

Helen Dean King y la perspectiva ambientalista

La norteamericana Helen Dean King (1868-1955) realizó numerosos experimentos en anfibios (sapo) y mamíferos (rata) en los que se proponía comprobar los resultados de Richard Hertwig y otros investigadores, analizando las posibles influencias externas en el desarrollo del sexo de los individuos. King era proclive a aceptar las interpretaciones avanzadas por Nettie M. Stevens, Edmund B. Wilson y Clarence E. McClung sobre los dos tipos de espermatozoides, diferentes en sus cromosomas sexuales, pero trataba de compaginarlas con la influencia del ambiente, que se manifestaría a través de la “fecundación selectiva”. La mayor parte de sus investigaciones en este terreno estuvieron destinadas a precisar la influencia de cada uno de los posibles factores ambientales: nutrición, hidratación, temperatura, edad, etc. Tras sus primeros trabajos en el campo de la embriología experimental, King se especializó en la cría artificial y los estudios estadísticos de la descendencia en relación con el sexo, contribuyendo asimismo al conocimiento de otros procesos relacionados con la reproducción, el desarrollo y la herencia en animales vertebrados.

Datos biográficos

Helen D. King nació en Owego (N. Y.) el 27 de septiembre de 1869. Era la mayor de las dos hijas de George y Leonora King, cuyas familias se habían establecido desde hacía tiempo en Owego como propietarias de compañías de cuero. Comenzó su formación en la *Owego Free Academy* y el *Vassar College*, donde recibió su título de bachiller (1892). En 1894 volvió al Vassar como estudiante de graduado de biología y ayudante de prácticas de laboratorio. En 1895 entró en el *Bryn Mawr College*, realizando su doctorado bajo la dirección de Thomas Hunt Morgan; en estos años conoció a N. M. Stevens, quien habla de ella en una de sus publicaciones y cita sus trabajos en varias. King se especializó en morfología con Morgan y cursó, como asignaturas secundarias, fisiología con J. W. Warren y paleontología con Florence Bascom¹, con quien aprendió la teoría darwinista de la evolución. En 1899 obtuvo su Ph. D., pero permaneció en el Bryn Mawr hasta 1904. Allí continuó su trabajo postdoctoral con Morgan, mientras ayudaba en el laboratorio como asistente de biología y enseñaba biología en la escuela de Miss Florence Baldwin. Entre 1906 y 1908 disfrutó de una beca de investigación universitaria en zoología, trabajando en la universidad de Pennsylvania con E. G. Conklin.

¹ Florence Bascom (1862-1945) era especialista en geología. Su padre fue profesor de filosofía en el *Williams College* y más tarde presidente de la Universidad de Wisconsin. En esta última estudió la carrera de geología, entrando en el Johns Hopkins cuando se abrió su escuela de graduado para mujeres. Allí Bascom estudió petrología y recibió su Ph. D. en 1893, una titulación obtenida con dispensa especial, ya que las mujeres no fueron admitidas oficialmente hasta 1907. Su experiencia como profesora comenzó en la universidad del estado de Ohio, donde tuvo los puestos de *instructor* y *associate professor* en geología y petrología de 1893 a 1895. Tras dejar esta universidad, entró en el *Bryn Mawr College*, trabajando al mismo tiempo como asistente de geología para el *U. S. Geological Survey*. Fue la primera mujer en servir como geóloga en esta institución, la primera mujer en ser elegida miembro en la *Geological Society of America* y la primera mujer vicepresidente de esta organización. Su biografía se encuentra en: Ogilvie (1993), *op. cit.*, pp. 36-37.

En 1908, King aceptó un puesto docente en el *Wistar Institute of Anatomy and Biology* de Philadelphia, donde permaneció más de cuarenta años, progresando desde el puesto de “asistente” al de “profesor asistente” y, desde 1927, “profesor titular” de embriología, puesto que conservó hasta su retiro en 1949. Helen Dean King murió el 27 de marzo de 1955 en Philadelphia (Pennsylvania) a la edad de ochenta y cinco años, después de una carrera científica enormemente productiva. En 1932 ganó el premio Ellen Richards de la NTA, que compartió con la astrónoma Anni Jump Cannon. Fue miembro de la junta consultiva del Wistar durante 24 años (desde 1928), y editora de su servicio bibliográfico durante trece años. Trabajó como editora asociada del *Journal of Morphology and Physiology* entre 1924 y 1927. Fue vicepresidente de la Sociedad de Zoología desde 1937, y miembro de la Asociación Americana para el Avance de la Ciencia, de la Sociedad de Biología Experimental y Medicina, la Asociación de Investigación Eugénica, la Asociación Americana de Anatomistas, la Sociedad Americana de Naturalistas y la Asociación de Genetistas Americanos².

Los primeros trabajos embriológicos

En 1896 H. D. King comenzó en el *Bryn Mawr College* el trabajo que presentaría como tesis doctoral en 1901. El tema, sugerido por su profesor T. H. Morgan, fue el de la maduración y fecundación del huevo del sapo común *Bufo lentiginosus*. King realizó una detallada descripción de la estructura de los ovarios, comparando el estado de hibernación con el de actividad, distinguió las distintas fases en la formación del óvulo e hizo un recuento del número de cromosomas. Después de que King leyera su tesis, Morgan continuó como su mentor, sugiriendo nuevos problemas en el campo de la embriología. El segundo trabajo de investigación de Helen King, realizado también en el Bryn Mawr y publicado en 1903, consistió en una serie de experimentos para determinar la influencia de las condiciones ambientales sobre el desarrollo de los huevos y larvas; este trabajo es comentado en detalle más adelante. En 1904 King publicó otro trabajo dirigido por Morgan, un estudio sobre la regeneración en *Tubularia crocea*, un pólipo hidroideo (celentéreos), realizado en el MBL mientras ocupaba uno de los puestos de investigación reservados por la *Carnegie Institution*.

Entre 1906-1908 King disfrutó de una beca para investigaciones zoológicas en el laboratorio de biología de la universidad de Pennsylvania, donde realizó nuevos estudios sobre la gametogénesis en *Bufo lentiginosus*, para los que contó con la colaboración del profesor E. G. Conklin. En su estudio de la ovogénesis centró la atención sobre las transformaciones de la cromatina desde las oogonias del periodo de maduración hasta los oocitos. Su seguridad en la utilización de los fijadores y técnicas de tinción le permitió elegir los métodos más adecuados para su material de estudio, rechazando algunos de los propuestos por otros investigadores. Rastreo la procedencia embrionaria de las células germinales, estableciendo que éstas se originaban en conexión con el endodermo primitivo a partir de regiones vecinas del huevo, siguiendo las indicaciones de Conklin para localizar sustancias formadoras de órganos en regiones definidas de los huevos antes de la segmentación. Asimismo observó que la multiplicación de las células germinales se realizaba exclusivamente mediante

² Sobre Helen Dean King, ver: Bogin, M. King, Helen Dean. En: Coulston Gillispie, C. (ed.). *Dictionary of Scientific Biography* (1990), vol. 18, supp. II, pp. 474-478. Ogilvie (1993), *op. cit.*, pp. 108-110.

divisiones mitóticas, que eran mucho más abundantes cuando el renacuajo se aproximaba a la metamorfosis, llegando a afirmar:

“En mi estudio de las células germinales de *Bufo* no he encontrado nunca ni un ejemplo en el que pudiera asegurar que una célula se estaba dividiendo amitóticamente; estoy convencida de que este modo de división no ocurre normalmente en ningún tipo de células germinales, ya sean del ovario o del testículo”³

King consideraba que el sexo de cada individuo estaba determinado en un estado temprano del desarrollo, aunque las células germinales permanecían indiferenciadas durante un largo periodo. Sólo cuando el renacuajo estaba próximo a realizar la metamorfosis podía asegurarse el sexo con certeza si se realizaba un análisis citológico, observando la disposición de las células en la porción anterior de la glándula sexual. King observó el comportamiento de la cromatina y los nucleolos a través de las distintas fases de maduración de las oogonias, y defendió que los cromosomas mantenían su individualidad cuando formaban la fibra de cromatina. Observó la disposición de los cromosomas en parejas durante la división de los oocitos y su posterior separación, y concluyó:

“Si admitimos que dos cromosomas se unieron lado con lado en la spireme, entonces la división longitudinal de ésta es simplemente la separación de los cromosomas que previamente se habían apareado, y la división transversal de la spireme es el medio por el cual los cromosomas se separan completamente uno del otro”⁴

Un nuevo trabajo embriológico fue comenzado en 1909 por King en el MBL y publicados en 1912. Se trataba de comprobar los resultados obtenidos por Mathews con huevos de erizo de mar, que apuntaban que los aminoácidos podían alterar el curso del desarrollo embrionario. King repitió los experimentos con huevos del erizo *Arbacia punctulata* y los comparó con el anélido *Chaetopterus pergamentaceus*, estudiando asimismo los distintos tipos de larvas obtenidas. King sometió a los huevos a la acción de los tres aminoácidos utilizados por Mathews (cisteína, leucina y tirosina) además de otros cinco de entre los constituyentes habituales de las proteínas, estableciendo una muestra control en que los huevos se desarrollaban en agua de mar normal. Los resultados obtenidos mostraron que la presencia de los aminoácidos podía alterar la tasa de desarrollo en ambas especies, pero no determinaba el carácter del propio desarrollo.

Los experimentos de cría con ratas

³ King, H. D. The Oögenesis of *Bufo lentiginosus*. *Jour. Morph.* 1908; 19(2):379. Un año antes se publicó el primer trabajo realizado bajo la dirección de Conklin, en el que había estudiado la espermatogénesis en la misma especie: King, H. D. The spermatogenesis of *Bufo lentiginosus*. *Amer. Jour. Anat.* 1907; 7.

⁴ King (1908), *op. cit.*, p. 415. N. M. Stevens (1910) cita el estudio de la oogénesis realizado por Miss King, destacando la descripción que había hecho de “la separación de sustancias cromatínicas y el rechazo de masas de material profundamente teñido desde la espiral (spireme) durante la synzesis en los oocitos de *Bufo lentiginosus*”. El trabajo de King también es citado por el español M. Bordás (1914).

En 1909, King abandonó la citología y se embarcó en un proyecto que le duraría toda la vida: sus experimentos de cría con ratas blancas (*Mus norvegicus*, actualmente *Rattus norvegicus*). Realizó cruzamientos consanguíneos durante 130 generaciones, obteniendo lo que más tarde se llamaría la “colonia King”, una parte del famoso grupo de ratas albinas del *Wistar Institute* que figuraron en innumerables proyectos de investigación a través del mundo. Durante los primeros diez años de sus experimentos con ratas, King encontró que podía seleccionar los individuos según su tendencia a producir un exceso de machos o un exceso de hembras. Concluyó que en las ratas la *ratio* sexual era susceptible de selección hasta cierto punto, y que la hembra tenía más influencia en la determinación del sexo que el macho. King sugirió que factores como la herencia, el ambiente y la alimentación actuaban sobre los huevos, de tal forma que podían fecundarse más fácilmente con un tipo de espermatozoides que con el otro. Con el fin de explicar los cambios estacionales en la proporción de sexos, King sugirió que los huevos seleccionaban ciertos espermatozoides y rechazaban los otros en función de una mayor atracción o repulsión química, que dependería de los cambios estacionales del metabolismo corporal. Esta explicación de la “fecundación selectiva”, que coincidía con los planteamientos de Morgan, era contraria a la teoría avanzada por Wilson en 1910, según la cual cualquier huevo podía ser fecundado por cualquier espermatozoide que llegara a tener contacto con él.

En 1919 King publicó los resultados de quince generaciones de apareamientos de hermanos y hermanas de ratas albinas, en los que se probaba que la cría endogámica no había producido ningún tipo de degeneración en estos animales, lo que contradecía la afirmación de Darwin. Según King, había habido un prejuicio casi universal contra la consanguinidad, pero podía comprobarse que el apareamiento consanguíneo en mamíferos no era necesariamente perjudicial, siempre que se seleccionaran para la cría los mejores animales de una población grande. Después de cincuenta generaciones de apareamientos hermano-hermana, King comprobó la superioridad sobre el grupo de control en términos de fertilidad, crecimiento, talla y longevidad. Además, King encontró que las condiciones ambientales adversas, como la malnutrición, producían solamente un retraso temporal en las ratas, pero no afectaban a su constitución genética. Sus resultados apoyaban la suposición de Edward M. East y H. K. Hayes (1912) de que una raza completamente homocigota podía permanecer estable para siempre si tenía una buena constitución gamética y un vigor inherente natural, así como la conclusión de William E. Castle de que la selección de parejas reproductoras compensaba los efectos de la consanguinidad. King comparaba sus resultados con los obtenidos por Sewall Wright, quien había comprobado un deterioro en el vigor de los cerdos de guinea criados durante más de veinte generaciones, explicando que este resultado se debía a que Wright no había hecho una cría selectiva, mientras que ella había elegido solamente a los individuos más vigorosos para la reproducción.

Las conclusiones de King fueron publicadas en la prensa acompañadas de titulares y comentarios sensacionalistas contra la profesora universitaria que consideraba el incesto “un tabú innecesario”. Un artículo de periódico de 1922 tenía como titular: “La dra. King interrogada sobre la teoría del matrimonio entre parientes: la población local sobresaltada por su defensa de la consanguinidad humana”. El artículo comenzaba diciendo: “Están llegando cartas de todo tipo y variación al despacho de la dra. Helen Dean King, miembro de la facultad de la universidad de Pennsylvania e investigadora del *Wistar Institute*”. Según el artículo, King había declarado que los resultados de sus experimentos en ratas habían mostrado que los matrimonios

consanguíneos, bajo leyes y condiciones propias, mejorarían la raza. El periódico detallaba el contenido de algunas de las cartas, como la enviada por “una solterona de Los Ángeles que pide a la doctora King que busque marido”, o la de un “cristiano y estudiante” de la Clark University que escribió que “quería que alguien la matase, y si no lo hacían, lo haría él mismo”⁵.

Comentando el sensacionalismo de sus descubrimientos, King afirmó que aunque su raza consanguínea de ratas era superior en determinadas características físicas, no defendía que su superioridad se debiera solamente al hecho de que los animales procedieran de cruzamientos consanguíneos, ni quería decir que, en general, la consanguinidad fuera mejor que los cruzamientos externos para conseguir o mantener el vigor general de la raza. Ciertos beneficios, continuaba, resultaban tanto de los apareamientos entre parientes como de los externos, ya que cada uno tenía sus méritos y podía ser de gran utilidad en cualquier grupo. En todo caso, ella concluía de sus experimentos que, incluso en mamíferos, la forma más cerrada de consanguinidad posible, es decir, el apareamiento de hermano y hermana de la misma camada, no era necesariamente perjudicial para la fertilidad o el vigor constitucional de la raza, incluso si se continuaba por muchas generaciones. King consideraba que el éxito o fracaso en los experimentos de cría dependía de los caracteres del grupo que se estaba criando, de la forma en que los animales de cría se seleccionaban y de las condiciones ambientales en las que se desarrollaban los animales.

En cualquier caso, como muchos de los primeros genetistas, King se manifestó a favor del uso de la eugenesia para mejorar la raza humana. No encontraba nada malo en los matrimonios consanguíneos si el material original era bueno, pero pensaba que hacían falta leyes especiales que prohibieran tales matrimonios cuando fuera necesario, es decir, en poblaciones donde una de cada catorce personas tuviera algún defecto escondido en el plasma germinal. King predecía que habría un momento en que el matrimonio se basaría en la adecuación física de los individuos y en el registro de su *pedigrees* durante muchas generaciones, y que en el futuro la gente reconocería el gran valor de las combinaciones genéticas favorables para producir habilidades extraordinarias. King sugirió que algunos factores tendían a heredarse juntos, como, por ejemplo, gran talla corporal, temprana maduración sexual, alta fecundidad, vigor superior y longevidad. Sin embargo, no creía que estos factores estuvieran ligados como estaban muchos de los genes de *Drosophila*, de acuerdo con el trabajo desarrollado por Morgan y sus investigadores de Columbia.

Gran parte del trabajo de King sobre la cría señaló la dificultad de establecer una homocigosis completa en un grupo animal, y contribuyó al creciente reconocimiento entre los biólogos de los años 1920 y 1930 de la enorme diversidad genética que existía incluso dentro de una población local de una sola especie. En 1927, junto con Leo Loeb, de la Washington University Medical School, King realizó transplantes de tejidos para determinar la extensión de la similitud genética en dos poblaciones de animales de cría: las ratas albinas de King y los cerdos de guinea de Wright. Aunque las ratas de King habían sido criadas durante 37 a 39 generaciones, y los cerdos de guinea de Wright solamente por 15 a 23 generaciones, los investigadores encontraron reacciones de rechazo al tejido transplantado mucho más severas entre las ratas de cría que entre los cerdos de guinea. Un transplante entre dos ratas consanguíneas producía una

⁵ Ver: Ogilvie (1993), *op. cit.*, p. 109.

reacción exactamente igual de severa que un trasplante entre dos ratas no emparentadas. Con el fin de explicar estos inesperados resultados, Loeb y King sugirieron que la selección de los individuos más fuertes durante muchas generaciones de cría había causado que persistiera la heterozigosis. Citaron el gran número de mutaciones espontáneas en la rata y el cerdo de guinea como posible explicación. En cualquier caso, cuando Loeb, King y Blumenthal (1943) hicieron trasplantes de tejidos entre ratas que habían sido criadas entre hermanos y hermanas por 102 a 106 generaciones, comprobaron que la homozigosis en la raza se había incrementado gradualmente desde los primeros trasplantes de tejidos, aunque todavía no se había conseguido una condición homozigótica total.

Otra de sus importantes contribuciones a la ciencia fue su experimento de domesticación de ratas salvajes para comprobar los efectos de la cautividad. Comenzado en 1919, este largo experimento le duraría hasta su retiro. King crió 25 generaciones de ratas grises de Noruega a partir de seis parejas de ratas salvajes atrapadas en las calles de Philadelphia. Registrando los cambios desde la generación 19 a la 25, King encontró que las ratas crecían más rápidamente y alcanzaban una talla mucho mayor que sus prototipos salvajes. Esto estaba conforme con los estudios anteriores sobre domesticación de animales. Al mismo tiempo que Calvin Bridges estaba criando grupos especiales de mutantes de *Drosophila* en Columbia, King descubrió y catalogó numerosas mutaciones en sus ratas salvajes, que afectaban al color de la capa, la estructura de la piel y el color de los ojos. Mediante apareamientos controlados determinó cuándo la mutación era autosómica o ligada al sexo, dominante o recesiva, resultado de una mutación singular o que afectaba a genes modificadores. King crió a los mutantes para distinguir entre homocigotos y heterocigotos. La cría de ratas mutantes produjo más mutantes: los colores *cinnamon* y *waltzing* y la raza *stub* (con colas cortas). King rechazó la hipótesis de que los genes de todas estas mutaciones estuvieran presentes en las seis parejas originales de ratas salvajes y hubieran permanecido latentes hasta los cruzamientos que permitieron su expresión fenotípica. Ella especulaba que las mutaciones aparecían después de muchos años de cautividad, y que se debían a que los machos muy jóvenes podían reproducirse con hembras muy viejas al estar protegidas de la competición de la selección natural. Así, King concluía que la variabilidad del “plasma germinal” debida a la edad conducía a un incremento de individuos mutantes.

En la década de 1930, King colaboró con Castle en cuatro estudios de ligamiento sobre ratas noruegas, en los cuales mapearon los genes de muchas mutaciones recién descubiertas. King hizo los apareamientos, mientras Castle proporcionó el análisis genético de los datos experimentales. En 1932 King presentó un escrito ante el VI Congreso Internacional de Genética resumiendo los tipos de mutaciones que habían tenido lugar en 28 generaciones de ratas noruegas cautivas, que incluían a más de 45.000 individuos. Sugirió que la cautividad, con su alteración de las condiciones ambientales y nutricionales, tendía a producir diversidad en razas salvajes, y no a producir más homogeneidad.

Nuevamente el impacto de sus descubrimientos se extendió más allá de la comunidad científica y llegó a la opinión pública. Los reportajes de ratas de pelo rizado y ratas *waltzing* o de color chocolate fascinaron al público. Un periódico anunció que King había conseguido producir muchas generaciones de ratas grises en el laboratorio experimental, en contra de la teoría de que las ratas salvajes no podían criarse en

cautividad, y había notado cambios en cada sucesiva generación, que mostraban que la evolución natural podía ser estimulada en el laboratorio. El periodista se había quedado “maravillado, no de la belleza de la rata, sino del espectáculo de una mujer sujetando a una rata en la palma de su mano” y había encontrado difícil de creer que una de las mayores autoridades sobre ratas en el país “fuera una mujer tan humana y totalmente femenina”⁶.

King siguió adelante planteando siempre nuevas investigaciones, y a sus setenta años diseñó una serie de experimentos sobre trasplantes de tumores en ratas, en los que tuvo la colaboración de Margaret Reed Lewis, que había sido compañera de clase del *Bryn Mawr College* y colega del *Wistar Institute*. Consiguieron extraer una sustancia liposoluble productora de tumores de sarcoma de ratas, e inducir tumores por inyección de la sustancia en ratas de la misma raza de cría. Esta sustancia se obtuvo a partir de tumores, tanto primarios como inducidos, pulverizados hasta hacer una pulpa, realizando una extracción en alcohol de 95% y destilando el extracto. En un experimento posterior, King y Lewis consiguieron inhibir el crecimiento de los tumores y hacer a las ratas inmunes al crecimiento posterior de muestras del mismo tumor, mediante la inyección de la sustancia directamente dentro del tumor.

Los estudios experimentales sobre el sexo en los anfibios (1906-1912)

En 1906, cuando comenzó sus experimentos sobre la determinación del sexo, Helen King conocía y admiraba los recientes descubrimientos sobre los cromosomas accesorios y sexuales en los insectos, pero consideraba que la cuestión de la determinación del sexo en los animales estaba todavía abierta, y que era necesario especialmente descartar la posible influencia de los factores externos. El propósito de sus investigaciones se encuentra expresado en un texto de 1909:

“Si se encuentra que los factores externos tienen influencia sobre el sexo, entonces la actual teoría cromosómica del sexo tendrá que ser abandonada o modificada considerablemente; si, por el contrario, se muestra convincentemente que los factores externos no tienen ninguna influencia sobre la determinación del sexo, entonces quedará aclarado el camino para la teoría que mejor explica los hechos hasta ahora conocidos y ofrece la hipótesis más favorable para futuras investigaciones en esa línea”⁷

En la presentación de su artículo de 1911, King calificaba de “aparentemente irreconciliables” los dos puntos de vista que en aquel momento se mantenían sobre la diferenciación sexual: el de investigadores como Rauber (1900), Beard (1902), Schultze (1903) y Russo (1909), que defendían que el sexo se determinaba en el ovario, principalmente mediante las condiciones nutritivas, y el de quienes como Stevens (1905), Wilson (1906) y Morgan (1907, 1909, 1910) se inclinaban a pensar que el sexo no estaba determinado hasta el momento de la fecundación, y que era el espermatozoide el que, definitiva e inalterablemente, fijaba el sexo del individuo. A la vista de la cantidad y variedad de las pruebas aportadas en apoyo de cada una de las hipótesis, King pensaba que probablemente tendría razón Jordan (1909) cuando decía que el sexo estaba determinado de diferentes modos y en diferente momento en los diferentes grupos de animales y plantas, y añadía:

⁶Ver : Ogilvie (1993), *op. cit.*, p. 109.

⁷ King, H. D. Studies on Sex Determination in Amphibians II. *Biol. Bull.* 1909; 16:27.

“Si esto es cierto, será fútil el intento de encontrar un único factor, o conjunto de factores, que sean la causa fundamental del sexo en todos los organismos, y las investigaciones en este campo deberían limitarse a intentar descubrir las condiciones que determinan el sexo en la forma particular seleccionada para el estudio”⁸

Sus trabajos experimentales más relevantes fueron los referidos a los factores que podían influir sobre las proporciones de los sexos en *Bufo lentiginosus*, sobre los cuales publicó cinco estudios entre 1907 y 1912. En cada uno de ellos analizó la influencia de diferentes factores, como la alimentación, el ovario de procedencia de los huevos o su madurez, la temperatura, la presencia de sustancias químicas en el agua o el grado de hidratación. King se proponía esclarecer el papel que jugaba la alimentación sobre el desarrollo del sexo de los sapos, mejorando los experimentos que Born, Yung y Cuénot habían realizado con ranas, ya que ellos no habían descartado la influencia de otros factores o habían utilizado un escaso número de individuos. Por otra parte, la observación del sexo en los renacuajos al comienzo de la metamorfosis había sido en todos los casos poco precisa por estar basada en el tamaño de las gónadas, mientras que el examen citológico que ella proponía aportaba una mayor seguridad. King realizó también un estudio de la espermatogénesis, en el que no encontró ningún dimorfismo de los espermatozoides que pudiera asociarse con la determinación del sexo, con el fin de descartar que los resultados de sus experimentos pudieran justificarse por la fecundación selectiva. Como punto de partida, calculó la proporción normal entre los sexos de las poblaciones de *Bufo* en condiciones naturales a partir de sus observaciones, según las cuales la proporción de hembras llegaba a ser del 51,8 %. A continuación se comentan los planteamientos y resultados de cada serie de experimentos.

1) Primera serie de experimentos (1907): influencia de la alimentación

En el laboratorio de la universidad de Pennsylvania, King mantuvo gran cantidad de huevos fecundados en condiciones homogéneas de luz y temperatura, obteniendo 1900 renacuajos que completaron su desarrollo hasta la metamorfosis. Todos fueron bien alimentados, con el fin de comprobar la hipótesis de que una alimentación abundante favorecía el desarrollo de hembras en la población. Distribuyó los huevos en varios grupos, proporcionando a los renacuajos diferentes dietas, tomando como base la hipótesis de Yung de que el alimento proteico favorecía el desarrollo de hembras: un grupo fue alimentado exclusivamente con carne, otro grupo solo recibió vegetales (cereales) y el tercero recibió una dieta semejante a la natural, compuesta por plantas acuáticas y microorganismos; un cuarto grupo fue alimentado exclusivamente con yema de huevo, con el fin de testar la hipótesis de Danilewsky, según la cual los alimentos ricos en lecitina producían un mayor crecimiento en tamaño y peso. Los resultados dieron en los distintos grupos una proporción de hembras entre el 45,8 y el 59,9 %, unas variaciones demasiado pequeñas para ser significativas. La media sobre los 1536 renacuajos en los que pudo identificar el sexo fue del 53,6 %, porcentaje levemente superior al obtenido en poblaciones naturales. Incluyendo en los cálculos los 364 individuos que habían muerto antes de poderse conocer el sexo, el porcentaje podía variar entre el 43,3 % (suponiendo que todos fueran machos) y el 62,5 % (si todos

⁸ King (1911), *op. cit.*, pp. 205-206. Nótese que también N. M. Stevens había llamado la atención sobre las diferencias que existían entre las especies y el peligro de sacar conclusiones para una especie basándose en los conocimientos obtenidos en otra; ambas destacaron la tendencia general de buscar un mecanismo universal.

fueran hembras). Los resultados, en cualquier caso, no cambiaban lo suficiente como para justificar la influencia de la nutrición.

2) Segunda serie de experimentos (1909): influencia de diversos factores

King consiguió mejores condiciones para sus experimentos utilizando el *vivarium* de la universidad, donde dispuso de grandes acuarios de vidrio y tanques de cemento con agua corriente en los que podían criarse gran número de renacuajos simultáneamente. Salvo en un experimento que pretendía mostrar la influencia de la desnutrición, alimentó a todos los renacuajos de forma similar (plantas acuáticas, microorganismos en abundancia y ocasionales aportes extra de cereales o carne), y, puesto que ya había demostrado que en la cría artificial no había ninguna relación entre la mortalidad y el sexo, sólo contabilizó los individuos que alcanzaron la suficiente madurez. En esta serie de experimentos analizó separadamente la posible influencia del ovario de procedencia de los huevos (izquierdo o derecho), la desnutrición, la madurez de los huevos en el momento de la fecundación y la temperatura.

King extrajo 600 huevos de cada uno de los ovarios de una hembra que comenzaba su puesta, los depositó en recipientes separados y realizó la fecundación artificial con esperma de un solo individuo, procurando después que todos los renacuajos resultantes estuvieran expuestos a las mismas condiciones ambientales. Analizando el sexo de los primeros 300 en llegar a la metamorfosis de cada recipiente, obtuvo resultados muy semejantes en ambos lotes: un 56,3 % de hembras en el procedente del ovario derecho, y un 57,3 en el del izquierdo. King repitió el experimento un año después y obtuvo similares resultados, por lo que concluyó:

“Cualesquiera que sean los factores que normalmente determinan el sexo en Bufo parecen tener similar acción sobre los huevos de ambos ovarios”⁹

La influencia de la desnutrición fue asimismo descartada en sus experimentos: 800 huevos fecundados de forma natural fueron colocados en un tanque sólo con agua, sin más alimento que los cadáveres de los que iban muriendo y el aporte extra de una pequeña cantidad de comida. Entre los 59 renacuajos que sobrevivieron hasta llegar a la metamorfosis, el 59,3 % fueron hembras. Aunque el número de individuos en el recuento fuera escaso, bastaba para rechazar la hipótesis de Schenk (1902) y otros, según la cual la escasez de alimentos conducía a una producción mayoritaria de machos.

En otro de los experimentos, King intentó comprobar la hipótesis de Richard Hertwig sobre la influencia del grado de madurez del óvulo en el momento de la fecundación. En los sapos era difícil determinar la fase de maduración del óvulo, ya que mientras en las ranas estudiadas por Hertwig la puesta se prolongaba durante varios días, en los sapos duraba sólo unas horas. King fue retirando los huevos puestos por una hembra a intervalos de una hora, obteniendo cuatro lotes de unos 400 huevos cada uno. King no encontró diferencias apreciables en la velocidad de crecimiento ni en la mortalidad entre los cuatro lotes. Las proporciones de hembras fueron 53,0 %, 56,4 %, 57,9 % y 53,3 %, una diferencia tan pequeña que le permitió concluir que había una elevada uniformidad en la proporción de hembras. Por otra parte, todos los huevos utilizados en este experimento deberían haber mostrado mayor tendencia a producir

⁹ King, H. D. Studies on Sex Determination in Amphibians II. *Biol. Bull.* 1909; 16:29-30.

machos, ya que habían sido puestos una semana antes del periodo habitual de las puestas de los sapos en aquella región de Pennsylvania, mientras que, por el contrario, el 55,1 % del total de renacuajos habían resultado hembras:

“Este resultado no concuerda con la idea de Hertwig de que cuanto más joven sea el huevo en el momento de su fecundación, mayor será su tendencia hacia la producción masculina”¹⁰

King realizó otro experimento para observar el efecto de un “exceso de maduración” en los huevos: extrajo los huevos de una hembra siete horas después de su muerte y los fecundó artificialmente con el esperma de dos machos. El número de renacuajos y su desarrollo fue muy inferior al habitual, de lo que dedujo que los cambios *post mortem* habían afectado a los huevos, pero aún así consiguió determinar el sexo en los 372 individuos que alcanzaron la metamorfosis, obteniendo que las hembras representaban el 52,15%. Como, de acuerdo con la teoría de Hertwig, los huevos demasiado maduros tenderían a producir un exceso de machos, King concluía:

“Los resultados de estos experimentos parecen indicar que en Bufo el sexo no está determinado por la madurez del huevo en el momento en que es fecundado”¹¹

El último experimento de esta serie estaba destinado a comprobar la influencia de la temperatura. Muchos investigadores habían asegurado que las altas temperaturas favorecían el desarrollo de hembras, y las bajas, el de machos. Pero la mayoría de los experimentos realizados para comprobarlo habían sido realizados con organismos inferiores, y el único realizado con vertebrados era el de Hertwig con ranas. King obtuvo 500 huevos fecundados el mismo día de forma natural y los separó en dos lotes: uno fue colocado en un invernadero a temperaturas de 23-30° C y el otro en un tanque al aire libre, donde la temperatura del agua era de 14-18° C durante el día y algo inferior durante la noche. La proporción de hembras en el primer lote fue del 69,8 %, y en el segundo, del 61,6 %, dando en ambos casos un inusual exceso de hembras. King repitió el experimento con otro conjunto de 500 huevos, procediendo de la misma manera. En este caso, la proporción de hembras entre los criados a elevadas temperaturas fue del 23,1 %, y en los que crecieron en agua fría, el 37,6 %. De ello concluyó:

“Las proporciones entre los sexos muy diferentes obtenidas en lotes de huevos sometidos a las mismas condiciones de temperatura parecen indicar que el sexo en Bufo no está determinado por la temperatura del agua en que se desarrollan los renacuajos”¹²

3) Tercera serie (1910): influencia de la temperatura

Un año más tarde, King realizó otros experimentos sobre la influencia de la temperatura, intentando ahora comprobar su efecto en el momento de la fecundación. Para ello situó una pareja de adultos en agua calentada a 26° C hasta que los huevos fueron puestos y fecundados, y otra pareja en agua a 9° C. La proporción de hembras entre los renacuajos varió muy poco: 56,2 % en el primer caso y 43,3 % en el segundo. Puesto que la media de la proporción de hembras en todos los renacuajos que había criado (que alcanzaban por entonces la cifra de 9.949) era del 51,6 %, con notables variaciones, los resultados obtenidos no parecían estar relacionados con la temperatura.

¹⁰ King (1909), *op. cit.*, p. 33.

¹¹ King (1909), *op. cit.*, p. 35.

¹² King (1909), *op. cit.*, pp. 40.

Para probar que la diferencia no se debía al distinto origen de los huevos de los dos lotes (distintas parejas), King realizó otro experimento separando en dos lotes los huevos de una sola hembra, que fueron fecundados con el espermatozoide de un mismo macho a diferentes temperaturas. Aunque la proporción de hembras variaba directamente con la temperatura entre el 53,3 % y el 48,4 %, la disminución era tan pequeña que no parecía significativa, sobre todo considerando el pequeño número de individuos supervivientes en los lotes de los extremos. Sobre ello, King comenta:

“Esta diferencia es tan pequeña que es evidente que la temperatura, actuando en el momento de la fecundación de los huevos, no es el factor dominante en la determinación del sexo en *Bufo*”¹³

King comparó estos resultados con los obtenidos en anteriores experimentos en los que había registrado la temperatura del agua durante la fecundación, comprobando que en el conjunto las proporciones de hembras no mostraban una disminución gradual en función de la temperatura, por lo que concluyó: “En los resultados de estas diversas series de experimentos no hay la uniformidad que se podría esperar encontrar si sólo la temperatura determinara el sexo en el momento de la fecundación del huevo”. Sin embargo, King no descartaba una influencia indirecta de la temperatura, que podría ejercerse a través de los huevos o de los espermatozoides:

“[Los resultados] no excluyen la posibilidad de que la temperatura pueda tener una acción indirecta sobre la determinación del sexo en esta especie (...) Es concebible que las bajas temperaturas puedan ser más perjudiciales para los espermatozoides productores de hembras que para los productores de machos, si es cierto que hay un dimorfismo en los espermatozoides de *Bufo* y que el macho determina el sexo (...) Si, por el contrario, el sexo está determinado en el huevo, es posible que el mecanismo determinante del sexo esté ajustado de tal forma que la temperatura, bajo ciertas condiciones, pueda inclinar la balanza en una dirección o en otra”¹⁴

4) Cuarta serie de experimentos (1911): influencia de los cambios químicos

En la primavera de 1910, King analizó el efecto de la presencia o concentración de diferentes sustancias químicas en el agua. Basó sus investigaciones en la hipótesis de que las condiciones que rodeaban al huevo en el momento de la fecundación podían producir alteraciones en la estructura del organismo en desarrollo. Para estos estudios, King contó con un moderno equipamiento proporcionado por el *Wistar Institute*, que permitía mantener condiciones estables y cambiar con facilidad el agua en numerosos recipientes, de forma que pudo depositar al mismo tiempo gran cantidad de huevos y someterlos a diferentes condiciones. Estableció además una muestra control, comparando los resultados de cada serie con los obtenidos de la misma pareja en condiciones normales. Los factores analizados en los experimentos fueron los siguientes:

a) Presencia de alcohol: King utilizó disoluciones de alcohol a diferentes concentraciones entre 0,13 y 2 %. Obtuvo un total de 210 renacuajos y pudo observar el

¹³ King. H. D. Temperature as a factor in the determination of sex in amphibians. *Biol. Bull.* 1910; 18:135.

¹⁴ King (1910), *op. cit.*, p. 136. He subrayado la frase para destacar que King, a semejanza de otros investigadores, utiliza el dimorfismo morfológico de los espermatozoides como fundamento de una posible diferencia fisiológica, que justificaría la diferente mortalidad al estar expuestos a condiciones adversas.

sexo en 134; la proporción de hembras en todos los cultivos fue muy uniforme, con una media de 51,4 %

b) Deshidratación por falta de agua: King utilizó huevos procedentes de la fecundación en un acuario seco y los mantuvo fuera del agua 4 horas en un caso y 7 en otro, antes de llevarlos al agua, donde continuaron su desarrollo. En el primer lote la proporción de hembras fue del 60,9 %, y en el segundo, del 70,8 %

c) Aumento de la presión osmótica: King deshidrató un lote de huevos maduros introduciéndolos en una disolución al 2,5 % de azúcar durante 10 minutos, y después los puso en agua con espermatozoides. Hizo lo mismo con otro lote, utilizando en este caso sal al 2,5 %. La mortalidad en ambos casos fue elevada, y las proporciones de hembras fueron, respectivamente, el 70 % y el 72,5 %, ambas muy superiores a las muestras control y por encima del rango de variación normal de la especie.

d) Absorción de agua en exceso: Huevos y espermatozoides fueron colocados durante media hora en disoluciones al 0,01 y 0,0025 % de ácido acético e hidróxido sódico, con el fin de aumentar su absorción de agua. Con ácido acético, la proporción de hembras fue como media del 39,8 %, mientras con hidróxido sódico, del 57,1 %. Aunque la diferencia con las muestras control era considerable en el primer caso, el hecho de que el álcalis no modificara la proporción de hembras hizo pensar a King que estas disoluciones no tenían efecto en el proceso de determinación del sexo, ya que en principio ambas tendrían que causar el mismo efecto. El efecto del ácido podría deberse a su influencia sobre los espermatozoides, o bien al aumento de la permeabilidad de la *membrana pellucida* del huevo, que facilitaría la fecundación, lo que conllevaría una mayor producción de machos [no explica por qué].

King incluyó en esta serie un experimento para testar la posibilidad de que existieran dos tipos de espermatozoides en relación con el sexo. Morgan (1908) había sugerido que si existía un dimorfismo en los espermatozoides de los anfibios relacionado con la determinación del sexo era posible que diferentes machos produjeran mayor cantidad de uno de los dos tipos. También podía ocurrir que cada tipo fuera producido en uno de los testículos, o al menos en mayor número en un testículo que en otro. King tomó un conjunto de huevos del ovario derecho de una hembra de *Bufo* y los repartió en cuatro lotes, que fueron fecundados con esperma del testículo derecho o izquierdo de dos sapos diferentes. Las proporciones de hembras obtenidas en cada lote fueron algo diferentes, pero la variación no fue superior a la obtenida en otros casos.

Las principales conclusiones recogidas por King al final del artículo eran las siguientes:

- el sexo en *Bufo* se determinaría alrededor del momento de la fecundación, y los factores externos podrían en ese momento tener alguna influencia.

- el sexo en *Bufo* parecía estar determinado por el huevo, aunque no se podía excluir la posibilidad de que en algunos casos los espermatozoides pudieran tener alguna influencia

- la cantidad relativa de agua absorbida por el huevo en el momento de la fecundación tenía alguna influencia en la determinación del sexo: un incremento en el contenido de agua aumentaba la tendencia a producir machos

- los resultados de sus experimentos podían explicarse también sobre la base de la fecundación selectiva, pero ésta no había sido nunca demostrada

5) Quinta serie (1912): influencia del contenido de agua en el huevo

Partiendo de las conclusiones anteriores, King volvió a analizar la influencia del contenido de agua del huevo. Teniendo en cuenta que el agua constituía del 60 al 90 % del protoplasma y que era de la mayor importancia para los procesos químicos del metabolismo celular, era concebible que la alteración del contenido de agua justo antes o durante el proceso de fecundación favoreciera la producción de un sexo o el otro, suponiendo que el sexo del individuo dependiera de algún proceso metabólico concreto que tuviera lugar durante el periodo de la fecundación. En los experimentos anteriores había observado que la pérdida de agua en el huevo aumentaba la tendencia a la producción de hembras. En la primera serie de experimentos se habían tratado los huevos antes de la fecundación, y en la segunda el tratamiento se había llevado a cabo durante la fecundación, comparándose los resultados de cada experimento con la correspondiente muestra control.

En la primera serie el tratamiento consistió en una deshidratación mediante exposición de los huevos durante 10 o 20 minutos a disoluciones al 2 % de azúcar o sal. Las proporciones de hembras fueron mayores que en las muestras control, y la menor proporción de machos se obtuvo en la muestra tratada con sal, cuya presión osmótica es varias veces mayor que la del azúcar. Estos resultados concordaban con la idea de que cuanto menor fuera la cantidad de agua en el citoplasma del huevo mayor sería su tendencia a producir una hembra. También podían explicarse los resultados suponiendo que la exposición a disoluciones hipertónicas facilitara la penetración de espermatozoides productores de hembras, pero ello implicaba aceptar dos cuestiones no demostradas: 1) que fueran los espermatozoides los determinantes del sexo, y 2) que hubiera diferencias en la posibilidad de fecundación entre los dos tipos, es decir, que existiera fecundación selectiva. King analizó la posibilidad de que las proporciones encontradas estuvieran dentro del rango de variación normal de la especie, reuniendo los datos obtenidos en todos los estudios realizados desde 1904. Siendo que los porcentajes de hembras variaban entre el 56,8 % y el 46,4 %, la proporción obtenida con el tratamiento con sal (60,3 %) era claramente mayor que el de ninguna muestra control examinada.

En la segunda serie, King expuso huevos fecundados a diversos agentes que incrementarían la absorción de agua. Por diferentes razones, ninguno de ellos dio resultados concluyentes. El porcentaje de hembras obtenido fue muy bajo (hasta de un 26,3 %), igual que en los experimentos realizados el año anterior. Por ello King comenta:

“Una serie de resultados tan consistente en tan diferentes casos sugiere con fuerza que las disoluciones ácidas han incrementado la tendencia de los huevos a producir machos más que hembras, presumiblemente porque causan en ellos la absorción de una cantidad mayor de agua durante el periodo de fecundación”¹⁵

En otros experimentos King indujo la deshidratación mediante exposición a disoluciones hiperosmóticas o por acción de un papel de filtro en el que huevos y espermatozoides eran depositados. En el primer caso el porcentaje de hembras fue normal dentro de los límites de variación de la especie. Sin embargo, con el papel de filtro la mortalidad fue muy baja, y el desarrollo embrionario comenzó muy pronto, antes incluso de que los huevos fueran devueltos al agua, los renacuajos fueron notablemente

¹⁵ King, H. D. Studies on Sex-Determination in Amphibians. V. The effects of changing the water content of the egg, at or before the time of fertilization, on the sex ratio of *Bufo lentiginosus*. *J. Exp. Zool.* 1912; 12(3):329

más grandes que en los demás experimentos y comenzaron antes su metamorfosis. El 72,3 % de ellos fueron hembras. Tras repetir el experimento con los huevos de otra hembra, el porcentaje fue del 77,3 %. Estos porcentajes de hembras eran mucho mayores que los de las muestras control, y demasiado altos para ser considerados dentro del rango de variación normal de la especie.

Al final del artículo, King afirmaba, a modo de conclusión, que sus resultados no podían explicarse sobre la base de la teoría cromosómica, ya que, según mostraban sus experimentos, la determinación del sexo en *Bufo* no podía depender exclusivamente de los espermatozoides. Por otra parte, la teoría de Hertwig podía ser una explicación, si se aplicaba a los huevos después de la fecundación:

“La teoría cromosómica de la determinación del sexo no ofrece por tanto una explicación satisfactoria de estos resultados, a menos que se asuma arbitrariamente que el lote de espermatozoides utilizado en la fecundación contenía un número mucho mayor de espermatozoides productores de hembras que de aquellos que fueran productores de machos (...) [Los resultados] sugieren con fuerza que en *Bufo* el sexo no depende exclusivamente de los espermatozoides, sino que está determinado por el huevo solamente o por el huevo y el espermatozoide. Parece también que el sexo puede ser influido por la disminución del contenido de agua del huevo antes o durante el momento de la fecundación. La teoría de Hertwig (1906) de que el sexo está determinado por la relación de masas entre la cromatina y el citoplasma parece ofrecer una explicación tentativa de estos resultados, si se aplica a las condiciones que existen en el cigoto y no en los huevos maduros sin fecundar. Hasta que estos experimentos sean repetidos y extendidos, en todo caso sería inútil intentar la formulación de una teoría de la determinación del sexo que explique estos resultados y los ponga en armonía con los que se han obtenido por otros investigadores en este campo”¹⁶

La ratio sexual en las ratas albinas (1909-1950)

Como se ha dicho antes, las investigaciones más reconocidas de H. D. King fueron las desarrolladas con ratas albinas y ratas grises de Noruega en el *Wistar Institute* de Philadelphia, donde fue profesora hasta su retiro en 1950. King utilizó estos roedores para estudiar diversos aspectos, como la proporción entre los sexos, los efectos de la consanguinidad, la alimentación, la domesticación, las anomalías en la gestación, la aparición de mutaciones o el desarrollo de tumores. Aquí me referiré solamente a sus resultados en relación con la determinación del sexo.

En los primeros experimentos, publicados en 1911, King exploró los efectos de la castración sobre las proporciones de los sexos de la descendencia y analizó la influencia de la hibridación entre ratas albinas y salvajes. Era común aceptar la idea de que la hibridación alteraba la *ratio* sexual en el sentido de producir mayor proporción de machos, pero se habían realizado pocos estudios sobre la cuestión. Tras repasar los de Buffon (1709-1788), Davenport (1906), Guyer (1903, 1909) y Guaita (1898, 1900) con aves de corral, palomas y ratones, y los de Raymond y Maud Pearl (1908) con estadísticas de nacimientos humanos, King analizó los resultados de los cruzamientos entre ratas salvajes (*Rattus norvegicus*) y ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*). Otros investigadores habían realizado estos cruzamientos con distinta finalidad (Fischer 1874, Crampe 1884, Bos 1894), pero no se habían publicado estadísticas sobre la

¹⁶ King (1912), *op. cit.*, p. 335-336

proporción entre los sexos. S. Hatai, del *Wistar Institute*, que había cruzado estas ratas con el fin de obtener material para el estudio del sistema nervioso central, proporcionó a King sus registros sobre los sexos en las distintas camadas; King también había colaborado en las preparaciones microscópicas de los cortes de cerebro, como muestran sus publicaciones:

King partía del cálculo de la *ratio* sexual normal para las ratas albinas, que según Cuénot (1899) sería de 105,6 machos cada 100 hembras¹⁷. A partir de los datos obtenidos por King en sus propias camadas de ratas albinas, la *ratio* sería de 107,3. Consideró que la proporción en las ratas salvajes sería semejante, ya que un leve exceso de machos era habitual en las poblaciones naturales. King realizó cuatro series de experimentos de cruzamiento, obteniendo un total de 163 individuos híbridos, de los cuales 89 fueron machos y 74 hembras. La proporción de machos era por tanto algo mayor (120,3), pero no tan alta como la obtenida por Guaita con ratones (133,3). En dos de las cuatro series se habían realizado apareamientos entre individuos de la primera o la segunda generación filial sin considerar su grado de parentesco, encontrando que la mortalidad era muy elevada. King consideró la posibilidad de que la consanguinidad hubiera influido en alguna medida sobre el sexo de los descendientes, pues según había afirmado Düssing (1884) se producía un notable incremento en el número de machos en los apareamientos consanguíneos, tanto en humanos como en otros mamíferos. Sin embargo, Schultze no había detectado ningún cambio en la *ratio* sexual con los ratones albinos que había cruzado durante cuatro generaciones, ni tampoco ella misma en las 500 ratas albinas obtenidas en cinco generaciones. Tomando conjuntamente los datos de las distintas series de cruzamientos, aun descartando aquellos en que la mortalidad había sido elevada, la proporción de machos era como media de 118,1 por 100 hembras, y, por tanto, considerablemente superior a la normal en las ratas noruegas y fuera de su rango de variación. La uniformidad resultante en las distintas series de experimentos descartaba que fueran producto del azar, y King concluía:

“Parece, por tanto, que la hibridación altera la sex ratio produciendo un marcado incremento en la proporción relativa de machos”¹⁸

Guyer (1909) había proporcionado una explicación al exceso de machos basada en la teoría de que el sexo estaba determinado en el ovario principalmente por las condiciones nutritivas. Su razonamiento se basaba sobre tres premisas: a) los cigotos producidos en un cruzamiento híbrido presentarían una interferencia en sus procesos metabólicos, a causa de las incompatibilidades entre los dos diferentes “plasmas germinales”; b) esta interferencia retardaría las fases constructivas del metabolismo en el óvulo fecundado; y c) estos cigotos tenderían a una producción mayor de machos, ya que las hembras se producirían sólo cuando las condiciones fueran favorables al metabolismo constructivo (anabolismo). La hipótesis de Guyer era, pues, concordante con la de Geddes y Thompson, que relacionaba el anabolismo con las hembras y el catabolismo con los machos.

¹⁷ En sus estudios sobre *Rattus*, King utiliza para la sex ratio el número de machos por cada 100 hembras, mientras que en los que publicó sobre *Bufo* utilizaba el porcentaje de hembras sobre el total de la población (igual que Yung). Es posible que este cambio se debiera a que King había entrado en un contexto, el de los estudios estadísticos, en el que la medida estaba normalizada de esa manera, como hemos visto en las publicaciones de Pearl.

¹⁸ King, H. D. The Sex Ratio in Hybrid Rats. *Biol. Bull.* 1911; 21:110.

King decidió seguir trabajando en la línea marcada por Guyer, quien en 1903 había mostrado la degeneración testicular de muchas palomas híbridas. Otros observadores habían encontrado anomalías mayores o menores en las gónadas de los híbridos, pero ninguno había realizado investigaciones histológicas para determinar los cambios estructurales producidos. King recopiló material para estudiar las gónadas de las ratas híbridas, con la esperanza de encontrar la causa de la creciente esterilidad en las sucesivas generaciones de híbridos, si bien no pudo ofrecer una explicación satisfactoria de la alteración de la proporción de sexos.

En 1915, King publicó en colaboración con J. M. Stotsenburg un trabajo sobre la proporción de los sexos y el tamaño de las camadas referido a las ratas albinas, basado en los datos recogidos entre 1911 y 1914 en la “colonia” del *Wistar Institute* (una población de ratas albinas por entonces ya de gran tamaño y de uso común por parte del personal investigador). La proporción media obtenida entre 1911 y 1913 fue de 106,9 machos por cada 100 hembras. En el año 1914 se intentó registrar el sexo de todas las camadas nacidas en la colonia, por lo que el número de registros de ese año fue mucho mayor. La proporción media de machos obtenida fue de 108,1 por 100 hembras, con un rango de variación solo levemente mayor que en el conjunto de los años anteriores. En el total de 1089 camadas examinadas la proporción fue de 107,5 machos por 100 hembras, ligeramente superior a la calculada por Cuénot en base a 30 camadas y prácticamente igual a la calculada por ella misma en 1911 sobre 80 camadas. La proporción de machos entre los adultos era considerablemente menor, lo que se explicaba porque, según indicaban los experimentos en curso, las hembras eran más longevas y menos susceptibles a las enfermedades.

A continuación, King analizó los datos en relación con las estaciones, encontrando que en todos los años la proporción de machos alcanzaba un máximo durante el verano (117,7 como media) y un mínimo en primavera (como media, 99). Según las observaciones realizadas en miles de camadas durante seis años, los apareamientos eran mucho más frecuentes en primavera y en otoño, coincidiendo la fecundación en estas estaciones con la menor proporción de machos en los nacimientos subsecuentes. Por otra parte, el verano era la estación con mayor mortalidad y en la que tenía lugar el menor número de nacimientos, siendo este momento en que los animales se encontraban en peores condiciones físicas cuando aparecían las mayores proporciones de machos en los nacimientos. Las variaciones estacionales en las ratas criadas en el laboratorio sólo podían relacionarse con la temperatura, ya que otras condiciones, incluida la alimentación, eran iguales durante todo el año. De acuerdo con los datos proporcionados por diferentes autores, las variaciones estacionales en las proporciones de machos eran frecuentes en los mamíferos domésticos (caballos, gatos, ovejas, cerdos, perros). Era necesario correlacionar estas variaciones con las condiciones ambientales en que había ocurrido la fecundación, teniendo en cuenta el periodo de gestación de cada especie, ya que todas las teorías vigentes sobre la determinación del sexo establecían que ésta tenía lugar durante -o antes de- la fecundación. King utiliza aquí, igual que lo hizo para sus resultados con *Bufo*, la hipótesis metabólica de Guyer, asumiendo una relación entre “las peores condiciones físicas” y la mayor proporción de machos en los nacimientos:

“Si pudiera demostrarse, con una base estadística suficiente, que la proporción de sexos en varios animales varía en una dirección definida según el momento del año en que tiene lugar la concepción, ello indicaría que tiene lugar algún proceso metabólico en uno

u otro o en ambos organismos parentales en los periodos establecidos, que tendería a cambiar la proporción entre los sexos hacia un lado o el otro”¹⁹

King analizó también la hipótesis de que la edad de la madre tuviera influencia sobre el sexo de la descendencia. Sobre ella existían estudios estadísticos en población humana como los de Punnet (1903) y Bidder (1878), y algunos estudios experimentales con animales domésticos. Copeman y Parsons (1904) habían relacionado la edad de la madre y el sexo de la descendencia en los cruzamientos realizados con ratones, obteniendo mayores proporciones de machos en madres muy jóvenes (menos de 2 meses) o muy mayores (6 meses), mientras que, como media, la proporción de sexos en los ratones era aproximadamente equilibrada. Esta variación era coincidente con las aportadas para la población humana y la de ganado equino, en las que la proporción más baja de machos se obtenía cuando las madres estaban en el momento álgido de su vida reproductora. Agrupando los datos de 75 camadas de ratas albinas de manera semejante a estos investigadores, King calculó la proporción de machos dentro de cada camada según esta fuera la primera, segunda, etc. de una misma hembra. La proporción de machos disminuía gradualmente, alcanzando el mínimo en las cuartas camadas (74,5 machos por 100 hembras), lo cual podía ser significativo considerando que las camadas tercera y cuarta eran producidas generalmente en el momento álgido de la vida reproductora de las hembras. Aunque el número de registros no proporcionara una muestra suficientemente amplia, los datos coincidían con los obtenidos por Punnet, Bidder y por Copeman y Parsons, por lo que King escribía:

“Todavía no se sabe de qué forma puede afectar la edad de la madre al sexo de la descendencia. El hecho de que las ratas hembras en el momento álgido de su actividad sexual durante la primavera y el otoño y también en el cenit de su capacidad reproductora produzcan relativamente más crías hembras que machos parecería indicar que la condición física de la hembra, bien como resultado de la edad o del ambiente, produce cambios en el metabolismo que tienden a afectar al sexo de la descendencia”²⁰

Como explicación alternativa, King considera la hipótesis de la existencia de dos tipos de espermatozoides, que implicaría asumir la existencia de fecundación selectiva. Mientras que en el artículo publicado en 1911 la presentaba como poco probable (y en los trabajos sobre *Bufo* prácticamente la descartaba), se aprecia un tono diferente cuando la plantea en esta ocasión, defendiendo la influencia de las condiciones ambientales sobre la ocurrencia de fecundación por uno u otro tipo de espermatozoides, de una forma semejante a la planteada por Wilson:

“Asumiendo que el sexo esté determinado por la constitución cromosómica de los espermatozoides que fecundan el huevo, debemos añadir a esta teoría la probabilidad de que exista alguna forma de atracción o repulsión química entre cada óvulo y un tipo de espermatozoides, para explicar la cantidad de pruebas, constantemente creciente, de que bajo condiciones ambientales diferentes la proporción de sexos puede ser alterada en una dirección definida en varios animales”²¹

Asimismo, King trata de armonizar la influencia del ambiente sobre la fecundación selectiva asumiendo la asociación entre los procesos anabólicos y el sexo femenino:

¹⁹ King, H. D.; Stotsenburg, J. M. On the normal sex ratio and the size of the litter in the albino rat (*Mus norvegicus albinus*). *Anatomical Record*. 1915; 9:410.

²⁰ King y Stotsenburg (1915), *op. cit.*, p. 413

²¹ King y Stotsenburg (1915), *op. cit.*, p. 410-411

“Es posible que los procesos anabólicos predominantes en la hembra en ciertos periodos pudieran afectar a los óvulos de tal manera que causara que éstos fueran más fácilmente fecundados por espermatozoides productores de hembras que por los productores de machos. En las hembras muy jóvenes, o, por otro lado, en las que no se encuentran en buena condición física, podría suponerse la existencia de procesos catabólicos que dieran ventaja a los espermatozoides productores de machos sobre los productores de hembras. En todo caso, hasta que nuestro conocimiento del mecanismo de la determinación del sexo esté fundado sobre bases más seguras que en el momento presente, parece inútil ofrecer incluso sugerencias tentativas sobre la forma en que este mecanismo puede verse influenciado”²²

En un nuevo análisis de sus datos, King relacionó el tamaño de la camada con el sexo de sus miembros, tomando como referencia los estudios realizados en ratones por Copeman y Parson y Welden. King agrupó los datos correspondientes a 1089 camadas según el número de crías en tres clases: menos de 5, 6-8 y 9 o más crías. En las medias, la mayor proporción de machos (110,6) se daba en la clase intermedia, mientras la menor (100,7) se daba en las camadas más pequeñas, pero la variación de los datos en las distintas clases era muy elevada, y la falta de uniformidad en los resultados parecía indicar que no había una relación definida entre el tamaño de las camadas y el sexo en las ratas albinas. King calculó también el tamaño medio de las camadas de ratas albinas, que para el total de las 1089 examinadas era de 7,0 crías por camada. Comparó esta media con la obtenida por otros autores para la rata gris común, la rata negra y la rata albina. Analizó sus datos tratando de encontrar alguna tendencia de variación estacional en el tamaño de las camadas, pero no encontró una tendencia regular:

“Es evidente, a partir de los resultados, que no hay una tendencia estacional pronunciada en el tamaño de las camadas comparable al evidente cambio que ocurre en la proporción entre sexos en los periodos del año. Los cambios estacionales de la sex ratio son independientes del tamaño de las camadas, así como la sex ratio normal es independiente del tamaño de la camada”²³

Valoración de los estudios realizados por Helen Dean King

En sus investigaciones sobre la producción del sexo en sapo común (*Bufo*) y rata (*Rattus*), King desarrolló el programa de investigación ambientalista, asumiendo que el huevo sería inicialmente capaz de desarrollarse igualmente como macho o como hembra, y que las condiciones ambientales externas determinarían el sexo que llegaría a tener el individuo. Las técnicas citológicas, que había aprendido con Morgan y Wilson, le sirvieron en sus primeros años para estudiar el proceso de gametogénesis en *Bufo*, en el que no encontró ningún tipo de cromosomas sexuales, y más tarde para determinar con precisión el sexo de los renacuajos que estaban a punto de efectuar la metamorfosis. King hizo también algunas aportaciones en el campo de la citología, como descartar las divisiones amitóticas en la multiplicación de las células germinales, o confirmar la disposición en parejas de los cromosomas y su posterior separación durante la meiosis, así como la conservación de la individualidad de los mismos en el estado de “fibra de cromatina” durante la fase de reposo. Pero en la mayor parte de sus investigaciones utilizó fundamentalmente los métodos estadísticos (recuentos de la *ratio* sexual en poblaciones grandes) y experimentales (modificación de los cambios ambientales

²² King y Stotsenburg (1915), *op. cit.*, p. 413

²³ King y Stotsenburg (1915), *op. cit.*, p. 419

alrededor del momento de la fecundación, cuando previsiblemente podían tener influencia). En este sentido, a pesar de que su formación inicial fue muy semejante a la de Nettie Maria Stevens, tomó un camino diferente en lo que respecta a la orientación de su trabajo como investigadora. Sin embargo, se asemeja a esta otra investigadora en la realización del trabajo de forma sistemática y rigurosa, el reconocimiento de los éxitos y los fracasos en la comprobación de las hipótesis y la prevención contra las generalizaciones basadas en pruebas escasas.

En cuanto a los fundamentos teóricos que Helen King manejó en el planteamiento de sus hipótesis, encontramos una adhesión casi sin fisuras a los postulados ambientalistas. Entre los autores que más cita en sus publicaciones encontramos a destacados ambientalistas como Born, Buffon, Cuénot, Danilewsky, Davenport, Düssing, Guaita, Guyer, Punnet, Schenk, Schultze o Yung, junto a embriólogos de conocida prevención contra el determinismo “preformista”, como R. Hertwig o Morgan y Wilson antes de 1910. Entre las hipótesis que King baraja más a menudo encontramos la asociación del sexo femenino con los procesos anabólicos, o cualquiera de sus variantes (condiciones favorables, altas temperaturas), que había sido defendida por Geddes y Thompson (1897) y muchos otros ambientalistas y embriólogos. Su preferencia por esta hipótesis se explica en relación con los referentes que eligió y con el tipo de animales sobre los que realizó sus primeras investigaciones (la reproducción de los anfibios se encuentra, más que en otros animales, expuesta a la acción del ambiente). Sin embargo, desde sus primeras investigaciones (1911) King se manifestó proclive a aceptar la existencia de cromosomas sexuales y el dimorfismo en los gametos, conciliando la explicación morfológica de la determinación del sexo con la influencia de los factores ambientales mediante la aceptación de la existencia de “fecundación selectiva”, utilizando un razonamiento similar al propuesto por Wilson a partir de 1909.

Su principal aportación a la biología del sexo fue su ejemplo de aplicación concienzuda de un método de trabajo experimental, además de una de sus conclusiones más lúcidas para el contexto en el que se encontraba: que no podía encontrarse un único factor o conjunto de factores que fueran la causa fundamental del sexo en todos los organismos, y cada una de las investigaciones debía limitar sus resultados a la especie en la que se había realizado el estudio.

Publicaciones de Helen Dean King

1. The Maturation and Fertilization of the Egg of *Bufo lentiginosus*. *Jour. Morphol.* 1901; 17(2):293-350.
2. The Effects of Heat on the Development of the Toad. *Biol. Bull.* 1903; 5:218-232.
3. Notes on Regeneration in *Tubularia crocea*. *Biol. Bull.* 1904; 4:287-306.
4. Food as a Factor in the Determination of Sex in Amphibians. *Biol. Bull.* 1907; 13(8):40-56.
5. The spermatogenesis of *Bufo lentiginosus*. *Amer. Jour. Anat.* 1907; 7.
6. The Oögenesis of *Bufo lentiginosus*. *Jour. Morphol.* 1908; 19(2):369-438.
7. Studies on Sex Determination in Amphibians II. *Biol. Bull.* 1909; 16:27-43.
8. The Effects of Various Fixatives on the Brain of the Albino Rat, with an Account of a Method of Preparing This Material for a Study of the Cells of the Cortex. *Anatomical Record.* 1910; 4:213-244.

9. Temperature as a factor in the determination of sex in amphibians. *Biol. Bull.* 1910; 18:131-137.
10. The Effects of Pneumonia and of Post-mortem Changes on the Percentage of Water in the Brain of the Albino Rat. *Journal of Comparative Neurology.* 1911; 21(2):147-154.
11. The effects of semi-spaying and semi-castration on the sex ratio of the albino rat. *Jour. Exper. Zool.* 1911; 10(4).
12. The Sex Ratio in Hybrid Rats. *Biol. Bull.* 1911; 21:104-112.
13. Studies on sex-determination in amphibians. IV The Effects of External Factors, Acting Before or During the Time of Fertilization, on the Sex Ratio of *Bufo lentiginosus*. *Biol. Bull.* 1911; 20(4):205-233.
14. *Dimorphism in the Spermatozoa of Necturus maculosus*. Baltimore. 1912.
15. The Effects of Some Amino-Acids on the Development of the Eggs of *Arbacia* and of *Chaetopterus*. *Biol. Bull.* 1912; 22(5):273-290.
16. Studies on Sex-Determination in Amphibians. V. The effects of changing the water content of the egg, at or before the time of fertilization, on the sex ratio of *Bufo lentiginosus*. *J. Exp. Zool.* 1912; 12(3):319-336.
17. The Effects of Formaldehyde on the Brain of the Albino Rat. *Journal of Comparative Neurology.* 1913; 23:283-314.
18. Some Anomalies in the Gestation of the Albino Rat (*Mus norvegicus albinus*). *Biol. Bull.* 1913; 24:377-391.
19. The Growth and Variability in the Body Weight of the Albino Rat. *Anatomical Record.* 1915; 9:715-776.
20. On the Weight of the Albino Rat at Birth and the Factors That Influence It. *Anatomical Records.* 1915; 9:213-231.
21. On the Postnatal Growth of the Body and of the Central Nervous System in Albino Rats That Are Undersized at Birth. *Anatomical Record.* 1916; 11:41-52.
22. The Relation of Age to Fertility in the Rat. *Anatomical Record.* 1916; 11:269-287.
23. Studies in Inbreeding. *Jour. Exper. Zool.* 1918; 26(1-2).
24. Studies in Inbreeding. *Jour. Exper. Zool.* 1918; 27(1).
25. Studies in Inbreeding. *Jour. Exper. Zool.* 1919; 29(1).
26. *Studies on Inbreeding*. Philadelphia; 1919.
27. Linkage Studies of the Rat. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1935; 21:390-399.
28. Linkage Studies of the Rat. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1937; 23:56-60.
29. *Life Processes in Gray Norway Rats During Fourteen Years in Captivity*. Philadelphia; 1939.
30. Linkage Studies of the Rat. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1941; 27:394-398.
31. Linkage Studies of the Rat. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1944; 30:79 ss.
32. Linkage Studies of the Rat. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1948; 34:135 ss.
33. King, H. D.; Stotsenburg, J. M. On the normal sex ratio and the size of the litter in the albino rat (*Mus norvegicus albinus*). *Anatomical Record.* 1915; 9:403-420.
34. King, H. D.; Castle, W. E. Linkage Studies of the Rat. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1940; 26:578-580.
35. King, H. D.; Castle, W. E.; Daniels, Amy L. Linkage Studies of the Rat. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1941; 27:250-254.
36. King, H. D.; Castle, W. E. Linkage Studies of the Rat. *Journal of Heredity.* 1947; 38:341-344.
37. King, H. D.; Castle, W. E. Linkage Studies of the Rat. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1949; 35:545-546.