi agli anticorpi dell'HIV-1". Inoltre, "in modo da confrontare la sensibilità e specificità" dei due test, PCR e coltura, venne analizzato il PBMC di 59 individui sieropositivi e di 20 sieronegativi. "Vennero eseguite amplificazioni dell'HIV-1 usando un primer pair, l'SK38-39, che amplifica una regione conservata di 115 base-pair del gene del gag (nucleotidi da 1551 a 1665 dell'SF23 dell'HIV: registro GenBnk no. K02007). Il prodotto amplificato venne trovato per mezzo di ibridazione oligomerica, una tecnica nella quale una sonda codificata da 32p-end (SK19) alla regione del gag di nucleotidi (che vanno) da 1595 a 1635 ibridizza in soluzione ad un componente della sequenza amplificata. Il target-sonda duplex fu quindi analizzato con elettroforesi su un gel poliacrilamide del 10% ed autoradiografato". Nessuno degli individui sieronegativi riportarono un test positivo al PCR. "Tutti i campioni iniziali di DNA da pazienti positivi agli anticorpi, negativi alla coltura" vennero trovati positivi. I 2 soggetti negativi al PCR avevano colture positive ed i due individui negativi alla coltura avevano un PCR positivo. Gli autori conclusero, "Abbiamo isolato l'HIV-1 o trovate le sequenze del DNA dell'HIV-1 dal PBMC di tutti i 409 individui negativi agli anticorpi. Nessuno dei 131 individui negativi agli anticorpi dell'HIV-1 erano positivi alla coltura dell'HIV-1, e non sono state trovate con la PCR nemmeno sequenze del DNA dell'HIV-1 nei campioni di sangue di 43 individui sieronegativi. Inoltre, vennero confrontati la PCR dell'HIV-1 e la coltura dell'HIV-1 nel testare il PBMC di 59 emofiliaci positivi agli anticorpi dell'HIV-1 e 20 negativi agli anticorpi dell'HIV-1. Si trovò che ambedue i metodi avevano delle sensibilità e specificità rispettivamente di almeno il 97 ed il 100%... La nostra abilità nel dimostrare l'infezione da HIV-1 in tutti i soggetti positivi agli anticorpi dell'HIV-1 fornisce il fondamento definitivo che la positività agli anticorpi dell'HIV-1 è associata con la presente infezione da HIV-1".(52) In altre parole, Jackson et al hanno usato i test degli anticorpi come un gold standard sia per i test della coltura e del PCR che per i test del PCR e della coltura come gold standard per i test degli anticorpi.

Le affermazioni di Jackson et al non sono nemmeno confermate da altri laboratori. Secondo Jackson et al, fino al 1990 solo tre piccoli studi riportarono "gradi di isolamento del 100% dell'HIV-1 da pazienti AIDS". In

tutti gli altri studi, "non si è isolato l'HIV-1 dal 6 al 50% dei casi di AIDS sieropositivi all'HIV-1 riportati. Il grado di recupero della coltura dell'HIV-1 da pazienti asintomatici positivi agli anticorpi dell'HIV-1 è stato generalmente anche inferiore, solo dal 20 al 42% in alcuni studi". La situazione più recente è stata meglio illustrata da un ampio studio del WHO pubblicato nel 1994. Tra il 1992-93, vennero raccolti 224 campioni in Brasile, Rwanda, Thailandia ed Uganda da individui asintomatici "positivi all'HIV". Il sierostatus venne dapprima confermato nel paese d'origine e quindi presso i "laboratori centralizzati responsabili di confermare la sierologia, l'isolamento del virus, l'espressione del virus e la distribuzione dei reagenti (George-Speyer-Hans Chemotherapeutisches Forschungsinstitut (GSH) di Francoforte, Germania; National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) di Londra, Regno Unito; e DAIDS/NIAID di Bethesda, Maryland, Stati Uniti". Usando il metodo di Jackson et al, di un totale di 224 colture virali, 83 erano positive (grado di isolamento=3D37%).(238) I risultati del PCR di Jackson et al, come le loro colture, non sono replicabili in altri laboratori. Per esempio, in uno studio condotto dalla Defer ed i suoi colleghi, dove gli stessi campioni vennero testati nei "laboratori Seven French con vasta esperienza nel ritrovamento con la PCR del DNA dell'HIV", i dati rivelarono che dei 138 campioni che mostravano contenere il "DNA dell'HIV", 34 (il 25%) non contenevano gli "anticorpi all'HIV, mentre dei 262 campioni che non contenevano il "DNA dell'HIV", 17 (il 6%) contenevano gli "anticorpi all'HIV".(197) In uno scritto pubblicato nel 1994 da ricercatori del Laboratorio di Retrovirologia Molecolare dell'Università di Georgetown, della Chiron Corporation California, della Sezione Retrovirologia, degli Istituti Nazionali US di Sanità, Maryland, gli autori notarono che le tecniche del PCR sono "eccessivamente intensive e laboriose e risentono della variazione da laboratorio a laboratorio dovuta alle differenze nella tecnica e nelle operazioni" e che "in alcuni studi riportati non vi è alcun collegamento tra i livelli degli antigeni alla p24 e le dimensioni dei virioni infetti. Similarmente, una diminuzione nel livello dell'antigene alla p24 non è necessariamente associata ad un risultato clinico positivo". A causa di ciò, per "controllare il peso del Virus Umano da Immunodeficienza di Tipo 1 nel Plasma Umano", gli autori usarono "il test ramificato di amplificazione dei segnali del DNA" che "offre una migliorata sensibilità" e lo confrontarono con gli "altri due test standard per il peso virale; la coltura del plasma con diluizione del punto finale e l'antigene della p24 immune ai sieri dissociato dal complesso". Riferirono che i "test degli antigeni alla p24 dei sieri del DNA dell'HIV-1 e dell'ICD vennero fatti sui campioni dei sieri provenienti da pazienti sieropositivi (confermati da Western blot) che erano in fase di esame per l'iscrizione nelle prove cliniche... dei 102 pazienti, 75 (il 74%) erano positivi all'RNA dell'HIV con il test del bDNA e 61 (il 60%) erano positivi con il test della p24 dell'ICD. Venne testata solo una sottospecie di pazienti (n=3D56: grado cellulare del CD4, 29-394; 160 di media) per la viremia del plasma con coltura virale; 34 (il 61%) erano positivi alla coltura, mentre 50 (l'89%) risultavano positivi con il test del bDNA e 39 (il 70%) risultavano positivi con il test della p24 dell'ICD".(239) Com'è quindi possibile affermare che "virtualmente tutte le persone che contengono il DNA dell'HIV contengono anche anticorpi contro il ceppo virale dell'HIV di Montagnier" e che "molte, ma certamente non tutte le persone che sono prive del DNA dell'HIV non contengono tali anticorpi"?

## CONCLUSIONE E COMMENTI

Poiché Jackson et al non hanno testato tutti i 409 pazienti e tutti i 131 individui negativi agli anticorpi per la presenza del "DNA dell'HIV" usando la PCR, ma hanno testato solo 66 pazienti ed un massimo di 43 individui "negativi agli anticorpi"; non hanno messo in sequenza i segmenti amplificati e non hanno determinato la specificità del PCR usando il solo gold standard valido, l'isolamento dell'HIV, non era possibile che riportassero "sottospecie del DNA specifiche dell'HIV"... in 403 dei 409 soggetti positivi agli anticorpi, ma in nessuna delle 131 persone negative agli anticorpi".

Inoltre, Jackson et al riconobbero che il loro metodo con la PCR non provava l'esistenza del genoma dell'HIV a piena lunghezza, ma solo "che i pazienti AIDS come pure gli individui asintomatici positivi agli anticorpi dell'HIV-1 ospitano materiale genetico dell'HIV-1". Inoltre, per le loro determinazioni con la PCR, Jackson et al hanno usato un piccolo frammento del gene del gag come primer. Ma:

(a) poiché i più noti esperti in HIV sono d'accordo che i geni del gag dei retrovirus sono omologhi, i risultati negativi al PCR di Jackson et al in tutti i 43 individui "negativi agli anticorpi" i quali devono avere avuto almeno il retrovirus presente "in tutti noi", rimane senza spiegazione;

(b) trovare un risultato positivo al PCR usando un piccolo frammento del gene del gag come primer non è la prova dell'esistenza del "genoma dell'HIV a piena lunghezza" od anche dell'esistenza del "gene del gag dell'HIV a piena lunghezza".

Com'è stato già menzionato, nel 1989 ricercatori dell'Istituto Pasteur conclusero che "sarebbe stato difficile il compito di definire l'infezione da HIV in termini molecolari". Infatti, ritornando al 1973, i retrovirologi erano consapevoli che la natura inusuale dei retrovirus "sarebbe stata un ostacolo a qualsiasi analisi genetica dei virus tumorali dell'RNA"(240) Tuttavia, almeno alcuni esperti di HIV, compresi Jackson et al, insistono nel definire l'infezione da HIV in termini genetici. D'altra parte, una analisi dei dati attualmente disponibili sui retrovirus mostra che tutti i retrovirologi sembrano essere d'accordo che il fattore singolo più decisivo nel provare l'esistenza di un unico retrovirus è l'esistenza di anticorpi specifici, la sua importanza è stata ben illustrata dalla storia della scoperta e della fine dell'HL23V (vedi 5.4). Per quanto riguarda l'HIV, si sa bene che la sola prova considerata dimostrare la teoria dell'HIV dell'AIDS è un collegamento tra la sindrome clinica ed un test degli anticorpi positivo. Meno ben conosciuto, è il fatto che nei quattro scritti pubblicati in Science nel maggio 1984, Gallo ed i suoi colleghi affermarono che al contrario di Montagnier ed i suoi colleghi, lui ed i suoi colleghi avevano raggiunto il "vero isolamento". Tuttavia, è molto significativo il fatto che la sola differenza tra gli esperimenti condotti dai due gruppi è che il gruppo di Gallo impiegava una linea cellulare leucemica dalla quale erano in grado di ottenere abbondanti "antigeni all'HIV" e perciò potevano eseguire in modo significativo più test degli anticorpi.

Dato lo stato cruciale per cui i retrovirologi concordano nel specificare gli anticorpi provando l'esistenza di un unico retrovirus ed il suo ruolo nella patogenicità, la prova della specificità degli anticorpi sembrerebbe essere obbligatoria. La specificità dei test degli anticorpi all'HIV si può determinare solo con l'uso dell'isolamento come gold standard. Fino ad oggi ciò non è stato fatto ed attualmente sembrerebbe impossibile poiché nessuno ha ancora compiuto il primo passo nel solo metodo scientificamente valido per l'isolamento retrovirale, cioè, la dimostrazione con il microscopio elettronico di particelle con le caratteristiche morfologiche di retrovirus che si associano in gradienti di densità con sucrosio alla densità di 1,16 gm/ml. In più, l'HIV si può "isolare" solo da una minoranza di individui che hanno un test positivo agli anticorpi.

Inoltre, come nel caso dell'HL23V, vi è la dimostrazione che gli anticorpi presenti nei sieri umani che reagiscono con le "proteine dell'HIV" sono anche non-specifici;

(a) "Una metà del peso molecolare della gp120 è rappresentata da oligosaccaridi oligomannosidici... Gli anticorpi policlonali al mannano derivato dal lievito riconoscono anche la struttura dei carboidrati della gp120 del virus dell'AIDS.:(241)

(b) "Le cause determinanti immunochimiche dei fattori antigenici della Candida albicans mostrano un'alta identità con la glicoproteina (gp) 120 dell'HIV: contengono residui terminali di mannosio collegati all'alfa(12) ed all'alfa(13);(242)

(c) gli anticorpi al mannano della Candida albicans "bloccano l'infezione delle cellule dell'H9 dall'HIV-1" come pure il legame delle lectine alla gp120;(242)

(d) il riconoscimento della gp120 dagli anticorpi ad un peptide sintetico dello stesso antigene veniva "parzialmente abolito se era assorbito con la totale frazione polisaccaride della C. albicans", mentre il riconoscimento degli antigeni dagli anticorpi alla "gp120 proveniente dal virus umano cellulare T linfotropico di tipo IIIB.", "era totalmente bloccato". Da questi dati gli autori concludevano:

"Questi risultati indicano che i residui di mannano della C: albicans possono servire da antigeni per produrre anticorpi neutralizzanti contro l'infezione da HIV;(242)

(e) il siero normale umano contiene anticorpi capaci di riconoscere la metà dei carboidrati delle glicoproteine dell'involucro dell'HIV... da 100 ml di siero umano sono stati recuperati 200ug di MBIgG [MBIgC=3D collegato al mannan IgG]... l'MBIgG si è legato alle glicoproteine gp160, gp120 e gp41 dell'involucro dell'HIV;(243)

(f) ricercatori dell'Università di Roma infettarono dei topi sani con un lipopolisaccaride coli E. (LPS) e fecero reagire i loro sieri con due peptidi sintetici, uno comprendente un'ansa del V3 della gp120 dell'"HIV-1 MN" e l'altro rappresentante un epitopo immunodominante della gp41". I "topi trattati con l'LPS mostrarono una reazione significativa agli anticorpi" con i due peptidi. (V. Colizzi et al., comunicazione personale).

(g) Kashala, Essex ed i loro colleghi hanno dimostrato che gli anticorpi al carboidrato contenente antigeni come il lipoarabinomannano ed il glicolipide fenolico che costituiscono il muro cellulare della lebbra micobatterica, un batterio che "divide molti componenti determinanti antigenici con altre specie micobatteriche" causano "cross-reazioni significative con le proteine del pol e del gag dell'HIV-1". Questo ha portato gli autori ad avvertire che tra i pazienti lebbrosi ed i loro contatti c'è "un grado molto alto di risultati dell'ELISA del WB falso-positivi all'HIV-1", che "i risultati dell'ELISA del WB dovrebbero essere interpretati con cautela nell'esaminare individui infettati con tubercolosi M. od altre specie micobatteriche" ed inoltre che "l'ELISA ed il WB non possono essere sufficienti per la diagnosi dell'HIV nelle aree endemiche dell'AIDS dell'Africa Centrale dove la prevalenza di malattie micobatteriche è molto alta".(244)

Non solo i micobatteri (M. lebbra, M. tubercolosi, M. avium-intracellulare), ma anche le pareti di tutti i funghi (Candida albicans, Cryptococcus neoformans, Coccidioides immitis, Histoplasma capsulatum comprendente il Pneumocystis carinii),(245-247) contengono carboidrati (mannans). Il cento per cento dei pazienti AIDS (anche quelli che "cl clinicamente non hanno la candida") hanno anticorpi alla Candida albicans, il che ha portato ricercatori dei St. Bartholomews e St. Stephen Hospitals a stabilire: "E' possibile che la candida possa agire come cofattore nello sviluppo di AIDS dichiarato in soggetti infettati dall'HIV".(248) Può essere inoltre interessante notare che negli uomini gay per i quali il solo atto sessuale che è un fattore di rischio per la sierconversione è il rapporto anale passivo (esposizione al liquido seminale)(249), il mannosio è presente sia nello sperma che nel plasma seminale.(250)

Poiché gli anticorpi ai \*mannans\* reagiscono con le "proteine dell'HIV", allora, come Essex ed i suoi colleghi hanno fatto notare per l'infezione micobatterica in Africa, ci si dovrebbe aspettare che i sieri di tutte le persone infettate da funghi e micobatteri cross-reagiscano con le "glicoproteine

dell'HIV-1" come pure che causino cross-reazioni con le proteine del pol e del gag dell'HIV-1". Dato che i soggetti con infezioni da fungo e micobatteriche hanno anticorpi che possono produrre un test degli anticorpi all'"HIV" positivo anche in assenza di "HIV", come si può affermare che:

(a) Le malattie da PCP, candidiasi, criptococcosi, coccidioidomicosi, istoplasmosi o Micobatterio avium-intracellulare, cioè la grande maggioranza delle infezioni opportunistiche (l'88% dei casi AIDS diagnosticati tra il 1988 ed il 1992 avevano una o più infezioni da fungo o micobatteriche[251]) che indicano l'AIDS, sono causate dall'HIV sulla base di un test degli anticorpi positivo?

(b) che un test degli anticorpi positivo in soggetti con infezioni da fungo o micotiche prova l'infezione da HIV?

Perciò, come nel caso dell'HL23V, è solo una questione di tempo il fatto che i ricercatori dell'HIV accettino che non ci possano essere entità come gli anticorpi specifici dell'HIV? Conseguentemente, l'elenco dei fenomeni adottati come prova dell'esistenza del virus umano da immunodeficienza, passerà alla storia come "materiale completamente non-virale"?

#### ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank all our colleagues and especially Bruce Hedland-Thomas, Richard Fox, Livio Mina, Alun Dufty, Barry Page, Andrew Campbell, Jennie Brooks, Gordana Pelemis, Daphne Peters,

Gladys Powell, Ron Hirsch, David Dawson, June Rider-Jones, Christine Sibley, the staff of the Royal

Perth Hospital Library and the clerical staff of the Department of Medical Physics. We also thank

Todd Miller, Christine Johnson, Philip Johnson, Harvey Bialy, Charles Thomas, John Lauritsen,

Neville Hodgkinson, Gordon Stewart, Huw Christie, James Whitehead, Volker Gildemeister, Michael

Baumgartner, Michael Verney Elliot, Joan Shenton, Stefan Lanka, Michael Ristow, **Fabio Franchi**,

Djamel Tahi, Richard and Rosalind Chirimuuta, Udo Schulenk, Brian Peachey, Philip Adams and

Hiram Caton. We especially thank Peter Duesberg for all his help and encouragement and for his

inspiring example of scientific courage and integrity.

#### REFERENCES

1. Duesberg PH. Peter Duesberg responds. *Continuum* 1996;4:8-9.

2. Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, Gallo RC. DNA polymerases of normal and neoplastic mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1978;516:419-487.

3. Weissbach A, Baltimore D, Bollum F, et al. Nomenclature of eukaryotic DNA polymerases. *Science* 1975;190:401-402.

4. Robert-Guroff M, Schrecker AW, Brinkman BJ, et al. DNA polymerase gamma of human lymphoblasts. *Biochem* 1977;16:2866-2873.

5. Lewis BJ, Abrell JW, Smith RG, et al. Human DNA polymerase III (R-DNA): Distinction from DNA polymerase I and reverse transcriptase. *Science* 1974;183:867-869.

6. Gallo RC. The First Human Retrovirus. *Sci Am* 1986;255:78-88.

7. Cunningham AL, Dwyer DE, Mills J, et al. Structure and function of HIV. *Med J Aust* 1996;164:161-173.

8. Barr,-Sinoussi F. HIV as the cause of AIDS. *Lancet* 1996;348:31-35.

9. Varmus HE. Reverse transcription in bacteria. *Cell* 1989;56:721-724.

10. Lazcano A, Valverde V, Hernandez G, et al. On the early emergence of reverse transcription: theoretical basis and experimental evidence. *J Mol Evol* 1992;35:524-536.

11. Varmus H. Retroviruses. *Science* 1988;240:1427-1435.

12. Chang LJ, Pryciak P, Ganem D, et al. Biosynthesis of the reverse transcriptase of hepatitis B viruses involves de novo translational initiation not ribosomal frameshifting. *Nature* 1989;337:364-368.

13. Mitsuya H, Broder S. Antiretroviral chemotherapy against human immunodeficiency virus (HIV) infection: perspective for therapy of hepatitis B virus infection. *Cancer Detect Prev* 1989;14:299-308.

14. Neurath AR, Strick N, Sproul PSO. Search for hepatitis B virus cell receptors reveals binding sites for interleukin 6 on the virus envelope protein. *J Exp Med* 1992;175:461-469.

15. Sarria L, Gallego L, de las Heras B, et al. Production of hepatitis B virus from peripheral blood lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin. *Enferm Infect Microbiol Clin* 1993;11:187-189.

16. Vegnente A, Guida S, Lobo-Yeo A, et al. T lymphocyte activation is associated with viral replication in chronic hepatitis B virus infection of childhood. *Clin Exp Immunol* 1991;84:190-194.

17. Doolittle RF, Feng DF, Johnson MS, et al. Origins and evolutionary relationships of retroviruses. *Quart Rev Biol* 1989;64(1-30).

18. Weiss RA. Retrovirus classification and cell interactions. *J Antimicrob Chemother* 1996;37:B. 1-11.

19. Mommaerts EB, Sharp DG, Eckert EA, et al. Virus of avian erythromyeloblastic leukosis. I. Relation of specific plasma particles to the dephosphorylation of adenosine triphosphate. *J Nat Cancer Inst* 1954;14:1011-1025.

20. Barr,-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F. Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science* 1983;220:868-871.

21. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, et al. Detection, Isolation, and Continuous Production of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from Patients with AIDS and Pre-AIDS. *Science* 1984;224:497-500.

22. Papadopoulos-Eleopoulos E, Turner VF, Papadimitriou JM. Has Gallo proven the role of HIV in AIDS? *Emerg Med [Australia]* 1993;5(No 2):113-123.

23. Weiss R, Tedder R, Cheingsong-Popov R. Improvements relating to viral isolates and their use. Patent Application: Word Intellectual Property Organization. United Kingdom: Institute of Cancer Research, London, 1986.

24. Johnson PM, Lyden TW, Mwenda JM. Endogenous retroviral expression in the human placenta. *Am J Reprod Immunol* 1990;23:115-120.

25. Cohen M, Powers M, O'Connell C, et al. The nucleotide sequence of the env gene from the human provirus ERV3 and isolation and characterization of ERV3-specific cDNA. *Virology* 1985;147:449-458.
26. Thiry L, Sprecher-Goldberger S, Hard RC, et al. Expression of retrovirus-related antigen in pregnancy. I. Antigens cross-reacting with simian retroviruses in human foetal tissues and cord blood lymphocytes. *J Reprod Immunol* 1981;2:309-322.
27. Schupbach J, Popovic M, Gilden RV, et al. Serological analysis of a Subgroup of Human T-Lymphotropic Retroviruses (HTLV-III) Associated with AIDS. *Science* 1984;224:503-505.
28. Montagnier L, Clavel F, Krust B, et al. Identification and antigenicity of the major envelope glycoprotein of lymphadenopathy-associated virus. *Virology* 1985;144:283-289.
29. Montagnier L, Gruest J, Chamaret S, et al. Adaptation of lymphadenopathy associated virus (LAV) to replication in EBV-transformed B lymphoblastoid cell lines. *Science* 1984;225:63-66.
30. Chamaret S, Squinazi F, Courtois Y, et al. Presence of anti-HIV antibodies in used syringes left out in public places, beaches or collected through exchange programs. XIth International Conference on AIDS 1996, Vancouver.
31. WHO. Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS). Proposed criteria for interpreting results from Western blot assays for HIV-1, HIV-2 and HTLV-I/HTLV-II. *Wkly Epidem Rec* 1990;65:281-298.
32. Ratner L, Haseltine W, Patarca R, et al. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature* 1985;313:277-284.
33. Modrow S, Hahn B, Shaw GM, et al. Computer-assisted analysis of envelope protein sequences of seven human immunodeficiency virus isolates: prediction of antigenic epitopes in conserved and variable regions. *J Virol* 1987;61:570-578.
34. Gallo RC, Wong-Staal F, Reitz M, et al. Some evidence for infectious type-C virus in humans. In: Baltimore D, Huang AS, Fox CF, eds. *Animal Virology*. New York: Academic Press Inc., 1976: 385-405.
35. Gallagher RE, Gallo RC. Type C RNA Tumor Virus Isolated from Cultured Human Acute Myelogenous Leukemia Cells. *Science* 1975;187:350-353.
36. Teich NM, Weiss RA, Salahuddin SZ, et al. Infective transmission and characterization of a C-type virus released by cultured human myeloid leukaemia cells. *Nature* 1975;256:551-555.
37. Kurth R, Teich NM, Weiss R, et al. Natural human antibodies reactive with primate type-C antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:1237-1241.
38. Barbacid M, Bolognesi D, Aaronson SA. Humans have antibodies capable of recognizing oncoviral glycoproteins: Demonstration that these antibodies are formed in response to cellular modification of glycoproteins rather than as consequence of exposure to virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:1617-1621.
39. Snyder HW, Fleissner E. Specificity of human antibodies to oncovirus glycoproteins: Recognition of antigen by natural antibodies directed against carbohydrate structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:1622-1626.
40. Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Bunn PA, et al. Antibodies in human sera reactive against an internal structural protein of human T-cell lymphoma virus. *Nature* 1981;294:271-273.
41. Pinter A, Honnen WJ, Tilley SA, et al. Oligomeric structure of gp41, the transmembrane protein of human deficiency virus type 1. *J Virol* 1989;63:2674-2679.
42. Zolla-Pazner S, Gorny MK, Honnen WJ. Reinterpretation of human immunodeficiency virus Western blot patterns. *NEJM* 1989;320:1280-1281.
43. Lecatsas G, Taylor MB. Pleomorphism in HTLV-III, the AIDS virus. *S Afr Med J* 1986;69:793-794.
44. Hockley DJ, Wood RD, Jacobs JP. Electron Microscopy of Human Immunodeficiency Virus. *J Gen Virol* 1988;69:2455-2469.
45. Palmer E, Sporborg C, Harrison A, et al. Morphology and immunoelectron microscopy of AIDS virus. *Arch Virol* 1985;85:189-196.
46. Layne SP, Merges MJ, Dembo M, et al. Factors underlying spontaneous inactivation and susceptibility to neutralization of human immunodeficiency virus. *Virology* 1992;189:695-714.
47. Henderson LE, Sowder R, Copeland TD. Direct identification of Class II Histocompatibility DR proteins in preparations of human T-cell lymphotropic virus type III. *J Virol* 1987;61:629-632.
48. Genesca J, Jett BW, Epstein JS, et al. What do Western Blot indeterminate patterns for Human Immunodeficiency Virus mean in EIA-negative blood donors? *Lancet* 1989;ii:1023-1025.
49. Belshe RB, Clements ML, Keefer MC, et al. Interpreting HIV serodiagnostic test results in the 1990s: social risks of HIV vaccine studies in uninfected volunteers. *Ann Int Med* 1994;121:584-589.
50. Schupbach J, Jendis JB, Bron C, et al. False-positive HIV-1 virus cultures using whole blood. *AIDS* 1992;6:1545-1546.
51. Ho DD, Moudgil T, Alam M. Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 in the blood of infected persons. *NEJM* 1989;321:1621-1625.
52. Jackson BJ, Kwok SY, Sninsky JJ, et al. Human immunodeficiency virus type 1 detected in all seropositive symptomatic and asymptomatic individuals. *J Clin Microbiol* 1990;28:16-19.
53. Vincent F, Belec L, Glotz D, et al. False-positive neutralizable HIV antigens detected in organ transplant recipients. *AIDS* 1993;7:741-742.
54. Agbalika F, Ferchal F, Garnier JP, et al. False-positive HIV antigens related to emergence of a 25-30kD proteins detected in organ recipients. *AIDS* 1992;6:959-962.
55. Wain-Hobson S, Alison M, Montagnier L. Relationship of AIDS to other retroviruses. *Nature* 1985;313:743.
56. Ayra SK, Gallo RC, Hahn BH, et al. Homology of genome of AIDS-associated virus with genomes of human T-cell leukemia viruses. *Science* 1984;225:927-929.
57. Wong-Staal F, Gallo RC. Human T-lymphotropic retroviruses. *Nature* 1985;317:395-403.
58. Bauer H, Daams JH, Watson KF, et al. Oncornavirus-like particles in HeLa cells. II. Immunological characterization of the virus. *Int J Cancer* 1974;13:254-261.
59. Blattner WA. Retroviruses. In: Evans AS, eds. *Viral infections of humans*. 3rd ed. New York: Plenum Medical Book Company, 1989: 545-592.
60. Gelderblom HR, Reupke H, Pauli G. Loss of envelope antigens of HTLV-III/LAV, a factor in AIDS

- pathogenesis? *Lancet* 1985;ii:1016-1017.
61. Hausmann EHS, Gelderblom HR, Clapham PR, et al. Detection of HIV envelope specific antibodies by immunoelectron microscopy and correlation with antibody titer and virus neutralizing activity. *J Virol Meth* 1987;16:125-137.
62. Hoxie JA, Fitzharris TP, Youngbar PR, et al. Nonrandom association of cellular antigens with HTLV-III virions. *Hum Immunol* 1987;18:39-52.
63. Matsiota P, Chamaret S, Montagnier L. Detection of Natural Autoantibodies in the serum of Anti-HIV Positive-Individuals. *Ann Institut Past/Immunol* 1987;138:223-233.
64. Sasaki H, Nakamura M, Ohno T, et al. Myosin-actin interaction plays an important role in human immunodeficiency virus type 1 release from target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:2026-2030.
65. Pearce-Pratt R, Malamud D, Phillips DM. Role of cytoskeleton in cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus. *J Virol* 1994;68:2898-2905.
66. Orentas RJ, Hildreth JEK. Association of host cell surface adhesion receptors and other membrane proteins with HIV and SIV. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993;9:1157-1165.
67. Choudhury S, El-Farrash MA, Kuroda MJ, et al. Retention of HIV-1 inside infected MOLT-4 cells in association with adhesion-induced cytoskeleton reorganisation. *AIDS* 1996;10:363-368.
68. Arthur LO, Bess JW, Sowder II RC, et al. Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. *Science* 1992;258:1935-1938.
69. Small JV, Langanger G. Organisation of actin in the leading edge of cultured cells: influence of osmium tetroxide and dehydration on the ultrastructure of actin meshworks. *J Cell Biol* 1981;91:695-705.
70. Jackobson K, O'Dell D, Holifield B, et al. Redistribution of a major cell surface glycoprotein during cell movement. *J Cell Biol* 1984;99:1613-1623.
71. Herman IM, Crisona NJ, Pollard TD. Relation between cell activity and the distribution of cytoplasmic actin and myosin. *J Cell Biol* 1981;90:84-91.
72. Carpen O, Pallai P, Staunton DE, et al. Association of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) with actin-containing cytoskeleton and  $\alpha$ -actinin. *J Cell Biol* 1992;118:1223-1234.
73. Wang YL. Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: a possible role of treadmilling. *J Cell Biol* 1985;101:597-602.
74. Papadopulos-Eleopulos E. A Mitotic Theory. *J Theor Biol* 1982;96:741-758.
75. Papadopulos-Eleopulos E, Knuckey N, Dufty A, et al. Evidence that the redox state has a role in muscular contraction and relaxation. *Physiol Chem Phys Med NMR* 1985;17:407-412.
76. Papadopulos-Eleopulos E, Knuckey N, Dufty A, et al. Importance of the redox state in vasoconstriction induced by adrenaline and serotonin. *Cardiovasc Res* 1989;23:662-665.
77. Papadopulos-Eleopulos E, Turner VF, Papdimitriou JM. Oxidative Stress, HIV and AIDS. *Res Immunol* 1992;143:145-148.
78. Klatzmann D, Montagnier L. Approaches to AIDS therapy. *Nature* 1986;319:10-11.
79. Papadopulos-Eleopulos E. Reappraisal of AIDS: Is the oxidation caused by the risk factors the primary cause? *Med Hypotheses* 1988;25:151-162.
80. Papadopulos-Eleopulos E, Turner VF, Papdimitriou JM, et al. A critical analysis of the HIV-T4-cell-AIDS hypothesis. *Genetica* 1994;95:5-24.
81. Rivabene R, Varano B, Gessini S, et al. Combined treatment with 3-aminobenzamide and N-acetylcysteine inhibits HIV replication in U937-infected cells. XIth International AIDS Conference 1996, Vancouver: DocID: Tu. A.2032.
82. Gelderblom HR, Tzel M, Hausmann EHS, et al. Fine Structure of Human Immunodeficiency Virus (HIV), Immunolocalization of Structural Proteins and Virus-Cell Relation. *Micron Microscopica* 1988;19:41-60.
83. Weiss R, Teich N, Varmus H, et al. RNA Tumor Viruses. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
84. Todaro GJ, Benveniste RE, Sherr CJ. Interspecies Transfer of RNA Tumour Virus Genes: Implications for the search for "Human" Type C Viruses. In: Baltimore D, Huang AS, Fox CS, eds. *Animal Virology*. New York: Academic Press Inc., 1976: 369-384.
85. Hirsch MS, Phillips SM, Solnik C. Activation of Leukemia Viruses by Graft-Versus-Host and Mixed Lymphocyte Reactions In Vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972;69:1069-1072.
86. Toyoshima K, Vogt PK. Enhancement and Inhibition of Avian Sarcoma Viruses by Polycations and Polyanions. *Virol* 1969;38:414-426.
87. Aaronson SA, Todaro GJ, Scholnick EM. Induction of murine C-type viruses from clonal lines of virus-free BALB/3T3 cells. *Science* 1971;174:157-159.
88. Minassian A, Merges M, Garrity R, et al. Induction of a SMRV-like retrovirus from a human T-cell line after treatment with the mutagen ethyl-methyl-sulfonate. *J Acquir Immun Defic Syndr* 1993;6(No 6):738.
89. Papadopulos-Eleopulos E, Turner VF, Papdimitriou JM. Is a Positive Western Blot Proof of HIV Infection? *Bio/Technology* 1993;11(June):696-707.
90. Turner VF. Reducing agents and AIDS--Why are we waiting? *Med J Aust* 1990;153:502.
91. Alizon M, Sonigo P, Barre-Sinoussi P, et al. Molecular cloning of lymphadenopathy-associated virus. *Nature* 1984;312:757-760.
92. Maddox J. More on Gallo and Popovic. *Nature* 1992;357:107-109.
93. Culliton BJ. Inside the Gallo Probe. *Science* 1990;248:1494-1498.
94. Fisher AG, Collalti E, Ratner L, et al. A molecular clone of HTLV-III with biological activity. *Nature* 1985;316:262-265.
95. Hahn BH, Shaw GM, Arya SK, et al. Molecular cloning and characterization of the HTLV-III virus associated with AIDS. *Nature* 1984;312:166-169.
96. Shaw GM, Hahn BH, Arya S, et al. Molecular characterization of human T-cell leukemia (lymphotropic) virus type III in the acquired immune deficiency syndrome. *Science* 1984;226:1165-1171.

97. Levy J, Hoffman AD, Kramer SM, et al. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 1984;225:840-842.
98. Luciw PA, Potter SJ, Steimer K, et al. Molecular cloning of AIDS-associated retrovirus. *Nature* 1984;312:760-763.
99. Weinberg RA. Nuclear RNA metabolism. *Ann Rev Biochem* 1973;42:329-353.
100. Bader JP. Reproduction of RNA Tumor Viruses. In: Fraenkel-Conrat H, Wagne RR, eds. *Comprehensive Virology*. New York: Plenum Press, 1975: 253-331.
101. Lori F, di Marzo Veronese F, de Vico AL, et al. Viral DNA carried by human immunodeficiency virus type 1 virions. *J Virol* 1992;66:5067-5074.
102. Trono D. Partial reverse transcripts in virions from human immunodeficiency and murine leukemia viruses. *J Virol* 1992;66:4893-4900.
103. Zhang H, Zhang Y, Spicer TS, et al. Reverse transcription takes place within extracellular HIV-1 virions: potential biological significance. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993;9:1287-1296.
104. Dourmashkin RR, O'Toole CM, Bucher D, et al. The presence of budding virus-like particles in human lymphoid cells used for HIV cultivation. VIIth International Conference on AIDS 1991, Florence: 122.
105. Wong-Staal F, Hahn B, Manzuri V, et al. A survey of human leukemias for sequences of a human retrovirus. *Nature* 1983;302:626-628.
106. Perl A, Rosenblatt JD, Chen ISY, et al. Detection and cloning of new HTLV-related endogenous sequences in man. *Nuc acids res* 1989;17:6841-6854.
107. Gallo RC, Fauci AS. The human retroviruses. In: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL, eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 13 ed. New York: McGraw-Hill Inc., 1994: 808-814.
108. Larsson E, Kato N, Cohen M. Human endogenous proviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 1989;148:115-132.
109. Rabson AB, Steele PE, Garon CF, et al. mRNA transcripts related to full-length endogenous retroviral DNA in human cells. *Nature* 1983;306:604-607.
110. Wilkinson DA, Freeman D, Goodchild NL, et al. Autonomous expression of RTVL-H endogenous retroviruslike elements in human cells. *J Virol* 1990;64:2157-2167.
111. Franklin GC, Chretien S, Hanson IM, et al. Expression of human sequences related to those of a mouse mammary tumor virus. *J Virol* 1988;62:1203-1210.
112. Ono M, Kawakami M, Ushikubo H. Stimulation of expression of the human endogenous retrovirus genome by female steroid hormones in human breast cancer cell line T47D. *J Virol* 1987;61:2059-2062.
113. Brodsky I, Foley B, Gillepsie D. Expression of human endogenous retrovirus (HERV-K) in chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 1993;11:s119-s123.
114. Gallo RC. Human retroviruses in the second decade: a personal perspective. *Nat Med* 1995;1:753-759.
115. Lower R, Lower J, Tondera-Koch C, et al. A general method for the identification of transcribed retrovirus sequences (R-U5 PCR) reveals the expression of the human endogenous retrovirus loci HERV-H and HERV-K in teratocarcinoma cells. *Virology* 1993;192:501-511.
116. Lower R, Boller K, Hasenmaier B, et al. Identification of human endogenous retroviruses with complex mRNA expression and particle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:4480-4484.
117. Callahan R, Chiu IM, Wong JFH, et al. A new class of endogenous human retroviral genomes. *Science* 1985;228:1208-1211.
118. Mager DL, Freeman JD. Human endogenous retroviruslike genome with type C pol sequences and gag sequences related to human T-cell lymphotropic viruses. *J Virol* 1987;61:4060-4066.
119. Shih A, Misra R, Rush MG. Detection of multiple, novel reverse transcriptase coding sequences in human nucleic acids: relation to primate retroviruses. *J Virol* 1989;63:64-75.
120. Banki K, Maceda J, Hurley E, et al. Human T-cell lymphotropic virus (HTLV)-related endogenous sequence, HRES-1, encodes a 28-kDa protein: A possible autoantigen for HTLV-I gag-reactive autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:1939-1943.
121. Varmus H, Brown P. Retroviruses. In: Berg DE, Howe MM, eds. *Mobile DNA*. Washington D.C.: American Society for Microbiology, 1989: 53-108.
122. Temin HM. On the origin of RNA tumor viruses. *Harvey Lect* 1974;69:173-197.
123. Weiss RA, Friis RR, Katz E, et al. Induction of avian tumor viruses in normal cells by physical and chemical carcinogens. *Virology* 1971;46:920-938.
124. Temin HM. Origin of retroviruses from cellular moveable genetic elements. *Cell* 1980;21:599-600.
125. Gallo RC, Gallagher RE, Miller NR, et al. Relationships between components in primate RNA tumor viruses and in the cytoplasm of human leukemia cells: implications to leukemogenesis. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1975;39:933-961.
126. Coffin JM, Champion MA, Chabot F. Genome structure of avian RNA tumor viruses: relationships between exogenous and endogenous viruses. In: Barlati V, eds. *Human RNA Tumor Viruses*. Padua: Piccin Medical Books, 1978: 68-87.
127. Shih A, Coutavas EE, Rush MG. Evolutionary implications of primate endogenous retroviruses. *Virology* 1991;182:495-502.
128. Weiner AM, Deininger PL, Efstratiadis A. Nonviral retroposons: genes, pseudogenes, and transposable elements generated by the reverse flow of genetic information. *Ann Rev Biochem* 1986;55:631-661.
129. Leib-Mosch C, Brack-Werner R, Werner T, et al. Endogenous retroviral elements in human DNA. *Cancer Res* 1990;50:5636s-5642s.
130. McClintock B. The significance of responses of the genome to challenge. *Science* 1984;226:792-801.
131. Crick F. Split genes and gene splicing. *Science* 1979;204:264-271.
132. Chambon P. Split genes. *Sci Am* 1981;244:48-59.
133. Gilbert W. The exon theory of genes. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1987;52:901-905.
134. Perlman PS, Butow RA. Mobile introns and intron-encoded proteins. *Science*

- 1989;246:1106-1109.
135. Cech TR. RNA as an enzyme. *Sci Am* 1986;255:76-84.
136. North G. Expanding the RNA repertoire. *Nature* 1990;345:576-578.
137. Cech TR. Ribozyme self-replication? *Nature* 1989;339:507-508.
138. Green MR. Mobile RNA catalysts. *Nature* 1988;336:716-718.
139. Eigen M, Schuster P. The hypercycle. *Die Naturwissenschaften* 1977;64:541-565.
140. Eigen M, Gardiner W, Schuster P, et al. The origin of genetic information. *Sci Am* 1981;224:78-94.
141. de Duve C. *Blueprint for a cell: The nature and origin of life.* Burlington, North Carolina, USA: Neil Patterson Publishers, 1991.
142. Covello PS, Gray MW. RNA editing in plant mitochondria. *Nature* 1989;341:662-666.
143. Eisen H. RNA editing: Who's on first? *Cell* 1988;53:331-332.
144. Lamond AI. RNA editing and the mysterious undercover genes of trypanosomatid mitochondria. *Trends Biochem Sci* 1988;13:283-284.
145. Maizels N, Weiner N. In search of a template. *Nature* 1988;334:469-470.
146. Papadopoulos-Eleopoulos E, Turner VF, Papadimitriou JM. Virus Challenge. *Continuum* 1996;4:24-27.
147. Zagury D, Bernard J, Leonard R, et al. Long-Term Cultures of HTLV-III-Infected T Cells: A Model of Cytopathology of T-Cell Depletion in AIDS. *Science* 1986;231(21st February):850-853.
148. Marx JL. A virus by any other name... *Science* 1985;227:1449-1451.
149. Hahn BH, Shaw GM, Taylor ME, et al. Genetic variation in HTLV-III/LAV over time in patients with AIDS or at risk for AIDS. *Science* 1986;232(June):1548-1553.
150. Newmark P. Receding hopes of AIDS vaccines. *Nature* 1988;333:699.
151. Innocenti P, Ottmann M, Morand P, et al. HIV-1 blood monocytes: frequency of detection of proviral DNA using PCR in comparison with the total CD4 count. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992;8:261-268.
152. Michael NL, Chang G, Ehrenberg PK, et al. HIV-1 proviral genotypes from the peripheral blood mononuclear cells of an infected patient are differentially represented in expressed sequences. *J Acquir Immun Defic Syndr* 1993;6:1073-1085.
153. Meyerhans A, Cheynier R, Albert J, et al. Temporal fluctuations in HIV quasispecies in vivo are not reflected by sequential HIV isolations. *Cell* 1989;58:901-910.
154. Vartian JP, Meyerhans A, Henry M, et al. High-resolution structure of an HIV-1 quasispecies: Identification of novel coding sequences. *AIDS* 1992;6:1095-1098.
155. Wain-Hobson S. Virological mayhem. *Nature* 1995;373:102.
156. Saag MS, Hahn BH, Gibbons J, et al. Extensive variation of human immunodeficiency virus type-1 in vivo. *Nature* 1988;334:440.
157. Sheppard HW, Ascher MS, Krowka JF. Viral burden and HIV disease. *Nature* 1993;364:291.
158. Levy JA. Mysteries of HIV: challenges for therapy and prevention. *Nature* 1988;333:519-522.
159. Weiss RA. How Does HIV Cause AIDS? *Science* 1993;260(28th May):1273-1279.
160. Wain-Hobson S. HIV genome variability in vivo. *AIDS* 1989;3:S13-S18.
161. Blomberg J, Lawoko A, Pipkorn R, et al. A survey of synthetic HIV-1 peptides with natural and chimeric sequences for differential reactivity with Zimbabwean, Tanzanian and Swedish HIV-1-positive sera. *AIDS* 1993;7:759-767.
162. Myers G. Nucleic acids alignments and sequences. The human retroviruses and AIDS Compendium on Line: Web site: <http://hiv-web.lanl.gov>. USA: US Government, 1995: I-1-I-2.
163. Salminen MO, Carr JK, Burke DS, et al. Genotyping of HIV-1. The human retroviruses and AIDS Compendium on Line: Web site: <http://hiv-web.lanl.gov>. USA: US Government, 1996: 30-34.
164. Foley B, Korber G. Global variation in the HIV-1 V3 region. The human retroviruses and AIDS Compendium on Line: Web site: <http://hiv-web.lanl.gov>. USA: US Government, 1996: 77-134.
165. Arnstein AW, VanCott TC, Mascola JR, et al. Dual infection with human immunodeficiency virus type 1 of distinct envelope subtypes in humans. *J Infect Dis* 1995;171:805-810.
166. Louwagie J, McCutchan FE, Peeter M, et al. Phylogenetic analysis of gag genes from 70 international HIV-1 isolates provides evidence for multiple genotypes. *AIDS* 1993;7:769-780.
167. Loussert-Ajaka I, Ly TD, Chaix ML, et al. HIV-1/HIV-2 seronegativity in HIV-1 subtype O infected patients. *Lancet* 1994;343:1393-1394.
168. Gurtler LG, Hauser PH, Eberle J, et al. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J Virol* 1994;68:1581-1585.
169. Zhu T, Wang N, Carr A, et al. Evidence of coinfection of multiple strains of human immunodeficiency virus type 1 B an acute seroconverter. *J Virol* 1995;69:1324-1327.
170. Kozal MJ, Shah N, Shen N, et al. Extensive polymorphisms observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays. *Nat Med* 1996;2:753-759.
171. Steinhauer DA, Holland JJ. Rapid evolution of RNA viruses. *Annual Review of Microbiology* 1987;41:409-433.
172. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, et al. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995;373:123-126.
173. Wei X, Ghosh SK, Taylor M, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 1995;373:117-122.
174. Lauritsen JL. NIDA meeting calls for research into the poppers-Kaposi's sarcoma connection. In: Duesberg PH, eds. *AIDS: Virus- or Drug Induced.* London: Kluwer Academic Publishers, 1995: 325-330.
175. Lower R, Lower J, Kurth R. The viruses in all of us: Characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:5177-5184.

176. Becker JL, Hazan U, Nugeure MT, et al. Infection of insect lines by HIV, agent of AIDS, and evidence for HIV proviral DNA in insects from Central Africa. *C R Acad Sci* 1986;300:303-306.
177. Webster ADB, Dalglish AG, Beattie R, et al. Isolation of retroviruses from two patients with "common variable" hypogammaglobulinemia. *Lancet* 1986;i:581-582.
178. Ciampollo A, Marini V, Buscema M. Retrovirus-like sequences in Grave's disease: Implications for human autoimmunity. *Lancet* 1989;i:1096-1100.
179. Wu TC, Kanayama MD, Hruban RH, et al. Detection of a neuron-specific 9.0-kb transcript which shares homology with antisense transcripts of HIV-1 gag gene in patients with and without HIV-1 infection. *Am J Pathol* 1993;142:25-31.
180. Horwitz MS, Boyce-Jacino MT, Faras A. Novel human endogenous sequences related to human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1992;66:2170-2179.
181. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990;262:36-43.
182. Simmonds P, Balfe P, Peutherer JF, et al. Human immunodeficiency virus-infected individuals contain provirus in small numbers of peripheral mononuclear cells and at low copy numbers. *J Virol* 1990;64:864-872.
183. Hodgkinson N. AIDS The failure of contemporary science. London: Fourth Estate, 1996.
184. Maddox J. The Guardian Newspaper 1996 July 5th;Page 16.
185. Gelfand JA, Dinarello CA, Wolff SM. Fever, including fever of unknown origin. In: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL, eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 13 ed. New York: McGraw-Hill Inc., 1994: 81-90.
186. Duesberg PH, Bialy H. Duesberg and the right of reply according to Maddox-Nature. In: Duesberg PH, eds. *AIDS: Virus- or Drug Induced*. London: Kluwer Academic Publishers, 1995: 110-126.
187. Papadopoulos-Eleopoulos E, Turner VF, Papdimitriou JM, et al. A reply to Wei and Ho. Unpublished letter to Nature 1995.
188. Baxter JD, Paterson JM, Byrne BC, et al. Analysis of variability within a quantitative competitive polymerase chain reaction (QC-PCR) assay for HIV-1 viremia. XIth International AIDS Conference 1996, Vancouver: DocID: Th.A.A.4038.
189. Buianouckas FR. HIV an illusion. *Nature* 1995;375:197.
190. Craddock M. Science by Press Conference. In: Duesberg PH, eds. *AIDS: Virus- or Drug Induced*. London: Kluwer Academic Publishers, 1995: 105-110.
191. Ascher MS, Sheppard HW, Anderson RW, et al. Paradox remains. *Nature* 1995;375:196.
192. Cohen J. Researchers air alternative views on how HIV kills cells. *Science* 1995;269:1044-1045.
193. Salminen MO, Koch C, Sanders-Buell E, et al. Recovery of virtually full-length HIV-1 provirus of diverse subtypes from primary virus cultures using the polymerase chain reaction. *Virol* 1995;213:80-86.
194. Sanders-Buell E, Salminen MO, McCutchan FE. Sequencing primers for HIV-1. The human retroviruses and AIDS Compendium on Line: Web site: <http://hiv-web.lanl.gov>. USA: US Government, 1996: 15-21.
195. Kwok S, Mack DH, Mullis KB, et al. Identification of human immunodeficiency virus sequences by using in vitro enzymatic amplification and oligomer cleavage detection. *J Virol* 1987;61:1690-1694.
196. Ottman M, Innocenti P, Thenadey M, et al. The polymerase chain reaction for the detection of HIV-1 genomic RNA in plasma from infected individual. *J Virol Meth* 1991;31:273-284.
197. Defer C, Agut H, Garbarg-Chenon A. Multicentre quality control of polymerase chain reaction for detection of HIV DNA. *AIDS* 1992;6:659-663.
198. Conway B, Baskar P, Bechtel LJ, et al. Eosinophils as host cells for HIV-1. *J Arch Virol* 1992;127:373-377.
199. Fox CH, Kotler D, Tierney A, et al. Detection of HIV-1 RNA in the lamina propria of patients with AIDS and gastrointestinal disease. *J Infect Dis* 1989;159:467-471.
200. Boriskin YS, Booth JC, Roberts MM, et al. HIV primers can amplify sequences of human satellite DNA. *AIDS* 1994;8:709-711.
201. Conway B. Detection of HIV-1 by PCR in Clinical Specimens. In: Aldovini A, Walker BD, eds. *Techniques in HIV Research*. New York: Macmillan, 1990: 40-45.
202. Mikovits JA, Lohrey N, Schuloff R, et al. Immune activation of latent HIV-1 expression in monocyte/macrophages. VIIth International AIDS Conference 1991, Florence: 151.
203. Farzadegan H, Polis M, Wolinsky SM, et al. Loss of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) antibodies with evidence of viral infection in asymptomatic homosexual men. *Ann Int Med* 1988;108:785-790.
204. Gerberding JL. Incidence and prevalence of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, hepatitis C virus, and cytomegalic virus among health care personnel at risk for blood exposure: final report from a longitudinal study. *J Infect Dis* 1995;170:1410-1417.
205. Gerberding JL. Reply to letter of Dr. Jehuda-Cohen. *J Infect Dis* 1995;172:1421.
206. Baur A, Schwarz N, Ellinger S, et al. Continuous clearance of HIV in a vertically infected child. *Lancet* 1989;ii:1045.
207. Mayers MM, Davenny K, Schoenbaum EE, et al. A prospective study of infants of human immunodeficiency virus seropositive and seronegative women with a history of intravenous drug use or of intravenous drug-using sex partners, in the Bronx, New York City. *Pediatrics* 1991;88:1248-1256.
208. Byrson YJ. HIV clearance in infants--a continuing saga. *AIDS* 1995;9:1373-1375.
209. Byrson YJ, Pang S, Wei LS, et al. Clearance of HIV infection in a perinatally infected infant. *NEJM* 1995;332:833-837.
210. Rogues PA, Gras G, Parnet-Mathieu F, et al. Clearance of HIV infection in 12 perinatally infected children: clinical, virological and immunological data. *AIDS* 1995;9:F19-F26.
211. Mortimer PP. Ten years of laboratory diagnosis of HIV: how accurate is it now? *J Antimicrob Chemother* 1996;37:B. 27-32.

212. Shoebridge GI, Barone L, Wing-Simpson A, et al. Assessment of HIV status using the polymerase chain reaction in antibody-positive patients and high-risk antibody-negative haemophiliacs. *AIDS* 1991;5:221-224.
213. Maddox J. Finding wood among the trees. *Nature* 1988;335:11.
214. Nass MMK. Uptake of isolated chloroplasts by mammalian cells. *Science* 1969;165:1128-1131.
215. Felgner PL, Ringold GM. Cationic liposome-mediated tranfection. *Nature* 1989;337:387-388.
216. Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990;247:1465-1468.
217. Kitsis RN, Buttrick PM, McNally EM, et al. Hormonal modulation of a gene injected into rat heart in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:4138-4142.
218. Levy JA, Cheng-Mayer C, Dina D, et al. AIDS retrovirus (ARV-2) clone replicates in transfected human and animal fibroblasts. *Science* 1986;232:998-1001.
219. Chassange J, Verelle P, Fonck Y, et al. Detection of lymphadenopathy-associated virus p18 in cells of patients with lymphoid diseases using a monoclonal antibody. *Ann Institut Past/Immunol* 1986;137D:403-408.
220. Stricker RB, McHugh TM, Moody DJ, et al. An AIDS-related cytotoxic autoantibody reacts with a specific antigen on stimulated CD4+ T cells. *Nature* 1987;327:710-713.
221. Parravicini CL, Klatzmann D, Jaffray P, et al. Monoclonal antibodies to the human immunodeficiency virus p18 protein cross-react with normal human tissues. *AIDS* 1988;2:171-177.
222. Courouce A, Muller J, Richard B. False-positive Western blot reactions to human immunodeficiency virus in blood donors. *Lancet* 1986;ii:921-922.
223. Barnett SW, Quiroga M, Werner A, et al. Distinguishing features of an infectious molecular clone of the highly divergent and noncytopathic human immunodeficiency virus type 2 UC1 strain. *J Virol* 1993;67:1006-1014.
224. Papadopoulos-Eleopoulos E, Turner VF, Papadimitriou JM, et al. Fator VIII, HIV and AIDS in haemophiliacs: an analysis of their relationship. *Genetica* 1995;95:25-50.
225. Papadopoulos-Eleopoulos E, Turner VF, Papadimitriou JM, et al. AIDS in Africa: Distinguishing fact and fiction. *World J Microbiol Biotechnol* 1995;11:135-143.
226. Yamamoto N, Hinuma Y, zur Hausen H, et al. African green monkeys are infected with adult T-cell leukemia virus or a closely related agent. *Lancet* 1983;i:240-241.
227. McAlister RM, Nicholson M, Gardner MB, et al. C-type virus released from cultured human rhabdomyosarcoma cells. *Nat New Biol* 1972;235:3-6.
228. Gillespie D, Gillespie S, Gallo RC, et al. Genetic origin of RD114 and other RNA tumor viruses assayed by molecular hybridization. *Nat New Biol* 1973;244:51-54.
229. Wain-Hobson S, Sonigo P, Danos O, et al. Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell* 1985;40:9-17.
230. Lazo PA, Tschlis PN. Biology and pathogenesis of retroviruses. *Semin Oncol* 1990;17:269-294.
231. Deacon NJ, Tsykin A, Solomon A, et al. Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* 1995;270:988-991.
232. Wang N, Zhu T, Ho D. Sequence diversity of V1 and V2 domains of gp120 from human immunodeficiency virus type 1: Lack of correlation with viral phenotype. *J Cell Biochem* 1995;21B (suppl):246.
233. Antonenko SV, Barbasheva YV, Shcherbinska AM. HIV-infection effect on immune system cells genome. XIth International AIDS Conference 1996, Vancouver.
234. Giselle S, Xu X, Chenine AL, et al. Populations of defective HIV-1 genomes in PBMC cells infected in vivo. XIth International AIDS Conference 1996, Vancouver: D.
235. Jackson JB, Coombs RW, Sannerud K, et al. Rapid and sensitive viral culture method for human immunodeficiency virus type 1. *J Clin Microbiol* 1988;26:1416-1418.
236. Mortimer P, Codd A, Connolly J, et al. Towards error free HIV diagnosis: notes on laboratory practice. *Pub Health Lab Service Microbiol Digest* 1992;9:61-64.
237. Griner PF, Mayewski RJ, Mushlin AI. Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures. *Ann Int Med* 1981;94:559-563.
238. WHO. HIV type 1 variation in World Health Organization-sponsored vaccine evaluation sites: genetic screening, sequence analysis, and preliminary biological characterization of selected viral strains. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994;10:1327-1343.
239. Dewar RL, Highbarger HC, Sarmiento MD, et al. Application of branched chain DNA signal amplification to monitor human immunodeficiency virus type 1 burden in human plasma. *J Infect Dis* 1994;170:1172-1179.
240. Tooze J, eds. *Genetics of RNA tumor viruses*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1973.
241. Muller WEG, Schroder HC, Reuter P, et al. Polyclonal antibodies to mannan from yeast also recognize the carbohydrate structure of gp120 of the AIDS virus: an approach to raise neutralizing antibodies to HIV-1 infection in vitro. *AIDS* 1990;4:159-162.
242. Muller WEG, Bachmann M, Weiler BE, et al. Antibodies against defined carbohydrate structures of *Candida albicans* protect H9 cells against infection with human immunodeficiency virus-1 in vitro. *J Acquir Immun Defic Syndr* 1991;4:694-703.
243. Tomiyama T, Lake D, Masuho Y, et al. Recognition of human immunodeficiency virus glycoproteins by natural anti-carbohydrate antibodies in human serum. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;177:279-285.
244. Kashala O, Marlink R, Ilunga M, et al. Infection with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and human T cell lymphotropic viruses among leprosy patients and contacts: correlation between HIV-1 cross-reactivity and antibodies to lipoarabinomannan. *J Infect Dis* 1994;169:296-304.
245. Hoffman OA, Standing JE, Limper AH. *Pneumocystis carinii* stimulates tumor necrosis factor-alpha release from alveolar macrophages through a beta-glucan-mediated mechanism. *J Immunol* 1993;150:3932-3940.

246. Ezekowitz RA, Williams DJ, Koziel H, et al. Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. *Nature* 1991;351:155-158.
247. O'Riordan DM, Standing JE, Limper AH. *Pneumocystis carinii* glycoprotein A binds macrophage mannose receptors. *Infect-Immun* 1995;63:779-784.
248. Matthews R, Smith D, Midgley J, et al. *Candida* and AIDS: Evidence for protective antibody. *Lancet* 1988;ii:263-266.
249. Caceres CF, van Griensven GJP. Male homosexual transmission of HIV-1. *AIDS* 1994;8:1051-1061.
250. Mann T, Lutwak-Mann C. *Male Reproductive Function and Semen*. New York: Springer-Verlag, 1981.
251. Hu DJ, Fleming PL, Castro KG, et al. How important is race/ethnicity as an indicator of risk for specific AIDS-defining conditions? *J Acquir Immun Def Syndr Hum Retrovirol* 1995;10:374-380.