

Los estudios morfológicos en la teoría de la determinación cromosómica del sexo: 1880-1912 (*)

ISABEL DELGADO ECHEVERRÍA (**)

BIBLID [0211-9536(2003) 23; 307-339]

Fecha de aceptación: marzo de 2003

SUMARIO

1.—Introducción. 2.—Materiales y método. 3.—El desarrollo de la morfología en Alemania y Norteamérica. 6.—Los postulados teóricos. 7.—Las investigaciones sobre determinación del sexo. 7.1.—Descripciones morfológicas de gónadas y gametos. 7.2.—La existencia de dos tipos de espermatozoides y dos tipos de huevos. 7.3.—Las investigaciones sobre partenogénesis. 7.4.—Reducción del número de cromosomas y descubrimiento del cromosoma accesorio. 7.5.—Epigénesis y determinación del sexo. 8.—Conclusiones.

RESUMEN

En el presente trabajo se analizan las investigaciones morfológicas comenzadas a finales del siglo XIX alrededor del tema de la determinación del sexo, hasta el descubrimiento de cromosomas sexuales y la formulación de la teoría de la determinación cromosómica del sexo. El trabajo muestra la filiación de la morfología con la zoología a través de su desarrollo en Alemania y Norteamérica, como principales países productores. Las investigaciones citológicas, realizadas sobre un amplio abanico de especies animales, permitieron dilucidar importantes aspectos del número, aspecto y comportamiento de los cromosomas, sirviendo de apoyo a las hipótesis deterministas frente a las que defendían la importancia del ambiente o el papel del citoplasma en el control del desarrollo.

(*) Este trabajo ha sido realizado en el marco de los proyectos de investigación UZ00-SOC-12 y BHA 2001-2456.

(**) Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid. Profesora de Biología y Geología en Enseñanza Secundaria, IES Grande Covián. E-mail: idelgado@unizar.es

Palabras clave: Determinación cromosómica del sexo, Entwicklungsmechanik, citología, genética, historia de la biología.

Keywords: Sex determination by chromosomes, Entwicklungsmechanik, cytology, genetics, history of biology.

1. INTRODUCCIÓN

La «Teoría de la Determinación Cromosómica del Sexo», formulada en los primeros años del siglo XX, establece que la presencia en la célula huevo de determinados tipos de cromosomas, llamados «sexuales», determina el sexo del individuo que se va a desarrollar. Esta teoría pudo concebirse gracias a la acumulación de evidencias citológicas sobre el comportamiento de los cromosomas durante la formación de los gametos, que resultaron compatibles con las previsiones mendelianas sobre la herencia del sexo, así como con los planteamientos teóricos de algunas de las corrientes de la embriología. El descubrimiento de los cromosomas sexuales permitió establecer una relación causa-efecto entre cromosomas particulares y un carácter concreto (el sexo), lo que abrió las puertas al reconocimiento de una relación general entre cromosomas y caracteres biológicos, finalmente establecida en la «Teoría de la Herencia Cromosómica» que se desarrolló poco después, considerada piedra angular de la genética moderna (1).

-
- (1) La importancia de la convergencia entre la morfología y el mendelismo en el nacimiento de la citología y la genética ha sido resaltada en numerosos estudios históricos, entre los cuales: ALLEN, Garland E. Heredity under an embryological paradigm: the case of Genetics and Embryology. The Naples Zoological Station and the Marine Biological Laboratory: one hundred years of biology. *Biological Bulletin*, 1985, 168 (suppl.), 1-207. GILBERT, Scott F. a) The embryological origin of the gene theory. *Journal of the History of Biology*, 1978, 11 (2), 307-351. GILBERT, Scott F. b) In Friendly disagreement: Wilson, Morgan and the embryological origin of the gene theory. *Amer. Zool.*, 1987, 27, 797-806. LACADENA, Juan R. Los orígenes de la genética. In: *La Genética. Una narrativa histórico conceptual*, Madrid, Alambra, 1986, pp. 3-44. MAIENSCHIN, Jane. a) Shifting assumptions in American biology: Embryology, 1890-1910. *Journal of the History of Biology*, 1981, 14, 89-113. MAIENSCHIN, Jane. b) What determines sex? A study of converging approaches. *Isis*, 1984, 75, 457-480. ROLL-HANSEN, Nils. *Drosophila* genetics: A reduccionist research program. *Journal of the History of Biology*, 1978, 11 (1), 159-210. VICEDO, Marga. Citogenética: la búsqueda de la base física de los genes. *Asclepio*, 1992, 44 (1), 115-133.

El descubrimiento de los cromosomas sexuales y su función fue perfilándose a lo largo de la segunda mitad del siglo XIX a partir de las observaciones y experimentos sobre la reproducción sexual, la determinación del sexo y la herencia. Numerosos estudios se ocuparon de la anatomía y fisiología de las gónadas, la espermatogénesis y la ovogénesis, los procesos de la fecundación, el desarrollo embriológico, la proporción entre los dos sexos, la influencia de los factores ambientales y la transmisión de caracteres hereditarios. Estas cuestiones fueron analizadas bajo diversos postulados teóricos y con las metodologías propias de cada una de las disciplinas biológicas y médicas de la época (botánica, zoología, fisiología, anatomía, embriología), así como desde la práctica de la agricultura, la ganadería y la apicultura.

En este contexto, las investigaciones morfológicas realizadas con ayuda del microscopio permitieron la observación de ciertas diferencias cromosómicas en las células reproductoras femeninas y masculinas. Desde 1886 se hicieron descripciones de elementos cromatínicos particulares, descritos primero como nucleolos y reconocidos después como cromosomas. En 1902 un cromosoma particular, monosómico en los machos de ciertos insectos, fue llamado «cromosoma accesorio» o «cromosoma X», introduciéndose así un nombre que llegaría hasta nuestros días. Finalmente, en 1905, Nettie Maria Stevens (1861-1912) y Edmund Beecher Wilson (1856-1939) describieron simultánea e independientemente los cromosomas sexuales X e Y de dos especies de insectos. Pero, en 1905, estos descubrimientos no podían quedarse en una mera descripción morfológica: la cuestión clave era entonces dilucidar si existía una relación causal entre las diferencias cromosómicas y la aparición de uno u otro sexo en el individuo, ya que esto significaba un salto cualitativo en la concepción de la herencia. Stevens, especializada en citología y cercana a las ideas mendelianas, sugirió que existía tal relación, mientras que Wilson, embriólogo puramente epigenético, consideró que las características sexuales podrían deberse a diferencias en el grado o intensidad de la actividad cromosómica, pero no a las diferencias entre los cromosomas. En el entorno de la embriología norteamericana, la determinación cromosómica del sexo no fue aceptada hasta después de 1910, cuando Thomas Hunt

Morgan (1866-1945) comenzó sus trabajos sobre herencia ligada al sexo en la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster* (2).

2. MATERIALES Y MÉTODO

El principal objetivo del trabajo es mostrar la importancia que tuvo el desarrollo de la morfología para el nacimiento de la genética a través de sus aportaciones al problema de la determinación del sexo. Para ello se han analizado 71 trabajos originales de perspectiva morfológica publicados entre 1880 y 1912, extrayendo de ellos los debates teóricos, los desplazamientos de centros de interés, las relaciones de fuerzas entre los investigadores, la consideración de la morfología y su relación con otras ciencias naturales.

Los trabajos originales han sido seleccionados a partir de una búsqueda exhaustiva de fuentes sobre el tema de la determinación del sexo, en la que se localizaron 473 citas de publicaciones biológicas de distintas perspectivas para el periodo 1880-1912, de las cuales 281 parecían ser estudios morfológicos. Utilizando los recursos disponibles, se consiguió obtener copia de 71 de ellos, que son los que se han analizado en profundidad. Han quedado fuera del marco del presente ensayo los artículos médicos, de revisión o clínicos, que no aportaran datos de investigación morfológica básica, así como las publicaciones de enfoque ambientalista o fisiológico. Para valorar la importancia que

-
- (2) Las investigaciones de N. M. Stevens y E. B. Wilson y sus respectivas interpretaciones del papel de los cromosomas sexuales en la determinación del sexo son analizadas con detalle en: BRUSH, Stephen G. Nettie M. Stevens and the discovery of sex determination by chromosomes. *Isis*, 1978, 69 (247), 162-172. DELGADO, Isabel. Nettie Maria Stevens y la función de los cromosomas sexuales. *Cronos*, 2000, 3 (2), 239-271. MAIENSCHEN, Jane. Stevens, Nettie Maria. In: Frederic L. Holmes (ed.), *Dictionary of scientific biography*, New York, Charles Scribner's sons, 1990, pp. 867-869. OGILVIE, Marilyn Bailey. Stevens, Nettie Maria. In: *Women in science; Antiquity through the nineteenth century, A biographical dictionary with annotated bibliography*, Cambridge, Mass., The M.I.T. Press, 1993, pp. 167-169. OGILVIE, Marilyn Bailey; CHOQUETTE, Clifford J. Nettie Marie Stevens (1861-1912): Her life and contributions to Cytogenetics. *Proceedings of the American Philosophical Society*, 1981, 125, 292-311.

tuvo la investigación morfológica en el problema de la determinación del sexo, sirve como indicador la proporción entre los artículos morfológicos y el total de los artículos sobre el tema: en el conjunto de citas recogidas, los trabajos de morfología representan el 59,4 % (281 sobre 473). Para descartar posibles errores debidos a la imprecisión de la información sobre artículos no recuperados, se ha calculado la proporción de artículos morfológicos sobre el total de textos leídos, resultando sólo ligeramente inferior (55 % o 71 sobre 129).

Con el total de las citas morfológicas se ha realizado un análisis cuantitativo que ha servido para centrar la investigación. En relación con las revistas científicas de la época, se ha comprobado que los 281 trabajos fueron publicados en un total de 84 revistas. La Tabla I recoge un listado de las 25 revistas que contienen más de tres citas, indicando el lugar de publicación y las fechas del primero y el último trabajo incluidos en cada una. Estudiando el reparto del número de trabajos por revista, comprobamos que las 25 primeras reúnen 204 (72,6 %), mientras en el extremo opuesto hay 59 revistas que sólo aportan uno o dos artículos cada una, sumando un total de 77 artículos (27,4 %). En cuanto a los países productores (Tabla 2), 40 de las 84 revistas (47,6 %) se publicaron en Alemania, lo que representa 142 de los 281 artículos (50,5 %), mientras 25 revistas (29,8 %), con 89 artículos (31,7 %), se publicaron en EE. UU. Otros países productores fueron Francia, Reino Unido, Italia, Japón, Bélgica y Rusia. Si consideramos solamente las siete revistas con más de 10 artículos, que en conjunto contienen 118 (el 42 %), es de destacar que cuatro de ellas se publicaron en Alemania y las otras tres en EE. UU., con algunas diferencias entre ellas: las alemanas contienen el 23,5 % del total de artículos y están fechados desde 1885, mientras las norteamericanas incluyen el 18,5 % de los artículos, siendo el más antiguo de 1902. Dado que, según se deduce de los diferentes datos, la investigación morfológica se desarrolló durante esta época primeramente en Alemania y a continuación en Estados Unidos, ha sido en estos dos países donde hemos centrado el trabajo (3).

(3) Si bien nuestra muestra resulta finalmente representativa para el tema y la época, presenta algún sesgo del que se debe advertir. Las revistas alemanas de

Partiendo de los 71 textos recuperados, se ha realizado un primer estudio acerca de sus autores. El Cuadro 1 resume los datos principales de las 30 personas que firmaron los trabajos, indicando las instituciones y países donde trabajaron, las revistas en las que publicaron y sus principales aportaciones sobre el tema. Después de definir el contexto científico a partir de la literatura secundaria, hemos procedido a analizar los textos, extrayendo de ellos las líneas de investigación, concretando los temas de debate y detallando las diferentes aportaciones.

3. *EL DESARROLLO DE LA MORFOLOGÍA EN ALEMANIA Y NORTEAMÉRICA*

El periodo delimitado para nuestro estudio comienza con el establecimiento de la morfología como disciplina independiente y el perfeccionamiento en el uso del microscopio óptico, y concluye con la transformación de la citología en citogenética cuando se enuncia la teoría cromosómica de la herencia. Resulta significativo que, si bien la morfología se desarrolló más y antes en Alemania, la cuna de la genética se sitúa en Norteamérica, siguiendo un desplazamiento geográfico conocido en la historia de la biología, y que el presente trabajo viene a corroborar (4).

aquellos años están bien representadas en las hemerotecas españolas, de modo que no ha resultado muy difícil conseguir los artículos incluidos en ellas. Sin embargo, los publicados en revistas norteamericanas sólo han podido obtenerse, fotocopiados, mediante intercambio internacional. El acceso directo a las revistas alemanas nos ha permitido encontrar, por simple revisión de sus índices, artículos interesantes de los que no teníamos conocimiento previo, revisión imposible en las revistas norteamericanas inaccesibles en nuestro país. Esto ha hecho crecer el número de citas en las publicaciones alemanas, aumentando posiblemente la proporción de estas sobre el total, si bien esta circunstancia no ha afectado al número de revistas consideradas, pues este procede de las citas iniciales.

- (4) Sobre las características de la biología durante este periodo, ver: MAIENSCHHEIN, Jane; RAINGER, Ronald; BENSON, Keith R. Were American morphologists in revolt? Special section on American Morphology at the turn of the century. *Journal of the History of Biology*, 1981, 14 (1), 83-191. NYHART, Lynn. The disciplinary breakdown of German morphology. *Isis*, 1987, 78, 365-389. PAULY, Philip J. The appearance of academic biology in late nineteenth-century America. *Journal of the History of Biology*, 1984, 17, 369-397.

TABLA 1
 DISTRIBUCIÓN POR REVISTAS DE LOS 281 ARTÍCULOS ORIGINALES DEL PERIODO 1880-1912 SOBRE DETERMINACIÓN DEL SEXO CON UN ENFOQUE MORFOLÓGICO: LISTADO DE LAS 25 REVISTAS CON TRES O MÁS ARTÍCULOS

	<i>Nombre de la revista</i>	<i>Lugar PUBL.</i>	<i>nº ARTÍC.</i>	<i>desde</i>	<i>hasta</i>
1	Anatomischer Anzeiger	Jena	23	1886	1902
2	Journal of Experimental Zoology	Balt., Phila.	22	1904	1912
3	Archiv für Mikroskopische Anatomie und Entwicklungsgeschichte	Bonn-Berlin	19	1885	1907
4	Biological Bulletin	Mass.	16	1902	1912
5	Science	N.Y.-Paris	14	1904	1912
6	Archiv Für Entwicklungsmechanik Der Organismen	Leipzig	13	1895	1909
7	Zoologischer Anzeiger	Leipzig	11	1886	1909
8	Compt. Rend. Soc. de Biol.	Paris	9	1886	1908
9	Zoologische Jahrbücher	Jena	9	1888	1912
10	Biologisches Zentralblatt	Leipzig	8	1891	1912
11	Compt. Rend. Acad. d. Sc.	Paris	7	1885	1903
12	Journal of Morphology	Boston	6	1892	1911
13	Arch. de Zool. Expér. et Gén.	Paris	5	1900	1905
14	Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie	Leipzig	5	1885	1894
15	Quarterly Journal of Microscopical Science	London	4	1895	1911
16	Rep. Brit. Ass. Adv. Sc.	London	4	1905	1907
17	Jenaische Zeitschrift für Naturwissenschaft	Jena	4	1883	1888
18	Popular Science Monthly	N.Y.	4	1884	1904
19	Arch. Zellforschung		3	1909	1911
20	Archiv für Protistenkunde	Jena	3	1904	1910
21	Archives de Biologie	Paris	3	1882	1903
22	Bull. Mus. Comp. Zool. Harvard Univ.	Cambridge	3	1895	1903
23	Comptes-Rendus Hebdomadaires Des Séances De L'Académie De Paris	Paris	3	1890	1891
24	Kans. Univ. Quart.	Kansas	3	1900	1901
25	Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft	Leipzig	3	1905	1907
	Total de artículos en las 84 revistas		281	1880	1912

TABLA 2
DISTRIBUCIÓN POR PAÍSES DE LAS REVISTAS Y LOS ARTÍCULOS

<i>Países</i>	<i>nº rev.</i>	<i>%</i>	<i>nº ARTÍC.</i>	<i>%</i>
Alemania	40	47,6	142	50,5
EEUU	25	29,8	89	31,7
Francia	7	8,3	31	11
Reino Unido	5	5,9	12	4,3
Italia	3	3,6	3	1,1
Japón	2	2,4	2	0,7
Bélgica	1	1,2	1	0,35
Rusia	1	1,2	1	0,35
Total	84	100	281	100

En Alemania, principal productor de investigaciones biológicas durante la mayor parte del siglo XIX, la morfología comenzó a desarrollarse a partir de la introducción de las ideas darwinistas, cuando muchos investigadores pasaron a ocuparse fundamentalmente de la reconstrucción de relaciones filogenéticas para explicar la evolución por medio de la herencia y la adaptación. El nuevo enfoque de la morfología hizo que pronto fuera reconocida como campo de investigación, aunque no como disciplina independiente dentro del sistema universitario alemán. Desde su origen estuvo ligada a la zoología, que se había independizado a principios del XIX y se estudiaba en las facultades de medicina y en las de filosofía. A lo largo del siglo, la morfología fue variando en contenidos y perspectiva, y hacia 1880 incluía disciplinas como la anatomía comparada, la embriología y la fisiología, arrinconando otras especialidades zoológicas, como la sistemática. Hacia 1890, la mayoría de las cátedras de zoología estaban ocupadas por morfólogos: Ernst Haeckel en Jena (1865), August Weismann en Freiburg (1873), Richard Hertwig en Munich (1885). No había propiamente cursos de morfología, pero los profesores de zoología enseñaban anatomía comparada y embriología (los dos elementos principales que, según Haeckel, constituían la morfología). Sólo en Jena reinó la cooperación entre anatomistas médicos (como Oscar Hertwig),

CUADRO 1

Firmantes de los trabajos morfológicos originales sobre determinación del sexo del periodo 1880-1912. El siguiente cuadro muestra sus nombres, el número y año de los artículos recuperados, el lugar y país en el que trabajaron, revista/s y país donde aparecieron sus artículos, y una breve indicación del tema sobre el que realizaron sus principales investigaciones.

<i>Autores</i>	<i>Publicaciones</i>	<i>Temas de investigación</i>
E. Ballowitz (2 art.:1886, 1893) Instituto Anatómico de Greifswald (Alemania)	<i>Anat. Anzeiger</i> (Jena, Alemania)	<ul style="list-style-type: none"> • Estructura de los espermatozoides • Espermatogénesis en <i>Dytiscus marginalis</i> (insectos coleópteros)
J. Beard (3 art.: 1896, 1902, 1904) Edinburgh (Reino Unido)	<i>Anat. Anzeiger</i> <i>Zool. Jahrb.</i> (Alemania)	<ul style="list-style-type: none"> • Ovogénesis y espermatogénesis en <i>Lepidosteus</i> y en <i>Raja</i> (peces) • Dos tipos de espermatozoides
M. W. Blackman (2 art.: 1901, 1908) Lab. Zool. e Histol., U. de Kansas (EE.UU.)	<i>Kans. Univ. Quart.</i> <i>Cleveland Medical J.</i> (EE. UU.)	<ul style="list-style-type: none"> • Espermatogénesis en <i>Scolopendra</i> (miriápodos) • Cromosoma accesorio • Relación con el mendelismo
Th. Boveri (2 art.: 1887, 1892) München (Alemania)	<i>Anat. Anzeiger</i> (Jena, Alemania)	<ul style="list-style-type: none"> • Desarrollo de los huevos de <i>Ascaris</i> (gusanos nematodos) • Cámara genital del <i>Amphioxus</i> (cordados primitivos)
G. W. Field (1893) Estación Zoológica de Nápoles	<i>Anat. Anzeiger</i> (Jena, Alemania)	<ul style="list-style-type: none"> • Espermatogénesis en 19 especies de equinodermos, incluyendo holoturias, crinoideos, equinoideos, ofiuras y asteroideos
V. Häcker (2 art.: 1891, 1897) Instituto Zoológico de la U. de Freiburg (Alemania)	<i>Ber. Natur. Gesell.</i> <i>Biol. Zentralbl.</i> (Alemania)	<ul style="list-style-type: none"> • Espermatogénesis y formación de los huevos en <i>Cyclops</i> y <i>Canthocamptus</i> (insectos copépodos).
H. Henking (3 art.: 1890, 1891, 1892) Göttingen (Alemania)	<i>Int. Mon. Ant. Phy.</i> <i>Zeit. Wiss. Zool.</i> (Alemania)	<ul style="list-style-type: none"> • Células seminales de <i>Pyrrhocoris apterus</i> (insectos hemípteros) • Primera observación de cromosoma accesorio
R. Hertwig (2 art.: 1912) München (Alemania)	<i>Biol. Zentralbl.</i> (Alemania)	<ul style="list-style-type: none"> • Partenogénesis en áfidos, dáfnidos (insectos) y rotíferos

(Sigue)

CUADRO 1. (Continuación)

<i>Autores</i>	<i>Publicaciones</i>	<i>Temas de investigación</i>
N. Holmgreen (1901) Instituto Zootómico de Estocolmo (Suecia)	<i>Anat. Anzeiger</i> (Jena, Alemania)	<ul style="list-style-type: none"> • Espermatogénesis de <i>Staphylinus</i> (insectos coleópteros) • Dos tipos de espermatozoides
O. Jensen (1886) Kristiania (Alemania)	<i>Anat. Anzeiger</i> (Jena, Alemania)	<ul style="list-style-type: none"> • Estructura de los espermatozoides de los reptiles, aves y mamíferos
V. L. Kellogg (1906) U. Stanford, Cal. (EE. UU.)	<i>J. Exp. Zool.</i> (EE. UU.)	<ul style="list-style-type: none"> • Diferenciación de las glándulas sexuales en las larvas de la mariposa de la seda, <i>Bombyx mori</i> (insectos)
Von Malsen (1907) Bonn (Alemania)	<i>Arch. Mikrosk. Anat.</i> (Bonn, Alemania)	<ul style="list-style-type: none"> • Ovogénesis y partenogénesis en <i>Dinophilus apatris</i> (anélidos) • Huevos partenogenéticos masculinos y femeninos
C. E. McClung (3 art.: 1900, 1902) U. de Kansas U. Pennsylvania (EE. UU.)	<i>Kans. Univ. Quart.</i> <i>Biological Bulletin</i> (EE. UU.) <i>Anat. Anzeiger</i> (Jena, Alemania)	<ul style="list-style-type: none"> • Espermatogénesis en distintos saltamontes como <i>Hippiscus</i> y escarabajos como <i>Xiphidium fasciatum</i> (insectos ortópteros y coleópteros) • Cromosoma accesorio
Fr. Meves (2 art.: 1891, 1901) Departamento de Anatomía de Kiel (Alemania)	<i>Anat. Anzeiger</i> (Jena, Alemania) <i>Ver. Anat. Gesell.</i> (Alemania)	<ul style="list-style-type: none"> • División amitótica en los espermatogonios de las salamandras (reptiles) • Espermatozoides de <i>Paludina</i> (gasterópodos) • Dos tipos de espermatozoides
T. H. Montgomery Jr. (3 art.: 1899, 1904, 1911) Inst. Anatomía y Biología, U. Pennsylvania, Texas (EE. UU.)	<i>Zool. Jahrb.</i> (Alemania) <i>Proc. Am. Phil. Soc.</i> <i>Int. Clinics</i> (EE. UU.)	<ul style="list-style-type: none"> • Espermatogénesis en <i>Pentatoma</i> (insectos hemípteros) • Divisiones de los espermatogonios, espermatocitos I y espermatocitos II; división reduccional • Base celular de la determinación del sexo • Partenogénesis en insectos

(Sigue)

CUADRO 1. (Continuación)

<i>Autores</i>	<i>Publicaciones</i>	<i>Temas de investigación</i>
T. H. Morgan (11 art.: 1894, 1905, 1906, 1907, 1909, 1910, 1911, 1912)	<i>Anat. Anzeiger</i> (Jena, Alemania) <i>Ann. N. Y. Acad. Sci.</i> <i>Biol. Bull.</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Estudios de los huevos de los equinodermos • Huevos masculinos y femeninos en los chinches del nogal (Phylloxeridos)
U. Columbia, N. Y. (EE. UU.)	<i>Science</i> <i>J. Exp. Zool.</i> (EE. UU.)	<ul style="list-style-type: none"> • Herencia limitada por el sexo en <i>Drosophila</i> • Partenogénesis en insectos • Cromosomas sexuales
M. Nussbaum (3 art.: 1884, 1897, 1901) Instituto Anatómico de Bonn (Alemania)	<i>Arch. Mikrosk. Anat.</i> <i>Ver. Anat. Gesell.</i> (Alemania)	<ul style="list-style-type: none"> • Glándulas sexuales de batracios (anfibios) y teleósteos (peces) • Partenogénesis en <i>Hydatina senta</i> (rotíferos) • Células sexuales en los gallos y gallinas (aves)
F. C. Paulmier (1898) D. Zoología, U. de Co- lumbia, N.Y. (EE.UU.)	<i>Anat. Anzeiger</i> (Jena, Alemania)	<ul style="list-style-type: none"> • Espermatogénesis en los hemípteros, <i>Anasa tristis</i> (insectos) • División reduccional
F. Payne (1908) Lab. Zoología, U. Co- lumbia, N. Y. (EE. UU.)	<i>Biol. Bull.</i> (EE. UU.)	<ul style="list-style-type: none"> • Cromosomas en relación con el sexo • Espermatogénesis y ovogénesis en diversos insectos, como <i>Diplocodius exsanguis</i> (insectos hemípteros)
G. Platner (1886) (Alemania)	<i>Int. Mon. Anat. Histol.</i> (Leipzig, Alemania)	<ul style="list-style-type: none"> • Conductos seminales de los gasterópodos • Conductos seminales de los lepidópteros (insectos)
M. Popoff (1907) Inst. Zoología, München (Alemania)	<i>Arch. Mikrosk. Anat.</i> (Bonn, Alemania)	<ul style="list-style-type: none"> • Espermatogénesis en <i>Paludina</i> y <i>Helix</i> (gasterópodos) • Dos tipos de espermatozoides
O. vom Rath (2 art.: 1891, 1892) Instituto Zoológico de la U. de Freiburg (Alemania)	<i>Ber. Nat. Gesell.</i> <i>Arch. Mikrosk. Anat.</i> (Alemania)	<ul style="list-style-type: none"> • Espermatogénesis en <i>Gryllotalpa vulgaris</i> (insectos)

(Sigue)

CUADRO 1. (Continuación)

Autores	Publicaciones	Temas de investigación
N. M. Stevens (5 art.: 1906, 1908, 1910) Bryn Mawr, Pa. (EE.UU.)	<i>Carnegie. Inst. Wash. J. Exp. Zool.</i> (EE. UU.)	<ul style="list-style-type: none"> • Células germinales de <i>Diabrotica</i>, <i>Culex</i>, ciertos dípteros y coleópteros (insectos) y <i>Forficula</i> (miriápodos) • Cromosomas sexuales X e Y
W. S. Sutton (3 art.: 1900, 1902, 1903) U. Kansas y Lab. Zoolo- gía, U. Columbia, N. Y. (EE. UU.)	<i>Kans. Univ. Quart. Biol. Bull.</i> (EE. UU.)	<ul style="list-style-type: none"> • Espermatogénesis en <i>Brachystola magna</i> (insectos ortópteros) • Cromosoma accesorio
Von la Valette St. George (2 art.: 1895, 1897) (Alemania)	<i>Arch. Mikrosk. Anat.</i> (Alemania)	<ul style="list-style-type: none"> • Ovogénesis y espermatogénesis en <i>Triton taeniatus</i> (anfibios) • Huevos y espermatozoides de <i>Bombyx mori</i> (insectos)
L. Wallace (1900) M. B. L. Woods Holle, Mass. (EE. UU.)	<i>Anat. Anzeiger</i> (Jena, Alemania)	<ul style="list-style-type: none"> • Espermatogénesis en la araña (arácnidos) • Cromosoma accesorio
A. Weismann (1900) U. Freiburg (Alemania)	<i>Anat. Anzeiger</i> (Jena, Alemania)	<ul style="list-style-type: none"> • Partenogénesis de las abejas (insectos)
D. D. Whitney (1907) Lab. Zoología, U. Columbia, N. Y. (EE. UU.)	<i>J. Exp. Zool.</i> (EE. UU.)	<ul style="list-style-type: none"> • Partenogénesis y determinación del sexo en <i>Hydatina senta</i> (rotíferos)
E. V. Wilcox (3 art.: 1896, 1898, 1900) M. Zool. Comp., Cam- bridge, Mass. Coll. Agricultura de Bozeman, Mont. D. Agricultura, Washing- ton (EE. UU.)	<i>Anat. Anzeiger</i> (Jena, Alemania)	<ul style="list-style-type: none"> • Espermatogénesis en <i>Caloptenus</i> (insectos ortópteros) • Espermatogénesis humana • Formación de tétradas durante la espermatogénesis de los insectos • Recuento de cromosomas en espermátidas humanas (observación entre 15 y 19 cromosomas)
E. B. Wilson (5 art.:1905, 1907, 1909) U. Columbia, N. Y. (EE. UU.)	<i>Proc. Soc. Exp. Biol. M. J. Exp. Zool. Science</i> (EE. UU.)	<ul style="list-style-type: none"> • Espermatogénesis en <i>Anasa tristis</i> y otros hemípteros y coleópteros (insectos) • Cromosomas sexuales X e Y

y zoólogos, mientras en otras universidades (Heidelberg, Würzburg) hubo fuertes conflictos, debido al rechazo por parte de los médicos del nuevo enfoque de la morfología, y su defensa corporativa de las áreas de anatomía y fisiología. Las investigaciones morfológicas se realizaron también en diversos laboratorios e institutos de investigación fundados en la primera mitad del siglo XIX como complemento a las universidades: Freiburg (1824), Göttingen (1836), Breslau (1839), Jena (1845).

En Norteamérica, el empuje de la nueva morfología, importada muy pronto de Alemania, produjo el despegue de las disciplinas zoológicas, unidas inicialmente a las médicas. En la Universidad de Harvard se produjo hacia 1880 un cambio radical en la cátedra de zoología: tras la muerte de Louis Agassiz, discípulo de Cuvier y especializado en taxonomía, su sucesor Alexander Agassiz estableció nuevos laboratorios de embriología e histología, y tomó como ayudante a C. O. Whitman, que pronto destacaría en el campo de la morfología. Por otra parte, se crearon muchas escuelas de graduados utilizando un esquema menos rígido que el alemán: el departamento era un agregado de especialistas no jerarquizados, que podían incorporar las nuevas áreas de investigación que considerasen necesarias. Siguiendo este modelo se fundó en 1876 la Universidad Johns Hopkins, con la intención de mejorar la formación médica. En ella se creó un puesto de profesor de biología, que fue ocupado por el morfológico H. Newell Martin, quien introdujo en sus cursos la anatomía comparada y las técnicas de disección y microscopía. Poco tiempo después, M. K. Brooks, profesor de anatomía comparada, desarrolló su escuela de investigación morfológica y fundó un laboratorio de zoología marina. La mayoría de los graduados de esta universidad entre 1876 y 1885 hicieron su *Bachelor of Medicine* en zoología, especializándose en fisiología y morfología animal; entre ellos destacaron E. B. Wilson y T. H. Morgan, que más adelante se ocuparían del tema de la determinación del sexo.

4. LA IMPORTANCIA DE LOS LABORATORIOS DE ZOOLOGÍA

Uno de los campos de la nueva morfología, la embriología comparada de los invertebrados, requería el estudio de grandes cantidades

de animales en distintos estadios de desarrollo, lo que indujo el desarrollo de laboratorios específicos de zoología marina. En la segunda mitad del siglo existían ya tres laboratorios franceses, uno ruso y dos alemanes: el de Nápoles (fundado en 1872) y el de Helgoland (desde 1893). La Estación Zoológica de Nápoles (EZN), ligada a la Universidad de Würtzburg, fue creada por iniciativa de A. Dohrn, y desde su fundación fue el centro de referencia para la morfología en toda Europa y Norteamérica. Disponía de un enorme edificio, con un acuario en el piso inferior y un gabinete con mesas de estudio para 22 investigadores, así como un departamento para las preparaciones microscópicas y un servicio de publicaciones. En ella se formaron importantes investigadores e investigadoras de todos los países, que acudían como pensionados de sus respectivos gobiernos. Wilson, Morgan y Stevens fueron algunos de los norteamericanos que pasaron por este laboratorio (5).

En Norteamérica, uno de los primeros fue el *Chesapeake Zoological Laboratory*, fundado por M. K. Brooks, donde hicieron cursos de verano los estudiantes de la Universidad Johns Hopkins. En 1888 se fundó el *Marine Biological Laboratory* de Woods Hole, Massachusetts (MBL), pieza clave en el desarrollo de la morfología norteamericana. El laboratorio fue diseñado por un grupo de investigadores encabezados por Alphaeus Hyatt bajo la inspiración del modelo de la EZN. Fue concebido como medio para el fomento de investigaciones «de estilo europeo», y pronto se convirtió en la puerta de entrada de las nuevas ideas de la embriología experimental alemana. C. O. Whitman, director del laboratorio en 1894, inauguró su famosa serie de conferencias con una traducción del «Manifiesto» de W. Roux, publicado en el primer volumen del *Archiv Für Entwicklungsmechanik Der Organismen*. Es interesante señalar que la mayoría de los norteamericanos que rápidamente abrazaron la *Entwicklungsmechanik* fueron jóvenes vinculados al MBL. En él traba-

(5) En España, la EZN fue conocida desde 1882, cuando Vilanova y Piera presentó una comunicación sobre su visita a Nápoles a la Sociedad Española de Historia Natural. Desde entonces hubo sucesivos intentos para que se concedieran pensiones en la Estación, la primera de las cuales fue otorgada a J. M. de Castellarnau. Siguiendo el modelo de la EZN se fundó en 1886 la Estación de Biología Marina de Santander.

jaron investigadores como Whitman, Wilson, Morgan, Conklin, Lillie, McClung o Loeb, e investigadoras como Clapp, Hyde, Platt, Stevens, Stein, Hogue o Harvey (6).

5. *EL DESARROLLO DE LAS CIENCIAS LIGADAS A LA MICROSCOPIA*

La anatomía comparada y la embriología compartieron en estos años la necesidad de realizar minuciosos estudios microscópicos de los tejidos, las células y sus componentes. El estudio de la anatomía microscópica de animales y vegetales alcanzó gran desarrollo en el seno de la nueva morfología, dando origen, a partir de la formulación de la teoría celular (1839), a una disciplina, la citología, cultivada de una forma que hoy llamaríamos interdisciplinar por zoólogos, botánicos y médicos. Desde 1873 fueron conocidos los procesos de la división mitótica y en 1883 se pudo demostrar la constancia en el número de cromosomas de las células en cada especie. Sin embargo, la permanencia de la sustancia cromatínica a través de las fases de reposo y de división celular, es decir, la equivalencia o continuidad entre la cromatina y los cromosomas, era todavía tema controvertido en 1900, y hasta 1904 no se comprendieron los procesos de la división reduccional o meiosis y su papel en la formación de los gametos (7).

En el mismo contexto y a menudo en interrelación con estudios embriológicos, muchos investigadores centraron su atención sobre los procesos de la fecundación. Un avance decisivo en la comprensión de este fenómeno se produjo gracias a las investigaciones citológicas de Oscar Hertwig, quien en 1875 observó la unión de los núcleos gaméticos en los huevos del erizo de mar, lo que le permitió establecer

(6) El MBL se caracterizó por defender la presencia de mujeres estudiantes en igualdad de condiciones con los hombres. En los primeros años, las mujeres constituyeron aproximadamente un tercio en los grupos de estudios científicos avanzados. Ver: *Women at Marine Biological Laboratory*: www.mbl.edu/WOMEN/women.html.

(7) En la tabla 3 se resumen los principales avances en el conocimiento celular durante el siglo XIX que conviene tener presentes al considerar los textos analizados.

TABLA 3
PRINCIPALES AVANCES DE LA CITOLOGÍA DURANTE EL SIGLO XIX

<i>Fecha</i>	<i>Tema</i>	<i>autores</i>
1839	Enunciado de la Teoría Celular	Schneider - Schwann
1865-75	Descripción de orgánulos citoplasmáticos	Heizmann-Strasburger- Arnold-Freud-...
1870s	Observación núcleo celular	Flemming-Strasburger-Van Beneden-Bütschli
1873-74	Proceso mitótico	A. Schnieder-Auerbach
1876	Descripción de la cromatina (<i>kernsub- stanz</i>)	R. Hertwig
1879	Introducción del término «cromatina»	Flemming
1883-87	Constancia en el número de cromosomas	Van Beneden
1887	Introducción del término «división reduccional» (<i>Reductionstheilung</i>)	Weismann
1888	Introducción del término «cromosomas»	Waldeyer

que la fecundación era la completa fusión, o al menos aposición, de los núcleos contenidos en las células germinales. En 1877 Hermann Fol realizó observaciones similares utilizando huevos de estrella de mar y pudo comprobar la penetración del espermatozoide (8). Una vez conocido el proceso de fusión de los dos núcleos, quedó demostrada la equipotencia de la sustancia nuclear masculina y femenina en el origen del nuevo individuo (Van Beneden, Hertwig, Boveri, 1884). Algunos investigadores relacionaron el proceso de fusión de la sustancia nuclear con la transmisión hereditaria de caracteres en los híbridos estudiada por los mendelianos.

El estudio de las células y sus componentes estuvo ligado al perfeccionamiento del microscopio y sus técnicas. Al comenzar el siglo XIX, los microscopios tenían dos grandes problemas ópticos —las

(8) Acerca de los descubrimientos de O. Hertwig y H. Fol sobre la fecundación, ver especialmente CHURCHILL, Frederick B. *The life sciences in Germany. From heredity theory to Vererbung. The transmission problem, 1850-1915. Isis*, 1987, 78, 336-364.

aberraciones cromática y esférica—, por lo que se trabajaba con pocos aumentos que no permitían la observación precisa de los cuerpos más pequeños. Desde 1830 se utilizaron combinaciones de lentes que permitían eliminar parte de las aberraciones esféricas (microscopio «compuesto»). Las aberraciones cromáticas se resolvieron combinando lentes de diferentes tipos de cristales, y por tanto con diferentes índices de refracción. Un importante avance metodológico fue la introducción de los métodos de fijación (alcohol, ácido acético, ácido ósmico) y coloración, en especial para la tinción en vivo: ácido carmínico (1849), anilinas (1862), hematoxilina (1863) y azul de metileno (1881). La técnica del aceite de inmersión, que permite el mayor aumento, fue introducida en la década de 1870.

Desde 1886, el taller de aparatos ópticos de Jena se convirtió en una industria de construcción de microscopios apadrinada por Schleidten. Aquí se empezó a fabricar el famoso cristal «Zeiss» de boro y fósforo. El sistema de lentes apocromáticas creado a partir de este material eliminó drásticamente las aberraciones esféricas y cromáticas. Los nuevos microscopios, usados con las técnicas de inmersión, conseguían unos aumentos de unos 2.500 diámetros, con un poder de resolución de casi $\frac{1}{4}$ de micra. Th. Boveri, N. M. Stevens, E. B. Wilson y muchos otros citólogos utilizaron el nuevo instrumento para desvelar los finos detalles del número, estructura y comportamiento de los cromosomas.

6. LOS POSTULADOS TEÓRICOS

La expresión de las distintas posturas sobre la herencia y determinación del sexo en este periodo demuestra la pervivencia de la controversia dieciochesca entre epigénesis y preformacionismo. Los partidarios de las ideas mendelianas, basadas en la existencia de «partículas hereditarias», eran acusados por sus oponentes de adoptar las anticuadas teorías preformacionistas sobre el desarrollo del embrión, al asimilar estas «partículas» con las partes «preformadas» dentro del huevo del que se desarrolla un organismo. Los descubrimientos realizados a principios del XIX habían decantado la embriología hacia la teoría de la epigénesis, aunque un cierto preformacionismo «químico» era acepta-

ble para algunos embriólogos como Roux y Loeb; éstos consideraban que el organismo vivo estaba constituido por partes físico-químicas, y que algún tipo de estructura molecular estable se transmitía de una generación a la siguiente. Un punto de vista semejante tenían algunos citólogos que investigaban el núcleo celular tratando de identificar las unidades hereditarias con las partículas materiales del núcleo. La embriología epigenética del XIX mantenía que durante el desarrollo del embrión se iban formando consecutivamente partes nuevas que no tenían existencia anterior. La versión más restrictiva de la epigenesis sirvió de base a los ambientalistas para afirmar que las características desarrolladas por el embrión (incluido el sexo) dependían de factores externos como la abundancia de alimento, temperatura, luz, etc. Muchos embriólogos epigenetistas fueron calificados de «neovitalistas», por defender que los organismos vivos tenían propiedades que no podían explicarse por el estudio de sus partes. Además, los defensores de las partículas hereditarias consideraban que el desarrollo epigenético no explicaba las semejanzas entre progenitores y descendientes (9).

7. LAS INVESTIGACIONES SOBRE DETERMINACIÓN DEL SEXO

Las publicaciones analizadas presentan ciertos rasgos comunes en cuanto a temas y métodos, configurándose con bastante claridad lo que sería el «programa de investigación» morfológico de la época. Hay ciertas cuestiones que reaparecen recurrentemente a lo largo de todo el periodo, pero se observa una notable evolución entre 1880 y 1912 en cuanto a los problemas que centran la discusión, lo que se relaciona con los sucesivos avances de la citología. Siguiendo un eje

-
- (9) Los manuales de historia de la biología ofrecen una síntesis del estado de este problema. Véase por ejemplo: ALLEN, Garland E. *La ciencia de la vida en el siglo XX*, México, Fondo de cultura económica, 1983. JAHN, Ilse ; LOTHER, Rôlf ; SENGLAUB, Konrad. *Historia de la biología. Teorías, métodos, instituciones y biografías breves*, Barcelona, Labor, 1989. ROSTAND, Jean. *Introducción a la historia de la biología*, Barcelona, Ediciones 62, 1979. Véase también: ALLEN, Garland. Thomas Hunt Morgan and the problems of sex determination. *Proceedings of the American Philosophical Society*, 1966, 110, 48-57. BAXTER, Alice L. Edmund B. Wilson as preformationist: Some reasons for his acceptance of the chromosome theory. *Journal of the History of Biology*, 1976, 9, 29-57.

de variación temporal, hemos establecido cinco apartados temáticos, en cada uno de los cuales hemos seleccionado los autores y artículos más representativos, con el fin de proporcionar una visión general sin perder del todo los detalles de los textos.

El tema más ampliamente tratado en las publicaciones morfológicas fue el del origen, formación y morfología de los espermatozoides y los huevos. Gran número de investigadores dedicaron años de trabajo a la disección y observación microscópica minuciosa de los ovarios y testículos de diferentes animales, especialmente insectos, y a la descripción de las células reproductoras, intentando encontrar en sus estructuras la clave de la diferenciación del sexo.

En las descripciones histológicas, a menudo se menciona y discute la existencia de dos tipos morfológicos de gametos en uno o en los dos sexos de ciertos animales. Dos tipos de espermatozoides —un tipo «filiforme» funcional y un tipo «vermiforme» no funcional— fueron descritos por primera vez por Von Siebold (1836) en el caracol *Paludina vivipara*, y más tarde encontrados por muchos investigadores en la misma y en otras especies, pero el tipo «vermiforme» no fue aceptado plenamente por las autoridades científicas. La existencia de dos tipos de huevos tuvo más amplia aceptación, pues era de conocimiento general que muchas especies partenogénicas ponían huevos que, desarrollados sin fecundación, daban lugar a hembras o machos. Estos huevos eran denominados «femeninos» y «masculinos» (o «productores» de hembras y de machos), según el sexo del individuo que naciera de ellos.

El tema de la reproducción por partenogénesis, es decir, mediante huevos no fecundados, fue uno de los temas tratados con más frecuencia. Esta forma de reproducción ponía en cuestión la necesidad de espermatozoides en la reproducción, y a mediados del siglo XIX originó acaloradas discusiones. El término partenogénesis («nacimiento virgen») fue introducido en 1849 por Richard Owen, aunque el fenómeno era conocido desde el siglo XVII. Varios naturalistas británicos realizaron importantes investigaciones sobre la reproducción partenogénica de los insectos (el propio Owen, T. H. Huxley 1856-59, John Lubbock 1857), pero fue en Alemania, debido al gran desarrollo de la microscopía, donde los estudios sobre la partenogénesis produjeron mayores avances.

A partir de 1890 encontramos diversos artículos en los que se intenta hacer un recuento del número de cromosomas. Estos recuentos, realizados fundamentalmente mediante la fijación de espermatogonias en mitosis, permitieron descubrir la eventual existencia de un cromosoma «extra» (sin pareja), más tarde denominado «cromosoma accesorio» o «cromosoma X». Las observaciones sobre los distintos estadios en la formación de espermatozoides (espermatogonias, espermatocitos I y II, espermatidas) fueron la base sobre la que se fueron dilucidando tres cuestiones importantes: 1) la continuidad entre la cromatina y los cromosomas y la constancia en el número de éstos, 2) la naturaleza de la división reduccional (meiosis) y 3) la presencia de cromosomas desparejados o no completamente homólogos («cromosoma accesorio», «heterocromosomas» y «cromosomas sexuales»).

Finalmente, se considerará la perspectiva de la embriología epigenética sobre el tema de la determinación del sexo, presente en muchos de los textos analizados. Aunque los cromosomas sexuales suponían una fuerte evidencia de la relación entre cromosomas y caracteres —al menos en la cuestión del sexo—, los embriólogos norteamericanos más fieles a la teoría de la epigénesis no podían aceptar con facilidad que una estructura morfológica (un «determinante») pudiera dirigir o marcar el desarrollo del embrión. El rechazo a cualquier idea que sonara a preformacionista marcó los discursos de muchos científicos, como fue el caso de McClung, Wilson o Morgan durante estos años.

7.1. *Descripciones morfológicas de gónadas y gametos*

Los artículos de la década de 1880 se ocupan sobre todo de la descripción de las gónadas y los gametos (generalmente testículos y espermatozoides) de una gran diversidad de animales, destacando en ellos las puntualizaciones sobre las técnicas microscópicas empleadas y la precisión de los dibujos, a veces ayudados con técnicas fotográficas descritas en el texto (10). En este periodo solamente encontramos pu-

(10) La «microfotografía» o fotografía adaptada al microscopio óptico fué introducida en 1898 por Neuhaus, y utilizada poco después por Koch para obtener imágenes de las bacterias.

blicaciones alemanas (las primeras norteamericanas aparecieron hacia 1900), y en ellas se plantean cuestiones básicas en relación con la teoría celular que todavía no están claramente resueltas.

El artículo que en 1884 escribe Nussbaum (Instituto Anatómico de Bonn) (11) es el más largo y completo, y supone una buena revisión de los conocimientos generales del momento. Se propone definir la diferenciación histológica del sexo, aunque considera que sólo se puede hacer una descripción del proceso, pero no explicar la causa o las circunstancias por las que se desarrolla un sexo o el otro. Tras estudiar el desarrollo de las glándulas sexuales en los batracios y los teleósteos, Nussbaum plantea tres preguntas a las que responde afirmativamente: 1) que las sustancias sexuales [gametos] son células, 2) que estas células femeninas y masculinas son homólogas entre sí, y 3) que las células que darán lugar a las células sexuales se diferencian del resto de las células desde el desarrollo embrionario temprano.

En 1886 aparecieron en el *Anatomischer Anzeiger* dos artículos sobre la estructura de los espermatozoides, el primero de O. S. Jensen (Kristiania) (12) y el segundo de E. Ballowitz (Instituto Anatómico de Greifswald) (13). Jensen describe la estructura de los espermatozoides de diferentes animales, especialmente mamíferos: rata, caballo, carnero y hombre. Por su parte Ballowitz, que comienza su artículo comentando el trabajo de Jensen, estudia la estructura del espermatozoide, especialmente el origen y formación del flagelo a partir de fibrillas. Compara mamíferos, aves, anfibios, peces e insectos, y concluye que los espermatozoides de todos los animales estudiados presentan una estructura exquisitamente fina, incluyendo los llamados espermatozoides «vermiformes» de *Paludina* y otros prosobranquios. Ambos autores detallan las técnicas microscópicas empleadas para las observaciones,

-
- (11) NUSSBAUM, Moritz. Zur Differenzierung des Geschlechts im Tierreich. *Arch. Mikrosk. Anat.*, 1884, 18, 1-121. La traducción de este texto y todos los alemanes se ha realizado en colaboración con el germanista Luis Delgado Echeverría, sin cuya ayuda hubiera resultado imposible el presente trabajo.
- (12) JENSEN, O. S. Über die struktur der samenkörper bei säugentieren, Vögeln und amphibien. *Anatomischer Anzeiger*, 1886, 1 (10), 251-257.
- (13) BALLOWITZ, Emil. Zur lehre von der struktur der spermatozöen. *Anatomischer Anzeiger*, 1886, 363-376.

entre las que mencionan disoluciones salinas, mezclas con glicerina, tinción con anilina y el uso del sistema de inmersión homogénea 1/18” y 1/24”, señalando la necesidad de buena luz.

7.2. *La existencia de dos tipos de espermatozoides y dos tipos de huevos*

Desde que Von Siebold describiera los espermatozoides «vermiformes» y «filiformes» de *Paludina*, numerosos investigadores apreciaron indicios de su existencia en diferentes tipos de animales —incluso en el hombre. Los alemanes Holmgreen (1901), Meves (1901) y Popoff (1907) hicieron referencia a ellos. La existencia de dos tipos de huevos fue analizada principalmente en relación con la partenogénesis (Morgan 1906, Von Malsen 1907).

El principal defensor de la existencia de dos tipos morfológicos de espermatozoides y dos de óvulos fue el escocés John Beard, de la Universidad de Edimburgo. En dos artículos publicados en 1902 y 1904, Beard presenta las investigaciones que ha realizado durante trece años y discute algunos de los resultados obtenidos por investigadores anteriores y coetáneos (14). Puesto que cita los principales trabajos publicados y realiza una revisión de los temas más importantes, nos proporciona una completa imagen bibliográfica del momento en relación con este tema.

Beard comenta la importancia que el tema de la determinación del sexo había tenido durante al menos doscientos años y califica de «hipótesis sin base» la mayoría de las más de 500 teorías enunciadas, debido a que ninguna estaba «basada en la morfología». Rechaza los experimentos de los ambientalistas sobre las proporciones de ambos sexos «porque como mucho estos investigadores prueban qué porcentaje de cada sexo sobrevive bajo determinadas condiciones» (15). Por otro lado, declara su deuda con científicos como Bernhard Schultze, que en

(14) BEARD, John. The determination of sex in animal development. *Anatomischer Anzeiger*, 1902, 20, 556-561. BEARD, John. The determination of sex in animal development. *Zool. Jahrb.*, 1904, 16, 704-764.

(15) BEARD (1904), nota 14, p. 709.

1854 había ya establecido que «probablemente las condiciones para el desarrollo de un sexo o del otro estén ya dadas dentro del huevo del ovario» (16).

Admitiendo la existencia de cuatro tipos de gametos (dos clases de óvulos y otras dos de espermatozoides), Beard se enfrentaba al problema de que las cuatro combinaciones posibles en la fecundación tenían que originar solamente dos tipos de individuos, que serían los dos sexos. Analiza las distintas posibilidades sugeridas por otros autores, como son: a) fecundación selectiva (los huevos de cada tipo, «femenino» y «masculino», sólo serían compatibles con los espermatozoides del mismo tipo) b) sólo uno de los tipos morfológicos de espermatozoides sería funcional, y la existencia de dos tipos de huevos determinaría el sexo, y 3) sólo existiría un tipo de huevos, mientras los dos tipos morfológicos de espermatozoides determinarían el sexo. Esta última posibilidad es rechazada tajantemente por Beard, quien considera que la determinación del sexo no reside en los elementos masculinos o espermatozoides, sino en los huevos. Referencias a los cuatro tipos de gametos aparecen en párrafos como el siguiente:

«Dos tipos de huevos, sexualmente diferenciados y de diferente tamaño, hace muchos años que son conocidos. Fueron encontrados en los Rotíferos por J. Dalrymple (1849), en otras especies por F. Leydig (1854) y, especialmente, por F. Cohn (1856), por Balbiani en *Phylloxera coccinea* (1873), y en *Dinophilus gyrotilatus* por E. Korschelt (1882) (...) Dos tipos de espermatozoides fueron descritos por primera vez por Von Siebold en 1836. Mucho después de su descubrimiento, su existencia no fue admitida en el Acta de la ciencia (...) Tanto su trabajo como las posteriores investigaciones de Duval, M. Von Brunn, Auerbach y F. Meves tienen aún dificultades en conseguir para los espermatozoides vermiformes de *Paludina* un cierto lugar en la embriología» (17).

(16) BEARD (1904), nota 14, p. 709, nota al pie.

(17) BEARD (1904), nota 14, p. 704.

7.3. *Las investigaciones sobre partenogénesis*

Entre 1880 y 1912 se estudiaron repetidamente los casos conocidos de partenogénesis en rotíferos, platelmintos, anélidos y muchos insectos. La determinación del sexo en estos animales fue a menudo atribuida a factores ambientales (temperatura, nutrición), y por ello se realizaron numerosos estudios de poblaciones con perspectiva ambientalista. La partenogénesis es mencionada en la mayoría de las publicaciones morfológicas estudiadas, pero los análisis más completos son los de Nussbaum (1884), Weismann (1900), Beard (1904), Von Malsen (1907), Whitney (1907), Morgan (1909), Montgomery (1911) y R. Hertwig (1912). De particular interés encontramos las investigaciones del alemán August Weismann (1834-1914), una de las figuras más representativas del pensamiento biológico del siglo XIX, quien trató de unificar en una teoría general la evolución, la herencia y la diferenciación embrionaria. Menos conocida es su aportación al estudio de la determinación del sexo y la reproducción de las abejas que comentamos a continuación (18).

La reproducción y determinación del sexo de las abejas (*Apis mellifera*) reavivó en la época un interés que venía manifestándose desde los tiempos de Aristóteles. Se llevaron a cabo numerosos estudios experimentales, algunos realizados espontáneamente por apicultores y otros dirigidos por biólogos o naturalistas. Hacia 1850 era conocido que la abeja reina solamente copulaba con los zánganos durante el vuelo nupcial, que de sus huevos se desarrollaban, en distintas celdillas, los machos (zánganos) y las hembras (obreras o reinas), que el desarrollo en reinas u obreras dependía de la alimentación de las larvas, y que en raras ocasiones las obreras ponían huevos, de los que nacían siempre zánganos. Diversas teorías trataban de explicar estas peculiaridades de la reproducción de las abejas. La más extendida, el llamado «sistema de Dzierzon» (19), defendía que los huevos que

(18) Acerca de Weismann, ver: CHURCHILL, Frederick B. August Weismann and a break from tradition. *Journal of the History of Biology*, 1968, 1, 91-112. CHURCHILL, Frederick B. Hertwig, Weismann and the Meaning of Reduction Division circa 1890. *Isis*, 1970, 61, 429-458.

(19) Johannes Dzierzon fue ministro de Silesia y gran aficionado a la apicultura.

daban lugar a los zánganos no habían sido fecundados, mientras que los huevos fecundados originarían obreras y reinas.

En un artículo publicado en 1900 (20), Weismann daba cuenta de los experimentos realizados durante tres años en el Instituto Zoológico de Freiburg. Se había propuesto comprobar la teoría de Dzierzon, que estaba siendo cuestionada por científicos y apicultores. Con el fin de revisar las pruebas obtenidas por sus compatriotas Von Siebold (1839-56) (21) y Leuckart (1858) (22), diseñó un experimento en el que se incluía la observación citológica de los huevos. Weismann pensaba que las observaciones anteriores se habían realizado demasiado tiempo después de la puesta, cuando ya los espermatozoides podían haber unido su núcleo con el del óvulo y ser irreconocibles. En el análisis de los huevos recién depositados se pudo distinguir el núcleo espermático en el 79% de los huevos depositados en celdillas de obreras, mientras que no se encontró en ninguno de los 94 huevos puestos en celdillas de zánganos.

Los huevos utilizados en el experimento fueron proporcionados por F. Dickel, un experimentado apicultor de Darmstadt, que había intentado demostrar que todos los huevos de las abejas estaban fecundados, y que eran factores ambientales los que determinaban que un huevo se desarrollara como macho o como hembra (por ejemplo, la insalivación de los huevos por parte de las obreras). Dickel quiso poner a prueba la investigación de Weismann, y en el segundo envío cambió

En 1848 escribió un tratado sobre las abejas que hizo época: *Theorie und Praxis des neunten Bienenfreundes*. Ver: CHURCHILL, Frederick B. Sex and the single organism: Biological theories of sexuality in mid-nineteenth century. *Studies in History of Biology*, 1979, 3, 139-177.

- (20) WEISMANN, August. Über die parthenogenese der bienen. *Anatomischer Anzeiger*, 1900, 18, 492-499.
- (21) Karl Theodor Ernst Von Siebold fue uno de los principales naturalistas y microscopistas de mediados del siglo XIX. Sus experimentos en relación con los sexos de las abejas se recogen en: SIEBOLD, Karl Theodor E. *Wahre parthenogenesis bei schmetterlingen und bienen. Ein beitrage zur Fortpflanzungsgeschichte der Thiere*, Leipzig, William Engelmann, 1856.
- (22) Rudolph Leuckart, médico y zoólogo, escribió en 1853 una monografía titulada *Zeugung* en la que revisaba todos los conocimientos morfológicos y fisiológicos sobre la reproducción sexual y asexual.

las etiquetas entre los frascos que contenían huevos de zánganos y de obreras. En esta ocasión, todos los huevos que presuntamente procedían de celdas de zánganos presentaron núcleos de esperma, mientras entre los de las obreras ni uno solo. De ello deduce Weismann:

«Por todo ello hoy puede considerarse como absolutamente demostrado que los huevos depositados en celdas de zángano normalmente no están fecundados, y los depositados en celdas de obrera sin embargo están siempre fecundados, que por tanto la tesis de Dzierzon sigue siendo justamente válida» (23).

Hay que señalar que ni en este ni en otros trabajos afirma Weismann que el sexo de las abejas esté determinado por la ejecución u omisión de la fecundación, ya que, como él dice,

«quizás podría considerarse apresurada esta conclusión, alegando que la coincidencia de fecundación y desarrollo como hembra no constituye de por sí una prueba de que la penetración de un hilo de semen [espermatozoide] haya determinado la hembra, pues podría tener lugar junto con la fecundación otra influencia que no conocemos y que resultase precisamente determinante del sexo» (24).

En una publicación de 1879 en relación con otros insectos, Weismann había escrito que no podía darse una explicación de las causas por las cuales unos huevos se desarrollaban como macho y otros como hembra, pero que sí podía establecerse que la fecundación no tenía absolutamente ninguna influencia sobre la determinación del sexo.

7.4. *Reducción del número de cromosomas y descubrimiento del cromosoma accesorio*

Aunque el recuento de cromosomas era todavía muy dificultoso —en el caso de algunas especies fue corregido con posterioridad—,

(23) WEISMANN, nota 20, p. 496.

(24) WEISMANN, nota 20, p. 498.

quienes manejaban preparaciones citológicas de testículos apreciaban claramente que el número de cromosomas era claramente diferente entre las espermatogonias y las espermátidas. Pronto se conoció que la formación de espermátidas requería dos divisiones a partir de las espermatogonias, en una de las cuales el número de cromosomas se reducía a la mitad. Ésta fue denominada «división reduccional», pero durante mucho tiempo se discutió si la reducción tenía lugar en la primera o en la segunda de las divisiones de lo que más tarde se denominó meiosis. El fenómeno de la reducción cromática es comentado por varios autores, como H. Henking (1890) (25), V. Häcker (1891) (26) y Von Rath (1892) (27). Los esfuerzos por realizar un recuento exacto del número de cromosomas permitieron descubrir la existencia ocasional de un corpúsculo nuclear, posteriormente interpretado como un cromosoma desaparejado y denominado «cromosoma accesorio».

La primera descripción detallada de este cromosoma fue realizada en 1891 por Hermann Henking, profesor en Göttingen. Henking observó que los espermatozoides del chinche *Pyrrhocoris apterus* tenían 12 cromosomas, mientras las células del embrión tenían 24. Poco después, durante la división de los espermatoцитos I, distinguió un cuerpo teñido intensamente, a la manera de la cromatina, pero que no se dividía en dos como los cromosomas, sino que pasaba entero a una de las dos células hijas. En su artículo de 1891, lo comentaba con las siguientes palabras:

«Con la última división de los espermatoцитos, la cromatina se divide desigualmente, de manera que una espermátida obtiene solo 11 cromosomas mientras que la otra, por el contrario, además de los 11 cromosomas hermanos obtiene también un elemento de cro-

-
- (25) HENKING, Hermann. Ueber reductionsteilung der chromosomen in den Samenzellen von insecten. *Internationales Monatsschrift Für Anatomie Und Physiologie*, 1890, 7, 243-248.
- (26) HÄCKER, Valentin. Über weitere Übereinstimmungen zwischen den Fortpflanzungsvorgängen der Tiere und Pflanzen. *Biol. Zentralbl.*, 1897, 17 (19 y 20), 689-705 y 721-745.
- (27) RATH, Otto vom. Ueber die reduction der chromatischen elemente in der Samenbildung von *Grylotalpa vulgaris* Latr. *Berichte Der Naturforschenden Gesellschaft Zu Freiburg I. B.*, 1891, 6 (2), 62-64.

matina que ha quedado sin dividir (...) Con lo cual se produce el hecho importante de que obtenemos dos tipos de espermatozoides: los unos poseen un nucleolo y los otros no» (28).

No conociendo su función, Henking se refirió a él como «un elemento cromatínico particular», y lo designó «X».

Clarence Erwin McClung (Universidad de Kansas) hizo en 1899 observaciones similares en el saltamontes *Xiphidium fasciatum*. En 1902 revisó las observaciones que podían referirse a este «elemento cromatínico», «elemento X» o «nucleolo cromatínico», recogiendo las de Platner (1886), Henking (1890 y 1891), Toyama (1894), Wilcox (1895), Montgomery (1898), Paulmier (1899), McClung (1899 y 1900), Walter S. Sutton (1900), Louise B. Wallace (1900) y M. W. Blackman (1901). Refiriéndose a este elemento, comenta lo siguiente:

«El único hecho esencial por el que difiere de los otros cromosomas es que durante la profase del primer espermatozocito no pierde su identidad en la fibra de cromatina; y, además, que durante una de las mitosis del espermatozocito permanece sin dividir. Es por ello un cromosoma y nunca, en ningún sentido, un nucleolo, lo que invalidaría el nombre usado por Henking y Montgomery» (29).

McClung consideró que el elemento que él llamó «cromosoma accesorio» tenía alguna relación con el sexo, ya que estaba presente en la mitad de los espermatozoides:

«Desde la suposición de que hay una diferencia cualitativa entre los diferentes cromosomas del núcleo, se seguiría necesariamente que se forman dos tipos de espermatozoides que, por fecundación del huevo, producirían individuos cualitativamente diferentes. Ya que el número de cada una de estas variedades de espermatozoides es

(28) HENKING, Hermann. Untersuchungen über die ersten Entwicklungsvorgänge in den Eiern der Insekten II. Über Spermatogenese und deren Beziehung zur Entwicklung bei *Pyrrhocoris apterus* L. *Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie*, 51 (4), 685-736

(29) McCLUNG, Clarence E. Notes on the accessory chromosome. *Anatomischer Anzeiger*, 1902, 2, 220-226 (p. 221).

el mismo, ocurriría que habría un número aproximadamente igual de esos dos tipos de descendientes. Sabemos que la única cualidad que separa los miembros de una especie en estos dos grupos es el sexo» (30).

La revisión realizada por McClung en 1902 representa el nexo entre los trabajos morfológicos realizados en Alemania y los que en Estados Unidos condujeron a la identificación de los cromosomas sexuales en 1905, ya que tanto Stevens como Wilson tomaron como punto de partida las publicaciones de McClung. Además de estudiar la espermatogénesis de numerosos insectos, Stevens investigó, mediante cría experimental, el sexo de los descendientes. De esta manera, lo que en McClung sólo era una suposición —que los espermatozoides con cromosoma accesorio darían lugar a uno de los sexos— pudo corroborarse de manera experimental. En los trabajos publicados en 1905, Stevens y Wilson describieron una pareja de cromosomas de distinto tamaño, que, al separarse en la meiosis, originaban dos tipos de espermatozoides. Estos cromosomas fueron llamados X e Y, o «cromosomas sexuales» —cuando, definitivamente, se aceptó su relación con el sexo (31).

7.5. *Epigénesis y determinación del sexo*

Una manifestación clara de la postura epigenética en la cuestión de la determinación del sexo la encontramos en las publicaciones de Morgan del periodo 1903-1910, cuando dedicó una mayor atención a este tema. Por ser una figura extremadamente conocida en relación con la genética, el cambio sustancial que realizó Morgan después de esta

(30) McCLUNG, nota 29, p. 225.

(31) STEVENS, Nettie M. *Studies in spermatogenesis, Part II: A comparative study of the heterochromosomes in certain species of Coleoptera, Hemiptera, and Lepidoptera, with especial reference to sex determination*. Washington, Carnegie Inst. (C.I.W.) [Publ. 36, No.2.], 1906; WILSON, Edmund B. The chromosomes in relation to the determination of sex in insects. *Science*, 1905, 22, 500-635. Estos artículos y el conjunto de los trabajos de Stevens, Wilson y McClung han sido analizados con más detalle en DELGADO, nota 2.

fecha ha sido analizado profusamente. No pretendemos incidir sobre esta cuestión, sino más bien considerar sus investigaciones y opiniones como embriólogo con anterioridad a 1912, ya que sus artículos son representativos de lo que era la morfología americana.

Los dos artículos más ilustrativos fueron publicados en 1905 y 1906. En el primero, Morgan se ocupaba de la teoría del profesor Ziegler, que intentaba explicar la cuestión de la determinación del sexo bajo el punto de vista de una acción cromosómica específica. La teoría de Ziegler («*Grandmother theory of sex*»), se basaba en la suposición de que los cromosomas procedentes de individuos femeninos tendrían mayor tendencia a producir descendencia femenina, así como los originados en un individuo masculino tenderían hacia la masculina. Ya que en cada hijo o hija el número de cromosomas aportados por la madre y el padre era el mismo, la determinación del sexo dependería del número de cromosomas heredados de las abuelas y los abuelos a través de los gametos de los progenitores. Sobre esta sugerencia, Morgan ironizaba con la posibilidad de que alguno de los descendientes no tuviera sexo, ya que podría ocurrir que unos y otros cromosomas aparecieran en igual número. Por otra parte, Ziegler admitía que su teoría no era aplicable a todos los casos, y desde luego no a las especies con reproducción partenogenética, lo cual proporcionaba a Morgan una seria objeción «pues cualquier teoría del sexo satisfactoria debe estar preparada para explicar este tipo de casos, que no pueden dejarse aparte diciendo que son peculiares» (32).

Pero Morgan encontraba otra objeción todavía mayor, y era la aceptación de que los cromosomas representaran las cualidades hereditarias. Lejos de la postura de Ziegler, las conclusiones de Morgan en relación con la determinación del sexo eran en 1905 las siguientes: 1) los hechos conocidos en relación con el sexo indicaban que se trataba de dos estados muy contrastados pero intercambiables, y parecía existir algún mecanismo interno que producía una u otra condición con gran precisión, 2) era posible imaginar una hipótesis *quasi* química, como por ejemplo que hembra y macho representasen dos condiciones

(32) MORGAN, Thomas H. Ziegler's theory of sex determination, and an alternative point of view. *Science*, 1905, 22, 839-841 (p. 840).

contrastadas de algunas condiciones del mismo protoplasma, un estado «combinado» (femenino) y otro «separado» o «puro» (masculino) y 3) lo único que se podía afirmar con seguridad era que la diferenciación sexual no podía ser resultado de divisiones nucleares diferenciales, que situasen cromosomas determinantes del sexo en diferentes células, sino que el proceso debía ser químico más que morfológico.

También en el artículo de 1906, sobre la reproducción partenogénica de los filoxéridos (33), Morgan rechazaba la determinación del sexo por diferencias en el material nuclear. Puesto que tanto los huevos que originaban machos como lo que producían hembras se desarrollaban sin fecundación, el sexo en estos casos debía estar preexistente en el huevo. Morgan se proponía averiguar cuáles eran las condiciones que determinaban que un huevo fuera masculino o femenino. Las hembras de los filoxéridos ponían dos tipos de huevos partenogénicos, unos más grandes, de los que nacían hembras, y otros más pequeños, de los que nacían machos. Para Morgan, el tamaño de los huevos estaba relacionado con el hecho de que los machos fueran generalmente más pequeños y degenerados. En muchos filoxéridos los machos eran diminutos, sin alas y sin tubo digestivo, y sus órganos reproductores se desarrollaban tan pronto que los espermatozoides estaban ya formados cuando el individuo macho nacía del huevo.

Morgan consideraba que las diferencias entre los dos tipos de huevos no podían ser cromosómicas. A partir de detallados estudios citológicos de los huevos masculinos y femeninos, había comprobado que el número de cromosomas era el mismo en los huevos fecundados y en los no fecundados, así como en los embriones que se desarrollaban de cualquiera de estos. Sin embargo, durante la formación de los espermatozoides el número de cromosomas se reducía a la mitad, y lo mismo sucedía en la formación de los «huevos de invierno» (óvulos), que precisaban fecundación. Era evidente, pues, que el número total de cromosomas era característico en todo el ciclo vital, salvo en los espermatozoides y en los huevos de invierno, donde había una división reduccional preparatoria de la fecundación. Morgan señaló que

(33) MORGAN, Thomas H. The male and female eggs of Phylloxerans of the Hickories. *Biol. Bull.*, 1906, 10, 206.

el resultado obtenido para los filoxéridos era paralelo al encontrado por Stevens para los áfidos (34).

Puesto que no había encontrado ninguna diferencia en los cromosomas de los huevos partenogenéticos masculinos y femeninos, Morgan examinó el citoplasma y planteó la siguiente alternativa: que los huevos partenogenéticos de gran tamaño producían hembras simplemente porque eran grandes (hipótesis ambientalista), o si más bien estos huevos eran grandes porque ya eran femeninos. Para Morgan era más probable la segunda alternativa, y afirmaba que era muy probable que el desarrollo temprano del embrión se debiera completamente a las influencias del citoplasma:

«Si esta diferencia citoplasmática puede derivarse de una base citoplasmática preexistente, o de la influencia nuclear, o de la influencia de las condiciones externas, es bastante desconocido, pero en ausencia de cualquier diferencia nuclear parece cuestionable que debamos asumir que existe tal cosa» (35).

8. CONCLUSIONES

El conjunto de investigaciones morfológicas desarrolladas en la segunda mitad del siglo XIX alrededor de los procesos de la reproducción sexual condujo finalmente a centrar la atención sobre los fenómenos citológicos que tenían lugar durante la formación de los gametos, especialmente la reducción del número de cromosomas y el emparejamiento de los mismo durante la meiosis. Las técnicas utilizadas para las preparaciones microscópicas fueron mejorando notablemente a lo largo del periodo, de forma que hacia 1905 las observaciones pudieron ser nítidas y fiables. De esta manera, la citología norteamericana,

(34) STEVENS, Nettie M. A study of the germ cells of *Aphis rosae* and *Aphis oenotherae*. *Journal of Experimental Zoology*, 1905, 2, 313-33. Efectivamente, en el estudio sobre los áfidos que realizó en colaboración con Morgan, Stevens no había encontrado el cromosoma accesorio ni otras diferencias cromosómicas entre los sexos.

(35) MORGAN, nota 33, p. 206.

gracias a la herencia de la morfología alemana, estaba en condiciones de proporcionar evidencias sobre el peculiar comportamiento de los cromosomas sexuales durante la formación de las células reproductoras. La separación de una pareja de heterocromosomas, o la distribución al azar de un cromosoma extra («cromosoma accesorio») en la mitad de los gametos, eran mecanismos físicos compatibles con las previsiones mendelianas sobre la determinación del sexo.

Sin embargo, la aceptación de la teoría cromosómica de la determinación del sexo condenó al olvido, por no ser concordantes, muchos datos valiosos obtenidos de investigaciones anteriores, así como algunas antiguas teorías de gran interés, siguiendo la tendencia de considerar «precientíficas» todas las teorías anteriores a la vigente. Mientras que el modo de acción de los cromosomas sexuales sigue siendo en la actualidad tema de numerosas conjeturas y controversias, la teoría de la determinación cromosómica del sexo simplificó de forma abusiva el amplio panorama que la determinación del sexo presenta en el mundo de los seres vivos. Recientes investigaciones sobre el desarrollo del sexo en función de las condiciones ambientales, o sobre la regulación del cambio de sexo en los hermafroditas secuenciales, pueden devolver una merecida credibilidad a algunas valiosas teorías anteriores al descubrimiento de los cromosomas sexuales (36).

(36) Es bien conocida la determinación del sexo por el ambiente en el gusano marino *Bonellia viridis* desde los primeros estudios de Baltzer (1914, 1935). Sobre el control del cambio de sexo en hermafroditas protándricos, ver por ejemplo el caso del pez *Acanthopagrus schlegeli*: CHANG, C. F. *et al.* The endocrine mechanism of sex reversal in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*: a review. *Chin. J. Physiol.*, 1997, 40 (4), 197-205.