

ENTREVISTA A LUC MONTAGNIER

¿LUC MONTAGNIER REALMENTE DESCUBRIÓ EL VIH?

Por Djamel Tahi

“¡Lo repito, no lo hemos aislado!”

Revista *Continuum* vol 5, número 2, edición de otoño de 1997

TRADUCCIÓN DEL TIG

Texto de la entrevista grabada en video que se llevó a cabo en el Instituto Pasteur en Julio de 1997. Las respuestas de Luc Montagnier están numeradas para facilitar la referencia al análisis presentado en la [respuesta de Papadopulos-Eleopulos y cols.](#)

D.T.: Un grupo de científicos de Australia arguyen que nadie aisló hasta ahora el virus del Sida, el VIH. Según ellos no se han respetado minuciosamente las normas para el aislamiento de los retrovirus en lo que se refiere al VIH. Estas normas son: cultivo en vitro, purificación del material mediante ultra centrifugación, micrografías al microscopio electrónico (EM) del material que bandea a la densidad de los retrovirus, caracterización de estas partículas, y prueba de la capacidad infecciosa de las partículas.

L.M.: No, eso no es aislamiento. Hemos aislado porque hemos “transmitido” el virus, hicimos un cultivo en vitro del virus. Por ejemplo, Gallo dijo: “Ellos no aislaron el virus... y nosotros (Gallo y cols.), lo hicimos emerger en abundancia en una línea celular inmortal”. Pero antes de hacerlo emerger en líneas celulares inmortal, lo hicimos emerger en cultivos en vitro de linfocitos normales procedentes de un donante de sangre. Ése es el criterio principal. Se tenía algo que se podía transmitir en serie, que se podía conservar. Y había sido caracterizado como un retrovirus no sólo por sus propiedades visibles, sino también por sus propiedades bioquímicas, es decir, la actividad de RT [transcriptasa inversa], que es realmente específica de los retrovirus. También tuvimos las reacciones de los anticuerpos ante algunas proteínas, que probablemente eran proteínas internas. Digo probablemente por analogía con el conocimiento de otros retrovirus. Es obvio que no habríamos podido aislar este retrovirus sin contar con el conocimiento de otros retrovirus. Pero creo que hemos cumplido con los criterios de aislamiento, completamente. 1

D.T: Volvamos a las normas de aislamiento de los retrovirus que son: cultivo en vitro, purificación a la densidad de los retrovirus, micrografías EM del material a la densidad de los retrovirus, caracterización de las partículas, y prueba de la capacidad infecciosa de las partículas. ¿Se cumplieron todos estos pasos para el aislamiento del VIH? Querría añadir que de acuerdo con varias referencias de

artículos científicos publicados y que fueron mencionadas por el grupo de investigación australiano, la RT no es específica de los retrovirus. Además, ¿es cierto que vuestro trabajo para detectar la RT no fue realizado en el material purificado?

L.M.: Creo que publicamos en *Science* (en Mayo de 1983) un gradiente que mostraba que la RT tenía exactamente una densidad de 1,16. Por lo tanto, se tenía un máximo, que era RT. Así que se ha cumplido este criterio para la purificación. Pero es difícil transmitirlo en serie, porque cuando se coloca el material que se está por purificar en un gradiente, hay que saber que los retrovirus son muy frágiles, y por lo tanto se quiebran entre sí perdiendo enormemente su poder infeccioso. Pero aun así, pienso que conseguimos mantener un poco de su poder infeccioso. Sin embargo, en aquel entonces no era tan fácil como ahora, porque la cantidad de virus era muy baja. Al principio tropezamos con un virus que no mataba las células. El virus procedía de un paciente asintomático, por lo que fue clasificado entre los virus que no forman sincitios, que no son cito patogénicos, y que emplean el co-receptor ccr5. Ése fue el primer virus [del homosexual llamado] BRU. Teníamos muy poca cantidad de ese virus, y no se lo podía transmitir a una línea de células inmortal. Tratamos de hacerlo durante varios meses, pero no lo logramos, mientras que con la segunda cepa lo logramos muy fácilmente. No obstante, allí está el problema, que es bastante misterioso, de la contaminación de aquella segunda cepa por obra de la primera. A eso se lo llamó LAI [VIH]. 2

D.T.: ¿Por qué las micrografías EM que ustedes publicaron proceden de un cultivo in vitro y no del material purificado?

L.M.: Había tan poca producción de virus, que era imposible ver lo que podía haber en un concentrado de virus procedente de un gradiente. No había una cantidad suficiente de virus para hacerlo. Por supuesto que lo buscamos, pero aunque lo buscábamos desde el principio en los tejidos y también en la biopsia, vimos algunas partículas, pero no presentaban la morfología típica de los retrovirus. Eran muy diferentes, relativamente diferentes. Así que nos llevó varias horas encontrar las primeras micrografías en el cultivo in vitro. ¡Fue un esfuerzo enorme! Es fácil criticar después del hecho. Lo que no teníamos, y siempre lo reconozco, fue que ésta fuera realmente la causa del Sida. 3

D.T.: ¿Cómo es posible, sin tener a disposición micrografías al microscopio electrónico (EM) de la purificación, saber que estas partículas son virales y que pertenecen a un retrovirus, es más, a un retrovirus específico?

L.M.: Pues bien, había micrografías de la gemación. Publicamos micrografías de gemaciones que son características de los retrovirus. Dicho esto, y solamente basándose en la morfología, no se podría decir que se trataba verdaderamente de un retrovirus. Por ejemplo, un experto francés en micrografías EM de retrovirus me atacó públicamente diciendo: “Éste no es un retrovirus, es un

arenavirus". Porque existen otras familias de virus que también geman [de la membrana celular] y que tienen puntas en su superficie, etc. 4

D.T.: ¿Por qué existe esta confusión? ¿Acaso las micrografías EM no muestran claramente un retrovirus?

L.M.: En ese momento los retrovirus mejor conocidos eran los de tipo C, que eran muy típicos. El retrovirus [del que estamos hablando] no era del tipo C y los lentivirus eran poco conocidos. Personalmente lo reconocí, mirando micrografías del virus de la anemia infecciosa equina en la biblioteca, y después las del virus visna. Pero repito, no fue sólo la morfología y la gemación, había RT... fue el conjunto de estas propiedades lo que me impulsó a decir que se trataba de un retrovirus. 5

D.T.: Respecto a la RT, se la detecta en el cultivo en vitro. Entonces, donde se encuentran partículas retrovirales significa que se ha purificado. Sin embargo, a esta densidad existen muchos otros elementos, como los que se denominan "similares a los virus".

L.M.: Exactamente, exactamente. Es decir, no es solamente una propiedad, sino el conjunto de las propiedades lo que nos impulsó a afirmar que se trataba de un retrovirus que pertenece a la familia de los lentivirus. Tomada aisladamente, cada una de las propiedades no es realmente específica, lo que cuenta es el conjunto de las propiedades. Así que teníamos el gradiente de densidad, la RT, las micrografías de la gemación, y la analogía con el virus visna. Ésas son las cuatro características. 6

D.T.: ¿Pero cómo hacen todos estos elementos para demostrar que se trata de un nuevo retrovirus? ¿Acaso algunos de estos elementos podrían pertenecer a otras cosas, podrían ser "semejantes a virus", por ejemplo...?

L.M.: Sí, e incluso tenemos retrovirus endógenos que a veces expresan partículas, pero que son de origen endógeno, y que por lo tanto no desempeñan un papel patológico, de todos modos no en el Sida. 7

D.T.: Pero entonces, ¿cómo se puede distinguir la diferencia?

L.M.: Porque logramos "transmitir" el virus. Transmitimos la actividad RT a nuevos linfocitos. Obtuvimos un máximo de replicación. Seguimos las huellas del virus. Es el conjunto de las propiedades lo que nos impulsó a afirmar que era un retrovirus. ¿Y por qué es nuevo? La primera pregunta que nos hizo la revista *Nature* fue: "¿No es una contaminación de laboratorio? ¿Se trata tal vez de un retrovirus de un ratón o de un retrovirus animal?". ¡A ello podíamos decir que no! Porque habíamos demostrado que el paciente tenía anticuerpos contra una proteína de su propio virus. ¡El conjunto tiene una lógica perfecta! Pero es

importante tomarlo como un conjunto. Si se toma cada propiedad de forma independiente, no son específicas. Es el conjunto lo que da la especificidad. 8

D.T.: Sin embargo, ¿usted observó partículas que parecían retrovirus a la densidad de los retrovirus? ¿Observó un nuevo retrovirus?

L.M.: A una densidad de 1,15, 1,16 tuvimos un máximo de actividad RT, que es la enzima característica de los retrovirus. 9

D.T.: ¿Pero podría ser otra cosa?

L.M.: No... yo opino que estaba muy claro [de que no se trataba de otra cosa]. Así, no podía ser otra cosa que no fuera un retrovirus. Dado que la enzima que F. Barré-Sinoussi caracterizó bioquímicamente requería magnesio, un poco como el HTLV en otro lugar. Requería la matriz, la plantilla, también el iniciador que era totalmente característico de una RT. No había lugar a dudas. En Septiembre de 1983 en Cold Spring Harbour, Gallo me preguntó si estaba seguro de que era una RT. Yo lo sabía, pues F. Barré-Sinoussi había hecho todos los controles necesarios. No se trataba de una simple polimerasa celular, sino que era una RT. Sólo funcionaba con iniciadores a ARN y hacía ADN. Estábamos seguros de eso. 10

D.T.: ¿Usted siguió el mismo procedimiento y tuvo las mismas dificultades con los otros retrovirus que encontró a lo largo de su carrera?

L.M.: Yo diría que en lo que se refiere al VIH, es un proceso fácil, comparado con los obstáculos con los que uno se encuentra con los otros [retrovirus]... porque el virus no emerge, o de hecho porque el aislamiento es esporádico –uno lo logra una vez de cada cinco tentativas. Estoy hablando de investigación corriente en otras enfermedades. Se puede citar el virus de la esclerosis múltiple del profesor Peron. Hace diez años me mostró su trabajo y le llevó alrededor de diez años encontrar finalmente una secuencia genética que tuviera tanta similitud con un virus endógeno. Lo ve...es muy difícil. Dado que no pudo “transmitir” el virus, no pudo lograr que emergiera en un cultivo in vitro, mientras que el VIH emerge por todos lados como la mala hierba. Por ejemplo, la cepa LAI [VIH] emerge como la mala hierba. Es por ese motivo que contaminó a los otros. 11

D.T.: ¿Con qué cultivó Usted los linfocitos de su paciente? ¿Fue con la línea celular H9?

L.M.: No, porque no funcionó en absoluto con la H9. Usamos muchas líneas celulares y lo único que logró producirlo fueron los linfocitos Tambon. 12

D.T.: Sin embargo, utilizando este tipo de elementos es posible introducir otras cosas capaces de inducir una RT y proteínas, etc...

L.M.: Estoy completamente de acuerdo. Ése fue el motivo por el que al final no estábamos tan interesados en emplear líneas celulares inmortales. Para cultivar el virus en serie, muy bien, pero no para caracterizarlo, porque sabíamos que íbamos a introducir otras cosas. Hay líneas celulares MT (MT2, MT4) que fueron encontradas por los japoneses, que replican al VIH muy bien, y que al mismo tiempo son transformadas por el HTLV. Por lo tanto, se tiene una mezcla de VIH y HTLV. Es una verdadera mezcla. 13

D.T.: Es más, ¿no es posible que los pacientes estén infectados por otros agentes infecciosos?

L.M.: Podría haber micoplasmas...podría haber muchas cosas. Pero afortunadamente tuvimos una experiencia negativa con los virus relacionados con los cánceres y ello nos ayudó, porque ya habíamos tropezado con todos estos problemas. Por ejemplo, un día tuve un máximo de RT muy bueno que me dio F. Barré-Sinoussi con una densidad un poco más alta, de 1,19, ¡y lo controlé! Era un micoplasma, no un retrovirus. 14

D.T.: Con el material purificado a la densidad de los retrovirus, ¿cómo es posible distinguir entre lo que es y lo que no es viral? Porque a esta densidad hay muchas cosas, como partículas "semejantes a virus", fragmentos celulares...

L.M.: Sí, es por ello que es más fácil trabajar con el cultivo celular en vitro porque se ven las etapas de producción de virus. Se tiene la gemación. Charles Dauge (un experto en EM) más bien observó las células. Por supuesto que miró el plasma, el concentrado, etc.... pero no vio nada importante. Puesto que si se hace un concentrado hay que obtener una sección ultra fina [para poder ver un virus con el EM], y para poder obtener una sección ultra fina hay que tener un concentrado cuyo tamaño sea por lo menos como el de la cabeza de una aguja. Así que se necesitan cantidades enormes de virus. En cambio, se obtienen muy fácilmente secciones ultra finas de células, y es en estas secciones en donde Charles Dauge encontró el retrovirus en diferentes fases de gemación. 15

D.T.: Cuando se observan las micrografías al microscopio electrónico que fueron publicadas, a Usted, que es retrovirologo, ¿le resulta claro que es un retrovirus, un nuevo retrovirus?

L.M.: No, llegados a ese punto no se puede afirmar. Las primeras micrografías de la gemación podían referirse a un virus de tipo C, pero no se puede distinguir. 16

D.T.: ¿Pero podría ser otra cosa que no sea un retrovirus?

L.M.: No...pues, después de todo, sí...podría ser otro virus en gemación. Pero existe un...tenemos un atlas. La experiencia es lo que nos hace entender lo que

es y lo que no es un retrovirus. Se puede distinguir de acuerdo a la morfología, pero hay que tener una cierta experiencia. 17

D.T.: ¿Por qué no utilizar la purificación para hacer tal distinción?

L.M.: Repito que no purificamos. Purificamos para caracterizar la densidad de la RT, que era firmemente la de un retrovirus. Pero no llegamos al máximo... o no funcionó... porque si se purifica, se daña. Así que, respecto a las partículas infecciosas, es mejor no tocarlas mucho. Entonces, simplemente se toma el sobrenadante del cultivo en vitro de linfocitos que han producido el virus y se lo coloca en pequeñas cantidades en algunos nuevos cultivos en vitro de linfocitos. Y por consiguiente, se transmite el retrovirus en serie y siempre se obtienen las mismas características, y se aumenta la producción cada vez que se lo transmite. 18

D.T.: ¿Por lo tanto la fase de purificación no es necesaria?

L.M.: No, no, no es necesaria. Lo que es esencial es transmitir el virus. El problema que tuvo Peron con el virus de la esclerosis múltiple fue que él no lograba transmitir el virus de un cultivo en vitro a otro. Éste es el problema. Logró hacerlo pero muy poco, pero no lo suficiente como para caracterizarlo. Y hoy en día caracterizar significa sobre todo hacerlo a nivel molecular. Si se hace, el procedimiento puede ser realizado más rápidamente. Entonces, para hacerlo se necesita comenzar con una secuencia de ADN, clonar este ADN, amplificarlo, secuenciarlo, etc... Entonces se tiene el ADN, la secuencia del ADN que nos dice si es realmente un retrovirus. Se conoce la estructura típica de los retrovirus, todos los retrovirus tienen una estructura genómica típica relacionada con un gen determinado que es característico. 19

D.T.: ¿Entonces la fase de purificación no es obligatoria para el aislamiento de retrovirus? ¿Se pueden aislar retrovirus sin purificar?

L.M.: Sí... no es obligatorio transmitir material puro. Sería mejor, pero existe el problema de que se lo daña y se disminuye la propiedad infecciosa de los retrovirus. 20

D.T.: ¿Sin pasar a través de esta fase de purificación, no existe el riesgo de confundir las proteínas que se identifican y también la RT, que podría proceder de otra cosa?

L.M.: No... después de todo, repito que si tenemos un máximo de actividad RT a la densidad de 1,15, 1,16 hay 999 posibilidades sobre 1.000 de que sea un retrovirus. Pero podría ser un retrovirus de origen diferente. Repito, existen algunos retrovirus endógenos, es decir, pseudo partículas que pueden ser emitidas por las células, pero aun así, proceden de la zona del genoma que proporciona los retrovirus. Los retrovirus endógenos se heredan y permanecen

en las células durante muchísimo tiempo. Pero finalmente, para obtener la prueba –porque las cosas evolucionan como la biología molecular, permitiendo actualmente una caracterización aún más fácil– es necesario pasar muy rápidamente a la clonación. Y tanto Gallo como nosotros mismos lo hicimos muy rápidamente. Clonación y secuenciación, es allí donde se tiene la caracterización completa. Pero repito, la primera caracterización es la pertenencia a la familia de los lentivirus, la densidad, la gemación, etc... las propiedades biológicas, la relación con las células T4. Todas estas cosas forman parte de la caracterización, y fuimos nosotros los que la llevamos a cabo. 21

D.T.: Pero se llega a un punto en que se debe llevar a cabo la caracterización del virus. Esto significa que ¿cuáles son las proteínas que lo componen?

L.M.: Eso es. Entonces el análisis de las proteínas del virus requiere producción en serie y purificación. Hay que hacerlo. Pero es aquí donde yo debería decir que hubo un fracaso parcial. J. C. Chermann estaba a cargo de eso, al menos en lo que respecta a las proteínas internas, pero tuvo dificultades en producir el virus y no funcionó. Pero éste era uno de los modos posibles, el otro modo era el de tener ácido nucleico, clonación, etc. Ésta es la manera en que funcionó muy rápidamente. De la otra manera no funcionó, porque en ese momento teníamos un sistema de producción que no era suficientemente contundente. No se tenían suficientes partículas producidas para purificar y caracterizar las proteínas virales. No se lo podía hacer. En ese momento no se podía producir mucho virus porque este virus no emergía en la línea celular inmortal. Lo logramos con el virus LAI [HIV], pero en ese momento no lo sabíamos. 22

D.T.: ¿Y Gallo lo logró?

L.M.: Gallo?... No se si realmente purificó, no lo creo. Creo que se lanzó muy rápidamente en el campo molecular, es decir, en la clonación. Lo que sí hizo es el Western Blot. Mientras nosotros usamos la técnica RIPA, entonces lo que el grupo norteamericano hizo y que era nuevo fue identificar algunas proteínas que no se habían visto bien con la otra técnica. Aquí tenemos otro aspecto de la caracterización del virus. No se lo puede purificar, pero si se conoce a alguien que tiene anticuerpos contra las proteínas del virus, se puede purificar el complejo anticuerpo-antígeno. Es lo que se hizo. Y por lo tanto se tenía una banda visible, clasificada a nivel radiactivo, con elementos que han sido llamados proteínas 25, p25. Y Gallo vio otras. Estaba la p25 que él denominó p24, estaba la p41 que vimos nosotros... 23

D.T.: Con respecto a los anticuerpos, numerosos estudios demostraron que estos anticuerpos reaccionan con otras proteínas o elementos que no forman parte del VIH, y que no pueden ser considerados suficientes para caracterizar a las proteínas del VIH.

L.M.: ¡No! Porque teníamos grupos de control. Teníamos individuos que no tenían Sida y que no tenían anticuerpos contra esas proteínas. Además, las técnicas que usamos eran técnicas que yo mismo refiné algunos años antes para detectar al gen src. Sabe que también el gen src fue detectado utilizando la inmunoprecipitación. Era la p60 [proteína 60]. Fui muy hábil, y también mi asistente, en utilizar la técnica RIPA. Si se obtiene una reacción específica, es específica. 24

D.T.: Pero sabemos que los pacientes con Sida están infectados por muchos otros agentes infecciosos que son susceptibles de...

L.M.: Ah sí, pero los anticuerpos son muy específicos, saben cómo distinguir una molécula en un millón. Existe una grandísima afinidad. Cuando los anticuerpos tienen una afinidad suficiente, se obtiene algo realmente muy específico. Mediante los anticuerpos monoclonales se obtiene realmente UNA proteína. Todo ello se emplea para detectar antígenos con fines diagnósticos. 25

D.T.: Según su parecer la p41 no era de origen viral, y entonces no pertenecía al VIH. Para Gallo era la proteína del VIH más específica. ¿Me puede explicar el motivo de esta contradicción?

L.M.: Ambos teníamos bastante razón. Es decir, yo tenía razón en utilizar mi técnica RIPA... en efecto, hay proteínas celulares que se encuentran en todos lados –hay un “ruido de fondo” no específico– y entre estas proteínas una es muy abundante en las células, la actina. Esta proteína tiene un peso molecular de 43.000 kd. Por lo tanto, estaba allí. Entonces yo tenía bastante razón, pero por otra parte, lo que Gallo vio era la gp41 del VIH, porque él estaba usando el Western Blot, y yo eso lo reconocí. 26

D.T.: Según su parecer la p24 era la proteína más específica del VIH, pero según Gallo no lo era en absoluto. Se comprende gracias a otros estudios que a los anticuerpos que se dirigen contra la p24 se los encontraba frecuentemente en pacientes que no estaban infectados por el VIH, e incluso en algunos animales. De hecho, hoy en día a una reacción de anticuerpos contra la p24 se la considera no específica.

L.M.: No es suficiente para diagnosticar la infección por el VIH. 27

D.T.: ¿Ninguna proteína es suficiente?

L.M.: De todos modos, una proteína no es suficiente. Pero en ese momento el problema no se reveló así. El problema era el de saber si era un HTLV o no. El único retrovirus humano conocido era el HTLV. Y demostramos claramente que no era un HTLV, que los anticuerpos monoclonales de Gallo ante la p24 del HTLV no reconocían a la p25 del VIH. 28

D.T.: A la densidad de los retrovirus, 1,16, hay muchas partículas, pero sólo un 20% de ellas pertenecen al VIH. ¿Por qué el 80% de las proteínas no son virales y las otras sí lo son? ¿Cómo se hace para distinguirlas?

L.M.: Hay dos explicaciones. Por un lado, a esta densidad se tienen elementos a los que se denomina microvesículas de origen celular, que tienen aproximadamente el mismo tamaño de los virus, y después el mismo virus, en gemación, trae consigo proteínas celulares. Así que, de hecho, estas proteínas no son virales, si no que son de origen celular. Entonces, ¿cómo se las puede distinguir? Honestamente, con esta técnica no se lo puede hacer con precisión. Lo que sí podemos hacer es purificar el virus hasta el máximo usando gradientes sucesivos, y siempre nos tropezamos con las mismas proteínas. 29

D.T.: ¿Las otras proteínas desaparecen?

L.M.: Digamos que las otras se reducen un poco. Se eliminan las microvesículas, pero cada vez se pierde mucho virus, por lo que al comienzo se necesita contar con una buena cantidad de virus para conservar un poco de éste cuando se llega al fin. Y después otra vez es el análisis molecular, la secuencia de estas proteínas lo que permitirá decir si son de origen viral o no. Esto es lo que comenzamos a hacer con respecto a la p25, que fracasó... y la otra técnica es realizar la clonación, y por lo tanto después se tiene el ADN, y del ADN a su vez se obtienen las proteínas. Se deduce la secuencia de las proteínas, su tamaño, y se tropieza otra vez con lo que se había observado en la inmunoprecipitación y en la electroforesis por gel. Conociendo el tamaño de las proteínas de otros retrovirus, estas proteínas se pueden deducir bastante a fondo por analogía. Entonces se tiene la p25 que tenía mucha similitud con la p24 del HTLV, se tiene la p18... al final tenemos las otras. Por otra parte, la proteína que era muy diferente era la p120, que es enorme. 30

D.T.: ¿Hoy en día se resolvieron los problemas relacionados con la producción en masa del virus, purificación, micrografías EM en la banda de densidad a 1,16?

L.M.: Sí, por supuesto. 31

D.T.: ¿Existen micrografías EM del VIH procedentes de la purificación?

L.M.: Sí, por supuesto. 32

D.T.: ¿Fueron publicadas?

L.M.: No sabría decirle... tenemos algunas en algún lugar... pero no interesan, no interesan en lo mas mínimo. 33

D.T.: Actualmente, mediante la producción en serie de virus, ¿es posible ver, después de la purificación, una EM de un gran número de virus?

L.M.: Sí, sí, desde luego. Uno las puede ver, incluso se ven bandas invisibles.
34

D.T.: Por lo tanto, según su parecer ¿el VIH existe?

L.M.: Oh, claro. Lo he visto y lo he encontrado. 35