

# As interpretações dos estudos de Avery, MacLeod e Maccarty sobre a natureza química do “fator transformante” em bactérias

---

Caroline Belotto Batisteti \*  
Elaine Sandra Nabuco de Araújo #  
João José Caluzi §

---

**Resumo:** Neste trabalho apresentamos o resultado parcial de uma dissertação de mestrado que discute os experimentos de Oswald Theodore Avery (1877-1955) e colaboradores sobre a natureza química da substância responsável por induzir a transformação bacteriana. Analisamos alguns livros-textos de genética, bioquímica e biologia molecular, bem como algumas publicações que abordam a história da biologia molecular. Concluímos que, embora o artigo de Avery, MacLeod e McCarthy, de 1944, seja considerado decisivo para atribuir ao ácido desoxirribonucleico (DNA) um papel de hereditariedade, há, nas fontes consultadas, poucas informações acerca das controvérsias sobre sua aceitação pela comunidade científica da época. Entendemos que esse assunto deve ser estudado com maior profundidade, com base em fontes primárias e secundárias confiáveis.

**Palavras-chave:** história da Biologia Molecular; fator transformante; DNA.

## The interpretations of MacCarty, MacLeod and Avery’s studies on the chemical nature of the “transforming factor” in bacteria

---

\* Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Educação para a Ciência, Universidade Estadual Paulista – Campus Bauru. E-mail: carolbatisteti@fc.unesp.br.

# Pesquisadora do Centro de Divulgação e Memória da Ciência e Tecnologia; Bolsista PRODOC/CAPES, Programa de Pós-Graduação em Educação para a Ciência, Universidade Estadual Paulista – Campus Bauru. E-mail: centro@fc.unesp.br

§ Departamento de Física da Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista – Campus Bauru e Programa de Pós-Graduação em Educação Para a Ciência / Universidade Estadual Paulista – Campus Bauru. E-mail: caluzi@fc.unesp.br.

**Abstract:** This paper presents the partial results of a Master Degree dissertation which discusses the experiments of Oswald Theodore Avery (1877-1955) and his collaborators on the chemical nature of the substance responsible for inducing bacterial transformation. We analyzed some Genetics, Biochemistry and Molecular Biology textbooks, as well as some publications which deal with the history of molecular biology. We concluded that, despite the fact that the 1944 article by Avery and his contributors is regarded as decisive to attribute to deoxyribonucleic acid its role in heredity, there is, in the consulted sources, little information about the controversies of its acceptance by the scientific community at the time. We think that this subject must be deeply studied, taking into account trustworthy primary and secondary sources.

**Keywords:** history of molecular biology; transforming factor; DNA

## 1 INTRODUÇÃO

A relação entre a molécula de DNA (ácido desoxirribonucleico) e a hereditariedade foi estabelecida nas décadas de 40 e 50 do século XX. Antes disso, os pesquisadores propuseram que a natureza química do material genético era protéica, pois somente as proteínas, com sua diversidade de formas, estudadas até então de modo freqüente, poderiam dar conta da complexidade da ação dos genes.

Neste artigo, inicialmente, comentaremos sobre os estudos de Frederick Griffith (1877-1941), publicados em 1966, a respeito da transformação bacteriana<sup>1</sup>, que são considerados fundamentais para o desenvolvimento dos trabalhos de Oswald Theodore Avery (1877-1955); Colin Munro MacLeod (1909-1972) e Maclyn McCarty (1911-2005), publicados em 1944, sobre a natureza química do “princípio transformante”<sup>2</sup>.

Em seguida, analisaremos o modo com que os estudos de Avery, MacLeod e McCarty são abordados em cinco livros-textos de genética (Debusk, 1971; Gardner & Snustad, 1986;

---

<sup>1</sup> Em linhas gerais, atualmente, a transformação bacteriana envolve a incorporação de DNA exógeno ao material genético das células bacterianas, resultando em uma recombinação gênica herdável. Griffith utilizava essa expressão ao referir-se à transformação de um tipo de pneumococos em outro, por exemplo, transformação do Tipo II de pneumococos em Tipo III.

<sup>2</sup> O termo “princípio transformante” diz respeito ao fator responsável pela transformação bacteriana.

Herskowitz, 1971; Stansfield, 1985; Thompson & Thompson, 1974); em um de bioquímica (Lenhinger, 2002), bem como em três publicações que abordam a história da biologia molecular (Acot, 2003; Hausmann, 2002; Watson & Berry, 2005).

### 1.1 A natureza química do “fator transformante”

O médico inglês Frederick Griffith dedicou-se ao estudo sobre os tipos de pneumococos, bactérias encontradas em casos de pneumonia lobar<sup>3</sup> de 1920 a 1927. A Tabela I apresenta o total de casos examinados por Griffith e a porcentagem de incidência dos tipos de pneumococos encontrados. No decorrer dessa pesquisa, ele percebeu a presença de dois ou mais tipos de pneumococos em uma amostra de secreção coletada de um paciente. Na tentativa de explicar essa observação, realizou vários experimentos envolvendo a transformação de um tipo de pneumococos para outro, a partir da inoculação de culturas em ratos.

**Tabela I.** Tipos de pneumococos em pneumonia lobar (Griffith, 1966, p. 130).

Período de investigação	Total de casos examinados	Porcentagem de incidência dos Tipos			
		Tipo I	Tipo II	Tipo III	Grupo IV
Abril 1920 - Jan. 1922	150	30.6	32.6	6.6	30.0
Fev. 1922 – Out. 1924	61	42.6	21.3	3.2	32.7
Nov. 1924 – Mar. 1927	67	34.3	7.4	4.4	53.7

O principal ponto de interesse da investigação Griffith foi “a diminuição progressiva no número de casos de pneumonia devida ao pneumococo Tipo II [...] os números podem revelar um real

---

<sup>3</sup> Pneumonia é a infecção do parênquima pulmonar, ocasionada por uma invasão de vírus, bactérias ou outros microorganismos. No caso da pneumonia lobar, uma seção do pulmão (lobo) é afetada.

decréscimo local do Tipo II, e um correspondente aumento dos casos do Grupo IV” (Griffith, 1966, p. 130).

A despeito da verificação em uma amostra (secreção) de uma linhagem do Grupo IV isolada, coletada em estágio avançado da pneumonia, Griffith ressaltou que isso não significava que esse grupo de pneumococos tenha causado, de fato, a doença. Ao examinar várias amostras coletadas em diferentes períodos, advindas de um mesmo caso, outros tipos foram identificados concomitantemente. Desse modo, haveria a possibilidade de que outros tipos causassem a doença.

Foram mencionadas por Griffith três possíveis explicações para a presença de dois ou mais tipos sorológicos em um mesmo caso, uma delas direcionada à hipótese de transformação, ou seja, a reversão de um Tipo de pneumococos em outro.

Griffith descreveu uma série de experimentos laboratoriais favoráveis à hipótese da transformação, em que ocorreram alterações nos tipos sorológicos. Ele utilizou “variantes” de pneumococos avirulentas e virulentas. Martin H. Dawson (1833-1871) resumiu as características que distinguem as duas formas de pneumococos:

As formas S são virulentas; elas produzem uma substância solúvel específica, que depende da especificidade do tipo; e elas formam colônias que têm uma superfície lisa quando examinada por luz refletida. As formas R são avirulentas; elas não produzem a substância solúvel específica e elas formam colônias que têm uma superfície rugosa quando similarmente examinadas. (Dawson, 1928, p. 577)

A designação S advém do termo *smooth*, e R do termo *rough*. A aparência lisa das colônias está relacionada à presença de uma cápsula de polissacarídeos nas bactérias virulentas. As bactérias não virulentas não apresentam esse envoltório.

Em seus experimentos sobre modificação, Griffith utilizou linhagens de pneumococos atenuadas R, obtidas de culturas de linhagens virulentas S. Ele verificou a reversão para formas virulentas S a partir da inoculação sob a pele de ratos, de uma larga dose de cultura avirulenta R atenuada. Para ele, a reversão da virulência era facilitada pela formação de uma massa de cultura de bactérias. Entretanto, Griffith considera que:

Esta proteção vinda de um mecanismo normal de defesa do animal não pode ser o único fator responsável por produzir a mudança, desde que, pneumococos atenuados R podem sobreviver inalterados em tecidos subcutâneos por duas ou três semanas sem qualquer proteção. (Griffith, 1966, p. 145)

A reversão da variante R para S era devida, conforme Griffith, ao fato das linhagens R atenuadas (obtidas originalmente de linhagens S) poderem reter em suas estruturas um antígeno S original, insuficiente em circunstâncias ordinárias de exercer um efeito patogênico no animal. Quando a linhagem R atenuada é inoculada em considerável massa sob a pele do rato, “a maioria dos pneumococos se rompe e o antígeno S liberado pode fornecer um *pabulum* que os pneumococos R viáveis podem utilizar para a construção de sua estrutura rudimentar S” (Griffith, 1966, pp. 145-146).

A substância ou antígeno S é, conforme Griffith:

Uma estrutura protéica específica dos pneumococos virulentos que os capacita a produzir um carboidrato solúvel específico. Esta proteína parece ser necessária como material que capacita a forma R a construir a estrutura protéica específica da forma S. (Griffith, 1966, p. 67)

Griffith realizou experimentos para verificar se condições mais favoráveis à reversão poderiam ser fornecidas a partir da inoculação em ratos de uma massa de cultura derivada de pneumococos virulentos mortos juntamente com uma pequena quantidade de pneumococos R atenuados. Isso mostraria, segundo ele, que a massa de cultura de bactérias e a alta concentração de antígeno S servem como um estímulo ou alimento para a reversão.

Griffith considerou que a inoculação de pequenas quantidades da linhagem R atenuada juntamente com quantidades maiores de linhagem S mortas por aquecimento constitui um método mais eficiente para a reversão das variantes R para S do que a inoculação de uma grande quantidade de linhagem R, apenas. A reversão da linhagem R para a sua forma S, a partir da inoculação de tipos distintos depende, de acordo com Griffith, do grau e do período de aquecimento da cultura virulenta. Um aquecimento à 60° C resulta na formação de pneumococos S virulentos do mesmo tipo da cultura aquecida. A justificativa de que a mudança teria ocorri-

do devido à sobrevivência de alguns pneumococos S, após o aquecimento, foi desconsiderada, pois, segundo Griffith, por meio dos métodos de cultura e inoculação animal, não houve evidências de pneumococos viáveis nas culturas aquecidas. Para ele, “parece não haver outra alternativa para a hipótese da transformação dos tipos” (Griffith, 1966, p. 170).

Apesar de os livros didáticos de Biologia e Bioquímica frequentemente relacionarem o termo “princípio ou fator transformante” aos experimentos de Griffith, ressaltamos que este não foi mencionado no seu trabalho. A palavra transformação foi utilizada por Griffith para referir-se à reversão de uma variante para outra e, para ele, a substância S necessária para ocorrência deste processo era uma proteína.

A palavra utilizada por Griffith (transformação) possui um significado descritivo, apenas. Ela possui o antepositivo *form*, do latim, *forma*, que possui o significado de “forma, figura exterior, aparência, formato”. O prefixo *trans*, da preposição *trans*, do latim, atribui às palavras cinco possíveis acepções, uma delas é a acepção de “mudança”. Finalmente, *ação*, que, entre outras, possui a acepção de “capacidade, possibilidade de executar alguma coisa”. Assim, a palavra *transformação* significa “capacidade de mudar a forma”. No caso, a mudança de uma aparência rugosa para uma lisa (R → S), ou seja, de uma bactéria avirulenta para uma virulenta. A introdução do substantivo fator, que possui as acepções “aquele que determina ou executa algo”, ou “qualquer elemento que concorre para um resultado”, deixa de ser apenas descritivo para uma especulação causal: aquilo que determina a capacidade de mudar de forma. Não sabemos quem cunhou a expressão “fator transformante”, que é bastante utilizada nos livros-textos atuais e atribuído a Griffith. Como afirmamos, em seu trabalho ele usa a expressão *transformação*, que, como explicamos anteriormente, possui conotações diferentes.

## 1.2 Os experimentos de Avery, MacLeod e MacCarty

Os pesquisadores Avery, MacLeod e McCarthy, iniciaram um trabalho de análise mais detalhada do fenômeno de transformação dos tipos de pneumococos (Avery, MacLeod & MacCarty, 1944). Estavam interessados em isolar o fator capaz de induzir a “trans-

formação” de variantes não virulentos oriundos de *Pneumococcus* Tipo II em *Pneumococcus* virulentos Tipo III e se possível identificar a sua natureza química ou ao menos caracterizá-lo o suficiente para classificá-lo em grupos gerais de substâncias químicas conhecidas, isto é, proteínas, lipídios, polissacarídeos ou ácidos nucléicos.

Para esse estudo, escolheram para investigação, um exemplo típico de transformação, anteriormente realizado por Griffith – a transformação de uma variante R de pneumococos Tipo II para pneumococos Tipo III (Avery, MacLeod & MacCarty, 1944). Seus experimentos foram desenvolvidos *in vitro*, o que exigiu o conhecimento de diversas condições de cultura das amostras utilizadas – muitas delas já descritas em trabalhos anteriores por outros pesquisadores.

Dawson e Richard H. P. Sia, em 1931, efetuaram experimentos de transformação *in vitro* correspondentes aos que Griffith havia realizado *in vivo*. Um deles consistia no crescimento de pequenas quantidades de uma cultura R em meio de cultura adequada para o qual havia sido adicionada uma vacina<sup>4</sup> de Tipo S heteróloga (por exemplo, utilizava uma cultura R derivada de pneumococos S Tipo II e uma vacina de pneumococos Tipo III) – o que resultava na transformação das formas R para S do mesmo tipo empregado na vacina. Mostraram que tanto quanto *in vivo*, a transformação *in vitro* poderia ser seletivamente induzida, dependendo da especificidade do tipo de células S utilizadas, e, encontraram algumas condições de produção das reações: para os experimentos serem bem sucedidos havia que ser adicionado ao meio de cultura soro ou hemácias, e, a transformação dos tipos era mais facilmente efetuada pelo emprego de soro anti-R no meio de cultura.

Em 1932, Lionel J. Alloway mostrou que o princípio ativo responsável pela transformação poderia ser extraído das células S na *forma solúvel*, e concluiu que, “Pneumococos R avirulentos derivados de formas S de um tipo específico poderiam ser transformados pelo crescimento em caldo contendo soro anti-R e um aquecido, extrato filtrado de células S de pneumococos de um tipo

---

<sup>4</sup> Células S encapsuladas mortas pelo calor.

diferente, para organismos S virulentos idênticos em tipo com as bactérias extraídas” (Alloway, 1932, p. 98). Alloway, em 1933, mencionou que os métodos utilizados nos experimentos de seu trabalho acima citado resultaram na perda de uma quantidade considerável de substância ativa, o que o levou a descrever métodos mais eficientes de extração e purificação dos extratos:

Extratos de pneumococos altamente ativos em induzir a transformação *in vitro* de tipos específicos de pneumococos têm sido preparados pela dissolução de células S com desoxicolato de sódio, precipitação do material dissolvido em álcool [...], e extração do precipitado em solução salina. (Alloway, 1933, p. 277)

Na discussão do seu trabalho, Alloway afirmou:

Os experimentos apresentados fornecem evidência adicional que a transformação em tipo não é aparente, mas real, e que as mudanças são causadas na presença do extrato por meio da ação específica de um constituinte solúvel presente nas formas S de pneumococos. É quase inconcebível que algum elemento vivo nas células de pneumococos poderia sobreviver aos procedimentos drásticos empregados na preparação dos extratos. (Alloway, 1933, p. 276)

Os trabalhos citados anteriormente, praticamente contemporâneos aos estudos de Avery, MacLeod e McCarthy foram fundamentais para que eles desenvolvessem os procedimentos metodológicos que adotaram em seus experimentos. Isso evidência o processo de construção do conhecimento científico, a partir dos trabalhos de grupos de pesquisas que refutam ou corroboram as idéias de outros. Essas idéias podem ser aceitas e utilizadas pela comunidade científica ou não.

Os experimentos de Dawson e Sia, como os de Alloway, influenciaram muito provavelmente os procedimentos experimentais utilizados por Avery, MacLeod e McCarthy. Nestes, todos os fatores descritos anteriormente relacionados às condições de uma melhor produção do processo de transformação estão presentes: utilização de um caldo de carne nutriente enriquecido com fluido aquoso ou soro, de fluido do pulmão contendo anticorpos R; produção de um extrato, purificação e esterilização do material com álcool.



Avery, MacLeod e McCarthy mencionaram que:

A efetividade de diferentes partes do soro variava e que as diferenças observadas não foram necessariamente dependentes do conteúdo de anticorpos R, desde que muitos soros de alto título foram incapazes de dar suporte à transformação. Este fato sugere que outros fatores além de anticorpos R estão envolvidos. (Avery, MacLeod, MacCarty, 1944, p. 139)

Avery considerou importante para a obtenção de resultados consistentes e reproduzíveis: o conhecimento de que as células de pneumococos possuem uma enzima intracelular que destrói a atividade do princípio transformante (esta é inativada quando o soro é aquecido a 60-65°C) e, a seleção cautelosa de uma variante R adequada – pois uma cultura R pode submeter-se a sucessivas dissociações e resultar em variantes que perdem a capacidade de responder aos estímulos transformantes. A variante R selecionada por Avery resultou de sucessivas culturas seriadas de pneumococos S do Tipo II.

Foi interessante o desenvolvimento de um método para determinar quantitativamente a atividade transformante de diversas frações de material ativo. Todos os fatores, condições de cultura e técnicas anteriormente citadas foram considerados. Os resultados dessa titulação da atividade transformante foram interpretados da seguinte maneira:

As propriedades anti-R do soro no meio induzem as células R a aglutinarem durante o crescimento, e massas uniformes de células aglutinadas depositam-se no fundo do tubo deixando um sobrenadante claro. Quando a transformação ocorre, as células S encapsuladas, não sendo afetadas por estes anticorpos, crescem difusamente por todo o meio. Em outras palavras, na ausência da transformação o sobrenadante permanece claro, e somente crescimento sedimentado de células R ocorre. (Avery, MacLeod & MacCarty, 1944, p. 142)

Em seu artigo de 1944, Avery, MacLeod e MacCarty discorreram sobre os métodos para isolamento do princípio transformante. O material de origem do princípio ativo foi uma linhagem de pneumococos Tipo III que, dentre diversos procedimentos de crescimento e conservação, foram aquecidos a uma temperatura

de 65°C por 30 minutos (para inativação da enzima intracelular que destrói o princípio de transformação).

As células mortas pelo calor foram lavadas com salina, o que promoveu a remoção de uma grande parte de polissacarídeos capsulares, muitas das proteínas e ácido ribonucléico. Essas células foram então extraídas em salina contendo desoxicolato de sódio e separadas por centrifugação. Esses extratos foram combinados e precipitados em álcool etílico absoluto – como o desoxicolato de sódio é solúvel em álcool, ele permaneceu no sobrenadante tendo sido retirado. O precipitado formou uma massa fibrosa que flutuava na superfície do álcool, que foi retirada; o excesso de álcool drenado e o precipitado re-dissolvido em salina.

O próximo passo foi a “desproteínização” e a remoção do polissacarídeo capsular, por meio do uso de uma preparação purificada da enzima de bactérias capaz de hidrolisar (ou quebrar) o polissacarídeo capsular Tipo III. O método de “desproteínização” foi novamente aplicado para “remover as enzimas proteínas adicionadas e os traços de proteínas de pneumococos restantes” (Avery, MacLeod & MacCarty, 1944, p. 143). Seguiu-se um fracionamento repetido do material em álcool etílico, para se obter a maior porção de material ativo que pudesse estar presente no extrato bruto original.

Tendo em vista a grande quantidade de informações presentes e espaço disponibilizado para o presente artigo, fizemos aqui uma breve descrição acerca dos procedimentos utilizados por Avery, MacLeod e McCarthy, principalmente no que se refere ao método de titulação da atividade transformante e procedimentos para isolamento e purificação do princípio ativo. Essas técnicas podem ser encontradas, respectivamente, de forma detalhada em Avery, MacLeod e MacCarty (1944, pp. 141-144).

### **1.3 Análises do material transformante purificado**

Na tentativa de identificar o princípio ativo, Avery, MacLeod & MacCarty (1944) realizaram análises de diversas naturezas. Tratamos aqui de alguns aspectos relevantes presentes no referido artigo – que reflete claramente uma busca incessante em relacionar o fator transformante ao DNA.

Em análises químicas, foram examinadas quatro preparações purificadas sobre o conteúdo de nitrogênio, carbono, hidrogênio e

fósforo. A razão entre nitrogênio/fósforo foi estabelecida. A média do valor das razões encontradas estava “intimamente de acordo com aquele calculado nas bases da estrutura teórica da desoxirribonuclease de sódio”. Em seguida complementaram: “Os números analíticos por si sós não estabelecem que a substância isolada seja uma entidade química pura” (Avery, MacLeod & MacCarty, 1944, p. 145).

**Tabela II.** Inativação do princípio transformante por preparações de enzimas brutas (Avery, MacLeod & MacCarty, 1944, p. 146).

Preparações enzimáticas brutas	Atividade enzimática			
	Fosfatase	Trybutyrin esterase	Depolimerase para Desoxirribonuclease	Inativação do princípio transformante
Mucosa intestinal de cachorro	+	+	+	+
Fosfatase de osso de coelho	+	+	-	-
Rim suíno	+	-	-	-
Pneumococos autolisados <sup>5</sup>	-	+	+	+
Soro normal de coelho e cachorro	+	+	+	+

Diversas enzimas foram testadas para sua capacidade de destruir a atividade biológica em extratos potentes. O tratamento dos extratos com tripsina<sup>6</sup>, quimiotripsina e ribonuclease<sup>7</sup> não tiveram nenhum efeito sob o princípio transformante. Este fato, segundo os autores, “é evidência adicional que esta substância não é ácido ribonucléico ou uma proteína suscetível da ação de enzimas trípti-

<sup>5</sup> A autólise é um processo pelo qual a célula se autodestrói espontaneamente.

<sup>6</sup> A tripsina e a quimiotripsina são tipos de enzimas que agem sobre proteínas.

<sup>7</sup> Enzima que cliva a molécula de RNA pela hidrólise de suas ligações.

cas” (Avery, MacLeod & MacCarty, 1944, p. 146). Além dessas enzimas, os testes envolveram preparações enzimáticas obtidas de órgão de vários animais. Essas preparações foram testadas em relação a diferentes atividades enzimáticas e os resultados foram comparados com a capacidade de destruição do princípio transformante. A Tabela II resume os dados encontrados.

**Tabela III.** Inativação térmica diferencial de enzimas em soro de cachorro e coelho que destrói a substância transformante (Avery, MacLeod & MacCarty, 1944, p. 148).

	Tratamento térmico do soro	Diluição*	Testes triplicados					
			1		2		3	
			Crescimento Difuso	Forma da colônia	Crescimento Difuso	Forma da colônia	Crescimento Difuso	Forma da colônia
Soro do cachorro	Não aquecido	Não diluído	-	so- mente R	-	so- mente R	-	so- mente R
		1:5	-	“	-	“	-	“
		1:25	-	“	-	“	-	“
	60°C por 30 min.	Não diluído	+	SIII	+	SIII	+	SIII
		1:5	+	SIII	+	SIII	+	SIII
		1:25	+	SIII	+	SIII	+	SIII
	65°C por 30 min.	Não diluído	+	SIII	+	SIII	+	SIII
		1:5	+	SIII	+	SIII	+	SIII

Soro do coelho	Não aquecido	Não diluído	-	so- mente R	-	so- mente R	-	so- mente R
		1:5	-	“	-	“	-	“
		1:25	-	“	-	“	-	“
	60°C por 30 min.	Não diluído	-	“	-	“	-	“
		1:5	-	“	-	“	-	“
		1:25	-	“	-	“	-	“
	65°C por 30 min.	Não diluído	+	SIII	+	SIII	+	SIII
		1:5	+	SIII	+	SIII	+	SIII
		1:25	+	SIII	+	SIII	+	SIII
Controle (nenhum soro)	Ne- nhum	Não diluído	+	SIII	+	SIII	+	SIII
		1:5	+	SIII	+	SIII	+	SIII
		1:25	+	SIII	+	SIII	+	SIII

\* Diluição da mistura da essência do soro e substância transformante.

Interessante foi a justificativa dada por Avery para a realização do teste da atividade com a depolimerase:

Visto que no material transformante altamente purificado isolado de extratos de pneumococos foi encontrado ácido desoxirribonucléico, estas mesmas enzimas foram testadas para atividade depolimerase sob conhecidas amostras de ácido desoxirribonucléico isolado. (Avery, MacLeod & MacCarty, 1944, p. 146)

Em cada análise, os elementos anteriormente obtidos eram sempre considerados – por exemplo, nas análises químicas ele havia obtido dados que o levaram a pensar que ao menos um dos componentes do princípio ativo poderia ser o DNA, então, por

que não testar a atividade da enzima que age sobre o DNA em relação ao princípio transformante?

Sobre a análise dos resultados dos testes acima realizados, os investigadores concluíram que:

Independentemente da presença de fosfatase ou esterase somente aquelas preparações que mostraram conter uma enzima capaz de despolimerizar amostras autênticas de ácido desoxirribonucléico eram encontradas inativar o princípio transformante. (Avery, MacLeod & McCarty, 1944, pp. 146-147)

Estes autores realizaram procedimentos, envolvendo o método de titulação, descrito anteriormente, para verificar o efeito do soro de coelho e cachorro sob a atividade do princípio transformante. Os dados são apresentados na tabela III.

Os dados apresentados na Tabela III indicam que, na ausência de tratamento térmico, ambos os soros eram capazes de destruir completamente a atividade do fator transformante. Enquanto o aquecimento à 60°C foi suficiente para inativar completamente a enzima responsável por destruir o princípio transformante presente no soro do cachorro; para destruição completa da enzima correspondente no soro do coelho foi necessário aquecimento à 65°C.

Essas mesmas amostras dos soros de cachorro e coelho foram testadas em relação as suas atividades de depolimerase sob uma preparação de desoxirribonuclease de sódio. A quantificação da atividade foi medida acerca da viscosidade. Basicamente, Avery, MacLeod e McCarthy encontraram que ambos os soros, quando não aquecidos, apresentavam baixa viscosidade, e, portanto, a atividade da depolimerase estava presente, entretanto, quando aquecidos à 65°C a viscosidade relativa era alta, ocorrendo destruição completa da depolimerase.

Somente o fluoreto, dentre as várias substâncias testadas sobre suas capacidades em inibir a ação da enzima que destrói o princípio de transformação, apresentou efeito significativo. Segundo Avery havia sido encontrado que o fluoreto, nas mesmas concentrações, inibia também a despolimerização do DNA.

O fato que a atividade transformante é destruída somente por aquelas preparações contendo depolimerase para ácido desoxirribonucléico e que em ambos os exemplos as enzimas relacionadas

são inativadas para a mesma temperatura e inibidas pelo fluoreto fornecem evidência adicional para a crença que o princípio ativo é um ácido nucléico do tipo desoxirribose. (Avery, MacLeod & MacCarty, 1944, pp. 149-150)

De acordo com as análises sorológicas, a perda de reatividade sorológica do material ativo isolado indicou que constituintes como proteínas de pneumococos e proteínas capsulares estavam *quase* completamente removidas das preparações finais.

Percebemos que Avery, apesar de excluir a possibilidade da presença de proteínas, não afirma convincentemente que o único constituinte do princípio ativo seria o DNA. Nas frases: “é de especial interesse que no exemplo estudado, material altamente purificado e livre de proteínas consistindo grandemente, se não exclusivamente” (Avery, MacLeod & MacCarty, 1944, p. 152), e “a evidência apresentada suporta a crença que um ácido nucléico do tipo desoxirribose é a unidade fundamental do princípio transformante” (*Ibid.*, p. 156), a afirmação acima é evidenciada.

Destacamos a colocação de Avery sobre uma possível limitação dos métodos:

Os dados obtidos por análises químicas, [...] indicam que, dentro dos limites dos métodos, a fração ativa não contém proteínas demonstráveis [...] e consiste principalmente, se não somente, de forma altamente polimerizada, viscosa de ácido desoxirribonucléico. (Avery, MacLeod & MacCarty, 1944, p. 156, sem ênfase no original)

Na discussão, Avery, MacLeod e MacCarty (1944, p. 154) percorreram seus entendimentos acerca do processo envolvido na transformação:

Os eventos bioquímicos que são a base do fenômeno sugerem que o princípio transformante interage com a célula R causando uma série coordenada de reações enzimáticas que culminam na síntese do antígeno capsular Tipo III. Os achados experimentais têm claramente demonstrado que as alterações induzidas não são aleatórias mas previsíveis, sempre correspondendo em especificidade do tipo para aquelas das células encapsuladas da qual a substância transformante foi isolada. Uma vez que a transformação tem ocorrido, as características novamente adquiridas são desde então transmitidas em séries através de inúmeras transferências em meio artificial sem nenhuma adição do agente transformante.

[...] É evidente, portanto, que não somente o material capsular é reproduzido em sucessivas gerações mas que o fator primário, que controla a ocorrência e a especificidade do desenvolvimento capsular, é também reduplicado nas células filhas. [...] Igualmente, se não mais significativo é o fato que estas mudanças são previsíveis, tipo-específicas, e herdáveis. (Avery, MacLeod & MacCarty, 1944, p. 154)

Avery relacionou às mudanças à hereditariedade, mas não deixou claro o estabelecimento entre uma possível função do DNA nesse processo. As questões levantadas sobre a limitação dos métodos e a identificação de uma entidade química talvez *não* pura podem ter aberto espaço para um campo obscuro de dúvidas.

## **2 A APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS POR AVERY, MACLEOD E MCCARTHY NOS LIVROS DIDÁTICOS**

Dada a importância dos estudos de Avery, MacLeod e McCarthy considerados como desencadeadores da idéia de DNA como material genético, os seus resultados são frequentemente abordados em livros-textos de Genética e Bioquímica. Seleccionamos alguns desses livros utilizados nos cursos de graduação em áreas biológicas, incluindo os cursos de Licenciatura em Ciências Biológicas. A Tabela IV apresenta os títulos das publicações por nós analisadas:

A seguir, uma discussão acerca das abordagens históricas apresentadas nas publicações mencionadas na Tabela IV.

### **2.1 Interpretações historiográficas sobre os resultados obtidos por Avery, MacLeod e McCarthy**

Em estudos históricos que discutem sobre a contribuição de Avery, MacLeod e McCarthy é possível encontrar diferentes posições como, por exemplo, a de Pascal Acot que comentou:

Em nenhum momento Avery menciona a idéia de hereditariedade nesse artigo. Muitos historiadores das ciências consideram que Avery focaliza estritamente sua reflexão no fator transformante do pneumococo, o que teria impedido de compreender plenamente o papel do DNA em matéria de hereditariedade. (Acot, 2003, p. 4)



**Tabela IV.** Dados das publicações analisadas

Título	Autor	Ano de publicação
<i>Genética Molecular</i>	Aron Gib. Debusk	1971
<i>Genética Médica</i>	James. S. Thompson e Margaret W. Thompson.	1974
<i>Genética</i>	Eldon J. Gardner e D. Peter Snustad	1986
<i>Princípios básicos de genética molecular</i>	Irwin H. Herskowitz	1971
<i>Genética</i>	William D. Stansfield	1985
<i>Princípios de Bioquímica</i>	Albert L. Lehninger	2002
<i>História da Biologia Molecular</i>	Rudolf Hausmann	2002
<i>A dupla revolução da dupla hélice</i>	Pascal Acot	2003
<i>DNA: o segredo da vida</i>	James D. Watson e Andrew Berry	2005

Destacamos que Avery, MacLeod e McCarthy, na conclusão de seu artigo, não evidenciaram a relação entre o DNA e hereditariedade. Porém, na introdução mencionaram os esforços de biólogistas para entender quimicamente o mecanismo de indução de mudanças previsíveis e específicas em organismos superiores que poderiam ser transmitidas em séries como características hereditárias. Em seguida, os autores relataram os exemplos de alterações herdáveis e específicas em microorganismos.

No livro *História da Biologia Molecular*, Rudolf Hausmann também fez considerações acerca da conclusão do trabalho de Avery:

Em suma, o trabalho ao qual [...] Avery dedicou totalmente os últimos anos da sua vida [...] era minucioso e inatacável, valendo até hoje de competência e técnica e escrupulosidade. Porém a única afirmação que os três autores ousaram fazer foi: “as observações expostas apóiam a suposição de que um ácido nucléico, do tipo da desoxirribose, seja a unidade básica do princípio transformante do *Pneumococcus* Tipo III”. (Hausmann, 2002, p. 98)

Ressaltamos que Hausmann aventou que um dos motivos que levaram Avery a omitir a relação entre a hereditariedade e o DNA, pode ter sido:

Porém, quem sabe?... Talvez o gene protéico fosse especialmente termoresistente? Ou talvez fossem os genes protegidos pelo DNA, que possivelmente, desempenhavam uma função decisiva, embora não determinante de especificidade? O engano de Willstätter<sup>8</sup> em relação à natureza das enzimas [...], cerca de 15 anos antes, ainda estava vívido na lembrança! Avery *et al.* (1944) se eximiam com cautelas. (Hausmann, 2002, p. 92)

Acot mencionou que alguns historiadores atribuem à excessiva modéstia de Avery o fato dele não ter interpretado o DNA como responsável pela hereditariedade e acrescentou:

A seu favor, convém lembrar que em 1944 a comunidade científica não estava pronta para atribuir ao DNA um papel de hereditariedade, considerando que esta molécula era por demais regular e monótona em comparação com a complexidade tão rica das proteínas. Muitos pesquisadores avançaram, portanto a idéia de que os resultados de Avery podiam explicar-se por uma contaminação das preparações de DNA pelos traços de proteínas. (Acot, 2003, p. 4)

Com relação às controvérsias acerca da aceitação dos resultados de Avery pela comunidade científica, elas são reportadas no livro *DNA: o segredo da vida* de James Dewey Watson e Andrew Berry da seguinte forma:

Em parte por causa das suas implicações explosivas, a monografia apresentada em 1944 por Avery, MacLeod e McCarty foi recebida com sentimentos ambíguos. Muitos geneticistas aceitaram as conclusões. Afinal, se o DNA é encontrado em todo cromossomo, por que não haveria de ser o material genético por excelência? Por sua vez, contudo, a maioria dos bioquímicos expressou dúvida quanto ao DNA ser uma molécula suficientemente complexa para agir como repositório de uma quantidade tão vasta de in-

---

<sup>8</sup> Segundo Hausmann, Richard Willstätter afirmava que enzimas não eram proteínas (Hausmann, 2002).

formações biológicas. Continuaram acreditando que as proteínas, o outro componente dos cromossomos, acabariam por se revelar a substância da hereditariedade. (Watson & Berry, 2005, p. 52)

Hausmann citou alguns autores, entre eles, Erwin Chargaff e Joshua Lederberg que enunciaram, após a década de 60, a importância dos trabalhos de Avery. Porém, ainda segundo Hausmann, nas publicações de Chargaff (1950) e de Norton D. Zinder e Lederberg (1952), os trabalhos de Avery foram citados de forma irrelevante. Ele ainda acrescentou que, estes trabalhos foram omitidos em três publicações de 1953, na de James Watson e Francis Crick, na de Maurice H. F. Wilkings, Alex R. Stokes & Herbert R. Wilson e na de Rosalind Franklin e Raymond G. Gosling (Hausmann, 2002, pp. 92-93).

A partir das considerações anteriores, percebemos indícios que apontam para o baixo impacto dos trabalhos de Avery dentro da comunidade científica da época. Além das publicações aqui analisadas que tratam da história da biologia molecular, no livro texto de Lenhinger a hipótese de contaminação do preparado de DNA por vestígios protéicos levantada por pesquisadores na época também foi mencionada, conforme a citação a seguir:

Avery e seus colaboradores concluíram que o DNA extraído da cepa virulenta transportava a mensagem geneticamente herdável da virulência. *Nem todos aceitaram essas conclusões, porque traços de impurezas protéicas presente no DNA poderiam ter sido o transportador real da informação genética. Essa possibilidade logo foi eliminada pela descoberta de que o tratamento do DNA com enzimas proteolíticas não destruiu a atividade transformadora, mas sim o tratamento com desoxirribonuclease (enzimas que hidrolisam o DNA).* (Lenhinger, 2002, p. 256, sem ênfase no original)

Chamamos a atenção para o fato de que, Avery, MacLeod e McCarthy, diferente da afirmação de Lenhinger, não relacionaram o DNA à hereditariedade diretamente. Além disso, o trecho em destaque na citação anterior induz a pensar que os tratamentos com proteases, desoxirribonucleases e ribonucleases, foram realizados em um experimento posterior aos relatados no artigo de Avery, MacLeod e McCarthy (1944). Porém, nesse artigo, já estão descritos tais tratamentos.

Diante da constatação de que o livro texto citado anteriormente faz referências a aspectos históricos do tema em questão, na próxima sub-seção discutimos as possíveis abordagens históricas presentes nos livros textos analisados.

## **2.2 Abordagens históricas dos trabalhos de Avery, MacLeod e McCarthy nos livros-textos analisados**

Os trabalhos de Avery, MacLeod e McCarthy são abordados em todas as fontes por nós consultadas. Constatamos que, nos livros textos analisados, em geral, nos tópicos em que são descritos os experimentos de Avery acerca da natureza química do “princípio transformante”, há uma relação direta entre esse e o material genético. Por exemplo, em Aron Gib Debusk (1971), o tópico intitula-se *O DNA como material genético*. Idéia similar é apresentada nos tópicos de Gardner e Snustad (1986) e Lenhinger (2002), em que os trabalhos de Avery são discutidos. Contudo, conforme já comentamos na análise histórica, esta relação não é claramente estabelecida por Avery, MacLeod e McCarthy. Em Thompson e Thompson (1974), a palavra *Evidências* no título do tópico, sugere certa cautela na abordagem dos experimentos de Avery como *evidências* de que o DNA é o material genético. Já em Herskowitz (1971), o título *A transformação genética de bactérias* aparentemente preocupa-se em fornecer informações recentes acerca da transformação, pois utiliza a palavra genética que não foi empregada por Griffith em seus trabalhos sobre transformação bacteriana e nem por Avery, MacLeod e McCarthy.

Para Lenhinger, os trabalhos de Avery foram a “primeira evidência direta de que o DNA é o possuidor da informação genética” (Lenhinger, 2002). Esta opinião é compartilhada pelos outros autores de livros-textos por nós analisados, ver tabela IV. No entanto, conforme discutido no subitem anterior, evidências sugerem que pesquisadores renomados da época não consideraram em suas pesquisas os dados obtidos por Avery – sendo estes completamente ignorados. Isso parece estabelecer uma enorme contradição entre o que livro-texto dispõe atualmente como fundamental evidência ao desenvolvimento da relação DNA - informação genética e a importância atribuída aos trabalhos, no período em que foram publicados, que permeavam essa idéia.

Herskowitz (1971) fez uma breve descrição a respeito da maneira como o material genético de uma bactéria pode ser modificado por DNA de uma linhagem diferente, porém em momento algum mencionou os nomes de Griffith ou Avery. Interpretamos essa abordagem como ahistórica. Stansfield (1985) não fez referência aos trabalhos de Avery.

Lenhinger (2002), apesar de iniciar a temática aqui tratada com uma perspectiva histórica diacrônica, se referindo aos estudos do núcleo da célula, posteriormente, quando se referiu à relação do DNA com a informação genética fez uma descrição bastante simplista dos experimentos de Avery:

Esses pesquisadores descobriram que o DNA extraído de uma cepa virulenta (causadora da doença) da bactéria *Streptococcus pneumoniae*, também conhecida como pneumococo, transformava geneticamente uma cepa não-virulenta desse organismo em uma forma virulenta. (Lenhinger, 2002, p. 256)

Ressaltamos que Avery, MacLeod e McCarthy não utilizaram expressões como “transformava geneticamente”.

Em Thompson e Thompson observamos uma história anacrônica: “A interpretação foi de que algum DNA do Tipo III S foi incorporado ao material genético dos II R, ocasionando uma transformação permanente” (Thompson & Thompson, 1974, p. 23).

Consideramos as abordagens de Lenhinger (2002) e Thompson e Thompson (1974), anteriormente mencionadas, problemáticas, pois as explicações atuais foram utilizadas como se tivessem sido dadas por Avery, o que ocasiona distorções históricas.

Em DeBusk, encontramos uma história pautada em nomes e datas: “Foi somente em 1944 que três pesquisadores, Avery, MacLeod e McCarty, realizaram o experimento crucial de fracionamento das células mortas para identificar a substância responsável pela transformação” (Debusk, 1971, p. 19) – o que frente a todo o contexto científico metodológico em que os experimentos de Avery ocorreram é extremamente reducionista.

No livro *Genética*, embora os experimentos de Avery não tenham sido tratados de forma detalhada, os autores lembraram que “Avery, MacLeod e McCarty publicaram o resultado de um conjunto de extensos e trabalhosos experimentos” (Gardner & Snus-

tad, 1986, p. 64). Há um panorama geral do contexto científico existente durante os trabalhos de transformação de pneumococos, principalmente àqueles referentes a Griffith – o que a nosso ver permite que os leitores desse livro reconheçam que a construção de um conhecimento científico não se dá de forma isolada ou pontual.

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Percebemos que o artigo de Avery, MacLeod e McCarthy (1944) foi decorrente de estudos anteriores efetuados por eles, bem como por outros pesquisadores, entre os quais Griffith, Alloway e Dawson – que estavam inseridos num contexto de trabalhos sobre transformação bacteriana. As fontes secundárias por nós consultadas, que tratam da história da biologia molecular, reforçam a idéia de que há um hiato entre a publicação do artigo de 1944 e o reconhecimento da molécula de DNA como material genético. Porém, nenhuma delas discute profundamente as causas desse fato. Com relação aos livros-textos analisados, consideramos que em geral há uma abordagem histórica superficial do tema estudado, sendo que, alguns deles apresentam informações que não são consistentes com o artigo de Avery, por exemplo, Acot (2003) e Lenhinger (2002). Reforçamos a necessidade de novos estudos relacionados ao tema, baseados em fontes primárias e secundárias confiáveis – o que é principal objeto de uma pesquisa mais aprofundada que estamos desenvolvendo.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOT, Pascal. A dupla revolução da dupla hélice. *Ciência & Ambiente* **26**: 7-26, 2003.
- ALLOWAY, J. Lionel. The transformation in vitro of R pneumococci into S forms of different specific types by the use of filtered pneumococcus extracts. *The Journal of Experimental Medicine* **55**: 91-99, 1932.
- . Further observations on the use of pneumococcus extracts in effecting transformation of type in vitro. *The Journal of Experimental Medicine* **57** (2): 265-278, 1933.
- AVERY, Oswald Theodore.; MACLEOD, Colin M.; MACCARTY, Maelyn. Studies on the chemical nature of the

- substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus Type III. *The Journal of Experimental Medicine* **79**: 137-158, 1944.
- CHARGAFF, Erwin. Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation. *Experientia* **6**: 201-240, 1950.
- DAWSON, Martin H. The interconvertibility of R and S forms of pneumococcus. *The Journal of Experimental Medicine* **47** (4): 577-591, 1928.
- DAWSON, Martin H.; SIA, Richard H. P. In vitro transformation of pneumococcal types. I. A technique for inducing transformation of pneumococcal types in vitro. *The Journal of Experimental Medicine* **54**: 681-699, 1931.
- DEBUSK, Aron Gib. *Genética molecular*. Trad. José. T. do Amaral Gurgel e João Lúcio Azevedo. São Paulo: Universidade de São Paulo/Polígono, 1971.
- GARDNER, Eldon J.; SNUSTAD, D. Peter. *Genética*. Trad. Cláudia Nunes Duarte dos Santos *et. al.* 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1986.
- GRIFFITH, Frederick. The significance of pneumococcal types. *The Journal of Higiene* **64** (2): 129-165, 1966.
- HAUSMANN, Rudolf. *História da biologia molecular*. Trad. Celma E. Lynch de Araújo Hausmann. 2. ed. Ribeirão Preto: Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto, 2002.
- HERSKOWITZ, Irwin H. *Princípios básicos de genética molecular*. Trad. Eleneide R. de S. Nazareth e Joyce A. D. Andrade. São Paulo: Companhia Editora Nacional/Editora da USP, 1971.
- LENHINGER, Albert Lester. *Princípios de bioquímica*. Trad. Arnaldo Antônio Simões e Wilson Roberto Navega Lodi. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.
- STANSFIELD, William D. *Genética*. Trad. Temis R. Saiz Jarbado. 2. ed. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1985.
- THOMPSON, James S.; THOMPSON, Margaret W. *Genética médica*. Trad. Paulo Armando Motta. São Paulo: Atheneu, 1974.
- WATSON, James Dewey; BERRY, Andrew. *DNA: o segredo da vida*. Trad. Carlos Afonso Malferrari. São Paulo: Companhia das Letras, 2005.

ZINDER, Norton D.; LEDERBERG, Joshua. Genetic exchange in Salmonella. *Journal of Bacteriology* **64**: 679-99, 1952.