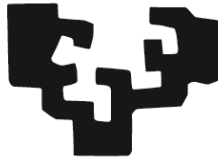


eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

Facultad de Psicología

Departamento de Procesos Psicológicos Básicos y su Desarrollo

Experiencia parental con edulcorantes y herencia intergeneracional en ratas de una preferencia aumentada por el sabor dulce en la que no media el aprendizaje social.

Parental experience with sweeteners and intergenerational inheritance in rats of an enhanced sweet taste preference that is not mediated by social learning.

Tesis Doctoral defendida por:

Fernando Rodríguez San Juan

Tesis Doctoral dirigida por:

Dr. Gabriel Rodríguez San Juan

Donostia-San Sebastián

2022

Esta tesis doctoral se ha desarrollado gracias a una beca del Programa Predoctoral de Formación de Personal Investigador No Doctor del Departamento de Educación, Política Lingüística y Cultura del Gobierno Vasco (PRE-2016-1-0078) y gracias a los proyectos de investigación concedidos por el Gobierno Vasco (IT-1341-19) y el Ministerio de Economía y Competitividad de España (PID2020-120215GB-I00).

Agradecimientos

Para presentar este proyecto de tesis doctoral el trabajo que he realizado se debe en gran parte a mucha otra gente a la cual me gustaría dedicar unas sinceras palabras de agradecimiento por todo el apoyo que me han demostrado durante este periodo de tiempo.

A mis compañeros del laboratorio, en especial a Asier y a Unai, no sólo por la ayuda prestada en los experimentos o los buenos momentos que hemos pasado juntos, sino por el apoyo y la fuerza que me han dado para seguir adelante en los malos momentos. A todos los compañeros y compañeras del grupo de aprendizaje: Sindi, Niki, Byron, Naiara, Ixone, Gabriela, Mirari, Paula, Manu, Borja, Yeray, Eugenia, gracias de verdad por toda la ayuda prestada y por todo lo que he podido aprender junto a vosotros.

Me gustaría agradecer también toda la ayuda que me han dado los compañeros del departamento de procesos los últimos años de cara a la docencia, en especial a Ixone, Mirari y Eugenia, les estoy agradecido por todo su apoyo y consejos.

Quisiera también mostrar mi agradecimiento a todos los miembros del laboratorio GenPhySE en el centro INRA, en especial a los miembros del grupo GENEPI y en particular a la Dra. Frédérique Pitel, por todo lo que pude aprender con ellos durante mi estancia en Toulouse.

No quiero olvidarme de todos los amigos del *Concilio de Rivendel*, que, si bien los últimos años de pandemia no hemos podido compartir muchos momentos juntos, siempre han estado para ofrecerme su apoyo, ayudando a evadirme y compartir buenos momentos durante todo este tiempo.

Mi agradecimiento más cariñoso para toda mi familia, en especial a mis padres Fernando y Mercedes, a mis hermanos Gabriel y Pablo, a Yaiza y a las tres chiquitinas, a Lorea, a Nira y a May, y por su puesto también a Marian, a Maddi y a Iñaki, por todo vuestro amor y cariño que me habéis demostrado siempre.

Me gustaría dar un agradecimiento especial a mi hermano y director de tesis Gabriel, ya que lo que soy como investigador, docente y persona se lo debo en gran parte a él, gracias de todo corazón.

Por último, agradecer de por vida todo el amor de Ane, no tengo palabras para describir lo que supone para mí y la importancia que ha tenido al ayudarme en todos los aspectos de mi vida. Te quiero.

Por muy perfectas que sean las alas de un pájaro, éste nunca podría elevarse sin el apoyo del aire. Los hechos son el aire del erudito. Sin ellos nunca podría volar. Sin ellos, sus "teorías" son vanos intentos.

Iván Petróvich Pávlov (*Pavlov 1949, pp. 50-51*)

Resumen

En la presente tesis doctoral buscábamos nuevos efectos de herencia de caracteres adquiridos (HCA) que partiesen de aprendizajes específicos del estímulo por parte de los padres. El Experimento 1 fue diseñado para explorar la posible transmisión intergeneracional de un efecto de generalización de la habituación a la neofobia. Los parámetros empleados para generar ese aprendizaje no fueron los adecuados, pero una de las condiciones de control, un grupo expuesto a un sólo sabor, sacarina, dio lugar a la adquisición paternal de un fenotipo bien conocido de preferencia por la sacarina. Las pruebas con la descendencia (que nunca interactuó con sus padres) mostraron evidencia de una posible herencia de este fenotipo adquirido. Los descendientes de los padres expuestos a sacarina mostraron un consumo más elevado de una solución de esa sustancia que los descendientes de padres no expuestos a ella (Experimento 1).

Dada la novedad y potencial relevancia de estos resultados, diseñamos tres experimentos adicionales (Experimentos 2a, 2b, y 2c) para confirmar la fiabilidad del efecto y, además, para indagar sobre algunas de sus posibles características. El Experimento 2a, reveló que los descendientes de padres expuestos a sacarina (10 o 20 días de manera continua) exhibían, a los 13 días de edad, más respuestas apetitivas ante la sacarina que los padres no expuestos a ningún edulcorante. Además, al medir la actividad locomotora durante estas pruebas, se comprobó que los descendientes de padres expuestos a sacarina mostraban menos actividad locomotora durante la infusión de la sacarina y la stevia, sugiriendo un mayor disfrute al probar el sabor de las soluciones. El Experimento 2c reveló que los descendientes de padres expuestos a edulcorante (sacarina o stevia) mostraban, a una edad aproximada de 60 días, una preferencia aumentada por la sacarina en comparación con los descendientes de padres no expuestos a ninguna solución con sabor. El Experimento 2b reveló que estos efectos de la experiencia parental no se expresaban cuando la descendencia recibía la prueba a una edad aproximada de 30 días.

El diseño de nuestros estudios nos permite descartar con cierta seguridad que los efectos observados se deban a un aprendizaje social. La descendencia de nuestros experimentos nunca interactuó con sus padres, que fueron quienes recibieron los tratamientos diferenciales puestos a prueba. Además, en los dos estudios, entre la finalización de los tratamientos y la fase de apareamiento se añadió un intervalo de más de una semana. De esta manera se evitó que las madres recibiesen algún tipo de exposición a algún residuo de los edulcorantes empleados en los tratamientos (a través de la orina o las defecaciones de los

machos). Nuestros resultados tampoco son atribuibles a diferencias en el peso y/o desarrollo de los animales. Los diferentes tratamientos realizados nunca produjeron, además, diferencias en consumo en las líneas base de agua establecidas siempre antes de cada prueba. Por todo ello, entendemos que la explicación más plausible de los efectos encontrados es un efecto de herencia de caracteres adquiridos, concretamente una herencia de una preferencia aumentada por el sabor dulce de los edulcorantes.

Una posible explicación a nuestros resultados es que la experiencia parental/ancestral repetida con un estímulo aumenta su saliencia. Una saliencia aumentada del sabor dulce habría resultado en una mayor facilidad de este estímulo para activar los mecanismos de respuesta con los que está relacionado y que dan lugar a los fenotipos conocidos, y medidos en nuestros experimentos, de aumento de consumo (Experimentos 1, 2b y 2c) o de emisión de reacciones apetitivas (Experimento 2a). A nivel fisiológico, la característica psicológica de “saliencia” podría correlacionar con el desarrollo de fenotipos neuroanatómicos específicos que faciliten la recepción sensorial y transmisión del estímulo. Esto podría suponer que los parámetros de saliencia estimular en nuestras teorías (p.ej., Hall y Rodríguez, 2010; 2020; Mackintosh, 1975; Pearce y Hall, 1980; Rescorla y Wagner, 1972; Wagner, 1981) no estarían inicialmente sólo determinados por las características físicas de los estímulos sino que vendrían moduladas por las experiencias parentales/ancestrales que habrían hecho a estos estímulos más o menos salientes.

Abstract

In the present dissertation, we were searching for a novel inheritance of an acquired characteristics effects (IAC) arising from stimulus-specific parental learning of the stimulus. Experiment 1 was designed to explore the possible intergenerational transmission of a generalization effect of habituation to neophobia. The parameters used to generate such learning were not appropriate, but one of the control conditions, a group exposed to a single flavor, saccharin, resulted in the parental acquisition of a well-known phenotype of saccharin preference. Tests with offspring (who never interacted with their parents) showed evidence of possible inheritance of this acquired phenotype. Offspring of saccharin-exposed parents showed a higher consumption of a saccharin solution than offspring of non-saccharin-exposed parents (Experiment 1).

Given the novelty and potential relevance of these results, we designed three additional experiments (Experiments 2a, 2b, and 2c) to confirm the reliability of the effect and, in addition, to investigate some of its possible features. Experiment 2a revealed that offspring

of parents exposed to saccharin (10 or 20 days continuously) exhibited, at 13 days of age, more appetitive responses to saccharin than parents not exposed to any sweetener. In addition, when locomotor activity was measured during these tests, it was found that offspring of saccharin-exposed parents exhibited less locomotor activity during the infusion of saccharin and stevia, suggesting greater enjoyment when tasting the flavor of the solutions. Experiment 2c revealed that offspring of parents exposed to sweetener (saccharin or stevia) showed, at approximately 60 days of age, an increased preference for saccharin compared to offspring of parents not exposed to any flavored solution. Experiment 2b revealed that these effects of parental experience were not expressed when the offspring received the test at an age of approximately 30 days.

The design of our studies allows us to rule out with some confidence that the observed effects are due to social learning. The offspring in our experiments never interacted with their parents, who received the differential treatments tested. Moreover, in both studies, an interval of more than one week was added between the end of the treatments and the mating phase. In this way, it was avoided that the dams were exposed to any residue of the sweeteners used in the treatments (through urine or defecation of the males). Our results are also not attributable to differences in the weight and/or development of the animals. The different treatments never produced, in addition, differences in consumption in the water baselines always established before each test. Therefore, we believe that the most plausible explanation for the effects found is an effect of inheritance of acquired characteristics, specifically an inheritance of an increased preference for the sweet taste of sweeteners.

One possible explanation for our results is that repeated parental/ancestral experience with a stimulus increases its salience. An increased salience of the sweet taste would have resulted in an increased facility of this stimulus to activate the response mechanisms to which it is related and which give rise to the phenotypes known, and measured in our experiments, of increased consumption (Experiments 1, 2b and 2c) or emission of appetitive reactions (Experiment 2a). At the physiological level, the psychological feature of "salience" could correlate with the development of specific neuroanatomical phenotypes that facilitate sensory reception and transmission of the stimulus. This could imply that the parameters of salience stimulated in our theories (e.g., Hall & Rodriguez, 2010; 2020; Mackintosh, 1975; Pearce & Hall, 1980; Rescorla & Wagner, 1972; Wagner, 1981) would not initially be determined only by the physical characteristics of the stimuli but would be modulated by parental/ancestral experiences that would have made these stimuli more or less salient.

ÍNDICE

Índice de Contenido/ Table of Contents

CAPÍTULO 1:	1
<i>En defensa de un enfoque psicológico, centrado en el aprendizaje y desligado de la biología molecular, para el estudio de la Herencia de Caracteres Adquiridos.</i>	1
1. Introducción a la herencia de características adquiridas (HCA)	3
2. Las trampas en las que cayó la biología al estudiar la HCA.	6
2.1. <i>Primera trampa: estimar la verosimilitud de la HCA en función de su posible rol en la evolución.</i>	7
2.2. <i>Segunda trampa: desestimar la verosimilitud de la HCA apelando a su supuesto carácter teleológico.</i>	9
2.3. <i>La tercera trampa: estimar la verosimilitud de la HCA por el mecanismo molecular posibilitador.</i>	14
3. Antecedentes de una agenda de la psicología del aprendizaje sobre el estudio de la HCA.	20
4- Una agenda de investigación sobre la HCA desde un enfoque centrado en el aprendizaje y la conducta	29
OBJETIVOS	35
CAPÍTULO 2: TRABAJO EMPÍRICO	42
CHAPTER 2: EMPIRICAL WORK	42
1. Introduction.....	44
2. Experiment 1.....	49
2.1 <i>Method</i>	52
2.2 <i>Results and discussion</i>	56
2.3 <i>Discussion of Experiment 1</i>	65
3. Experiment 2.....	67
3.1 <i>Method</i>	69
3.2 <i>Results and discussion</i>	75
4. General Discussion	86
CAPÍTULO 3: CONCLUSIONES	91
REFERENCIAS	96

Índice de Figuras y Tablas/ Index of Figures and Tables

Capítulo 2. Trabajo Empírico. Chapter 2: Empirical Work.

Experiment 1

<i>Table 1.</i> Design of Experiment 1 _____	50
<i>Figure 1.</i> Experiment 1, Generation 1. Group mean consumption on preexposure _____	57
<i>Figure 2.</i> Experiment 1, Generation 1. Group mean consumption on test _____	58
<i>Figure 3.</i> Experiment 1, Generation 1. Mean body weights _____	60
<i>Figure 4.</i> Experiment 1, Generation 2. Group mean consumption on Test 1 _____	62
<i>Figure 5.</i> Experiment 1, Generation 2. Group mean consumption on Test 2 _____	63
<i>Figure 6.</i> Experiment 1, Generation 2. Group mean consumption on Test 2 by litter _____	64

Experiment 2

<i>Table 2.</i> Design of Experiment 2 _____	68
<i>Figure 7.</i> Experiment 2, Generation 1. Group mean consumption on preexposure _____	76
<i>Figure 8.</i> Experiment 2, Generation 1. Group mean consumption on test _____	77
<i>Figure 9.</i> Experiment 2, Generation 1. Group mean consumption on test by progenitors _____	77
<i>Figure 10.</i> Experiment 2, Generation 1. Mean body weights by progenitors _____	78
<i>Figure 11.</i> Experiment 2a, Generation 2. Group mean of the time of appetitive responses during TRT _____	81
<i>Figure 12.</i> Experiment 2a, Generation 2. Group means of the distances covered (in metres) at minutes 1 and 5 of the TRT _____	82
<i>Figure 13.</i> Experiments 2b and 2c, Generation 2. Group mean consumption on preference test _____	85
<i>Figure 14.</i> Experiments 2b and 2c, Generation 2. Group mean consumption on preference test by litter _____	86

CAPÍTULO 1:

En defensa de un enfoque psicológico, centrado en el aprendizaje y desligado de la biología molecular, para el estudio de la Herencia de Caracteres Adquiridos.

1. Introducción a la herencia de características adquiridas (HCA)

Desde una perspectiva cognitiva, el *aprendizaje* se considera una función que permite a los organismos adquirir y organizar información sobre el medio en el que viven y, además, utilizarla para regular su comportamiento. En principio, se asume que los efectos del aprendizaje considerados en esta definición se circunscriben a la vida de un individuo: es decir, el organismo que adquiere y almacena la información es el único que la utiliza. Pero puede que el impacto de estos efectos sea aún más amplio. Una idea conocida bajo el epígrafe de *herencia de caracteres adquiridos* (HCA) asume que los efectos del aprendizaje (o al menos, algunos de ellos) pueden trascender al individuo aprendiz, transmitiéndose a través de su línea germinal, de tal manera que su descendencia los exhibe de manera innata¹.

En realidad, la HCA es una idea bastante antigua, existiendo constancia de que ya fue discutida en la Grecia clásica por Anaximandro, Hipócrates y Aristóteles, entre otros (p.ej., Kočandrlje y Kleisner, 2013; Loenen, 1954; Trevisanato, 2016; Zirkle, 1935). Tras permanecer en el imaginario colectivo durante siglos, la discusión de la HCA se trasladó al mundo académico a comienzos del s.XIX, de la mano del naturalista francés Jean Baptiste Lamarck (1809), quien propuso que la HCA era el principal mecanismo responsable de la evolución de las formas de vida. A partir de ese momento, el estudio de la HCA inició un recorrido intrincado (p.ej., Elsdon-Baker, 2015; Gilbert, 2011; Jablonka, Lachmann y Lamb, 1992; Landman, 1991; Landman, 1993; Liu, 2011; Noble, 2020), desarrollándose principalmente desde un enfoque *biologicista* que ha mantenido dos objetivos fundamentales: clarificar la posible relación de la HCA con la evolución y desvelar los mecanismos moleculares que posibilitan este tipo de herencia. La idea principal que defendemos en este ensayo es que aunque este enfoque ha terminado dando sus frutos, como así lo atestigua el floreciente campo de la epigenética (p.ej., Chen, Yan y Duan, 2016; Grossniklaus, Kelly, Ferguson-Smith, Pembrey y Lindquist, 2013; Heard y Martienssen, 2014; Jablonka y Lamb, 2015; Loison, 2021; Smythies, Edelstein y Ramachandran, 2014; Wang, Liu y Sun, 2017; Wang y Allard, 2022), no puede dar cuenta por sí solo de los numerosos desafíos que la HCA nos plantea.

En la actualidad existen algunos modelos bien establecidos de HCA, principalmente, modelos de herencia epigenética (p.ej., Anastasiadi, Venney, Bernatchez y Wellenreuther, 2021; Aoued et al., 2020; Dias y Ressler, 2014; Franklin et al., 2010; Guerrero-Bosagna et al.,

¹ Nótese que el *aprendizaje observacional o social*, pese a ser un comprobado y potente mecanismo de transmisión fenotípica entre generaciones, no es un mecanismo de HCA. El aprendizaje social permite a los organismos aprendices *adquirir*, no *heredar*, el fenotipo conductual exhibido por otros individuos que, además, no tienen por qué ser necesariamente sus familiares.

2018; McCarthy et al., 2020; Moore, Kaletsky y Murphy, 2019; Nizhnikov, Popoola y Cameron, 2016; Van Steenwyk, Roszkowski, Manuella, Franklin y Mansuy, 2018; Zhu, Lee, Spencer, Biederman y Bhide, 2014). Gracias a ellos, disponemos de un conocimiento parcial, pero notable, sobre una amplia gama de mecanismos moleculares posibilitadores de este tipo de herencia (Cavagnari, 2012; Feil y Fraga, 2012; Fitz-James y Cavalli, 2022; Luo, Hajkova y Ecker, 2018; Schaukowitch y Kim, 2014). El desconocimiento relativo sobre este tipo de detalles microscópicos, complejos y escurridizos de la HCA es entendible y es esperable que, con el empuje de futuros avances tecnológicos, la biología molecular consiga finalmente desvelarlos. Pero teniendo en cuenta el inmenso número de fenotipos y especies conocidos, parece evidente que el conocimiento actual sobre fenotipos susceptibles de ser heredados a través de HCA es todavía muy escaso (Fitz-James y Cavalli, 2022; Lester et al., 2011; Riyahi, Abdoli, Haghparast y Petrosini, 2019). Este desconocimiento es realmente llamativo porque hace décadas que se cuenta con los medios procedimentales y metodológicos adecuados para identificar posibles fenómenos de HCA. De manera importante, el planteamiento de una investigación dirigida a este objetivo no requiere desarrollarse dentro de una agenda de investigación biologicista sobre la HCA: descubrir fenotipos conductuales heredables a través de HCA no requiere tomar en cuenta ni las posibles implicaciones evolutivas ni tampoco los posibles mecanismos moleculares envueltos. Para cumplir con este objetivo, “basta” con diseñar adecuadamente los experimentos conductuales de tal manera que se pueda: 1) identificar las condiciones en las cuales un organismo adquiere y expresa un fenotipo conductual y/o morfológico, 2) estimar la presencia de ese fenotipo en una progenie no directamente expuesta a esas condiciones, y 3) comprobar que, fiablemente, la aparición de dicho fenotipo en la progenie no se trata de un caso de aprendizaje ontogenético generado en la interacción social padres-hijos. Diversas áreas, como la Zoología y la Psicología, disponen hace décadas de recursos procedimentales y metodológicos adecuados para poner este tipo de estudios en marcha. En este trabajo, nos preguntamos por qué una de estas áreas, la *psicología del aprendizaje*, no cobró un mayor protagonismo en la identificación de un tipo concreto de fenotipos susceptibles de ser heredados a través de HCA: los fenotipos conductuales aprendidos.

En respuesta a esta pregunta, argumentaremos que, históricamente, la psicología del aprendizaje ha tendido a no preocuparse de la HCA por dos razones principales. Por una parte, por la creencia de que la HCA es un fenómeno subversivo y escasamente fiable (Liu, 2020; Loison, 2018; Noble, 2020; Smythies, Edelstein y Ramachandran, 2014; Wang y Allard, 2022). Y, por otra parte, más recientemente, por la creencia de que se trata de un fenómeno que

atañe principalmente a la biología. Estas creencias erróneas se cimentaron en los efectos de dos aproximaciones fallidas a la pregunta *¿existe la HCA?* La primera aproximación es la que se realizó desde el enfoque biologicista durante el s.XIX y buena parte del s.XX. En distintas etapas de ese período, la biología rechazó la existencia de la HCA apoyándose, sobre todo, en argumentos lógicos que resultaron incompletos y/o falaces. En el apartado 2, *Las trampas en las que cayó la Biología al estudiar la HCA*, mostraremos que esta actitud se derivó de tres hilos argumentales que, en nuestra opinión, retrasaron (y retrasan) la búsqueda directa de demostraciones de HCA. La verosimilitud de la HCA se desestimó erróneamente a partir de consideraciones sobre: 1) su posible rol en la evolución, 2) su posible carácter teleológico y 3) el desconocimiento (o conocimiento parcial) de sus mecanismos moleculares posibilitadores. La influencia de esta actitud ha dejado una huella negativa y profunda en el estudio y el crédito de la HCA, aliviada en las últimas décadas por el surgimiento de campos de conocimiento dentro de la Biología como la Epigenética. Actualmente, la HCA es un fenómeno científicamente reinsertado: se reconoce que fue prejuizado injustamente, pero sus demostraciones siguen despertando suspicacias y controversias (Crews y Gore, 2014; Guerrero-Bosagna, 2016; Heard y Martienssen, 2014; Nagy y Turecki, 2015; Horsthemke, 2018). Parece que el mismo enfoque biologicista que anatematizó a este tipo de herencia es el que finalmente la ha indultado.

La segunda aproximación histórica fallida a la pregunta *¿existe la HCA?* fue la que realizó un enfoque psicológico muy similar al que aquí defenderemos, centrado en el aprendizaje y la conducta. A principios del s.XX, un grupo de psicólogos y científicos relacionados con el área del Aprendizaje (Pavlov, Thorndike, McDougall...) comenzaron una agenda de investigación interesante sobre la HCA (p.ej., McDougall, 1927, 1930a, 1938; Pavlov, 1923, pp. 360-361; Rhine y McDougall, 1933; Studentsov, 1924). Esta agenda fue abandonada prematuramente por diversas razones. Por una parte, por el desánimo procedente de factores externos: este enfoque no era impermeable ni al rechazo tajante al fenómeno mostrado desde el enfoque biologicista, ni a los factores socio-políticos que intensificaron la anatematización de la HCA (Gilbert, 2011; Lamb, 2011; Riskin, 2020; Suvorov y Andreeva, 1991). Pero también hubo una razón interna evidente: los experimentos realizados no obtuvieron efectos robustos y consistentes, algo que acrecentó las dudas sobre el fenómeno. Por si esto no fuera poco, alrededor del estudio de la HCA surgieron algunos escándalos de posibles falsificaciones de pruebas (p.ej., Kammerer, 1906; 1909; 1924) lo que restó aún más el crédito de cualquier interés académico sobre el tema (para una revisión de esta controversia, véase, Bateson, 1919; Cock y Forsdyke, 2022; Gliboff, 2002; Van Alphen y Arntzen, 2016; Vargas, 2009; Vargas,

Krabichler y Guerrero-Bosagna, 2017). En el apartado 3, *Antecedentes de una agenda experimental de investigación sobre la HCA desplegada desde la psicología del aprendizaje*, analizaremos las fortalezas y defectos de estos experimentos pioneros y apuntaremos algunas explicaciones posibles a la falta de fiabilidad de aquellos procedimientos. Destacaremos que, pese a sus imperfecciones, lo que hizo realmente interesante a esta efímera agenda de investigación fue su carácter experimental, algo que la diferenciaba del enfoque biologicista de la época, tendiente todavía a apelar a ciertos dogmas a la hora de discutir sobre la existencia de la HCA. Expondremos que otro valor de aquel enfoque alternativo era que aportaba una visión que contemplaba la HCA como un fenómeno interesante por sí mismo (no relevante por su relación con la evolución), caracterizado como un efecto extensivo del aprendizaje.

Finalmente, en el apartado 4, *Propuestas para una agenda actual de investigación sobre la HCA centrada en el aprendizaje y la conducta*, argumentaremos la necesidad de retomar y fortalecer una agenda similar a la de aquellos psicólogos pioneros. Defenderemos la idea de que la HCA a ojos de un psicólogo del aprendizaje no es exactamente igual a la HCA a ojos de un biólogo, y que disponer de esta potencial riqueza de puntos de vista es necesario para abordar un mejor entendimiento del fenómeno. Los objetivos del enfoque psicológico alternativo que defenderemos son complementarios respecto a los objetivos trazados desde la biología. En concreto, proponemos una agenda que persiga mejorar nuestro conocimiento sobre tres aspectos de la HCA que incumben a la psicología del aprendizaje: acelerar el descubrimiento de fenotipos conductuales heredables a través de HCA, desvelar qué tipos de aprendizaje dan lugar a la adquisición de estos fenotipos heredables y cuáles no (si alguno), y reconsiderar el posible alcance intergeneracional de los contenidos aprendidos y los mecanismos que los generan, algo que las actuales teorías de aprendizaje no tienen en cuenta.

2. Las trampas en las que cayó la biología al estudiar la HCA.

En los siguientes dos apartados vamos a intentar analizar por qué todavía son tan relativamente escasos los ejemplos de HCA conocidos, y por qué no existe una agenda de investigación más intensa que se plantee como objetivo paliar este vacío de conocimiento. Para responder a estas cuestiones debemos mirar al pasado y entender cómo la comunidad científica se planteó tradicionalmente la pregunta fundamental *¿la HCA existe?* Al fin y al cabo, la búsqueda de ejemplos de HCA no es más que la enunciación de esta pregunta fundamental repetidas veces bajo diferentes condiciones: *¿la HCA existe bajo las condiciones 1, 2, 3...?*

En este primer apartado veremos que un análisis histórico indica que la Biología tendió a esquivar el abordaje directo de la cuestión *¿existe la HCA?* En su lugar, intentó responder a la

pregunta de manera indirecta, a través de razonamientos indirectos que apelaban a tres aspectos relacionados con la HCA: su posible relación con la evolución, su supuesto carácter teleológico y sus mecanismos moleculares posibilitadores. A efectos prácticos de avance en el conocimiento sobre la HCA, el resultado de esta estrategia fue desastroso. La discusión sobre estos tres temas (evolución, teleología y mecanismos moleculares) entrampó el avance en el conocimiento sobre la HCA y terminó contribuyendo a convertir a la HCA en un fenómeno bajo sospecha. Analizaremos cada uno de estos temas por separado y constataremos que la investigación actual sobre HCA no es ajena a las problemáticas que surgen alrededor de ellos.

2.1. Primera trampa: estimar la verosimilitud de la HCA en función de su posible rol en la evolución.

A lo largo de la historia, sobre todo en el siglo XIX y buena parte del s. XX, se observa una tendencia a discutir la existencia de la HCA atendiendo, no a pruebas empíricas, sino al posible encaje de este tipo de herencia en los modelos teóricos sobre evolución más aceptados en cada época (Gilbert, 2011; Lamb, 2011; Liu, 2011; Steele, 1981). Esto denota que a la biología le costó entrar a abordar la cuestión *¿existe la HCA?* de manera directa y, en su lugar, prefirió un cuestionamiento del tipo *¿puede existir la HCA teniendo en cuenta que podría tener un efecto sobre la evolución?* Al tomar el binomio HCA-evolución como objeto de estudio, la Biología (sobre todo la Biología evolutiva), quizás impensadamente, tendió a restarle relevancia intrínseca a la HCA, generándose así pocos intentos directos de probar experimentalmente el fenómeno. A esta escasa proliferación de estudios experimentales seguramente también influyó la tradición naturalista imperante en la Biología de aquella época, más orientada al método observacional que al experimental (Hagen, 1999; Mayr, 1961; Wade y Kalisz, 1990).

El resultado de esta situación es bien conocido (Elsdon-Baker, 2015; Gilbert, 2011; Landman, 1993; Nahm, 2021; Vargas, 2009): la investigación sobre la HCA fue injustamente estigmatizada durante décadas. Tanto los *fijacionistas* contemporáneos de Lamarck (Cuvier, 1810, 1831; Pasquier, 1832) como los *neodarwinistas* (Fisher, 1932; Weismann, 1885, 1889, 1904) y genetistas de la Síntesis Evolutiva Moderna del s.XX (Dobzhansky, 1937; Fisher, 1932; Haldane, 1932; Mayr, 1942; Simpson, 1944; Wright, 1931), todos, anatematizaron este tipo de herencia por algún aspecto relacionado con la evolución. Los fijacionistas como Cuvier (1810, 1831) rechazaban la existencia de la HCA porque esta hacía lógicamente posible la evolución propuesta por Lamarck (1809). Por su parte, el neodarwinismo (y su posterior elaboración de la Síntesis Evolutiva Moderna) rechazó fieramente la HCA porque, bajo ciertas

consideraciones, su existencia hacía lógicamente posible una evolución *con propósito*, incompatible con la evolución *ex post facto* que emanaba de la consideración del mecanismo de selección natural (Mayr, 1961, 1974).

Más recientemente, cuando el interés por la HCA ha resurgido de la mano de la epigenética, con frecuencia, la relevancia y verosimilitud del fenómeno han vuelto a ser reclamados apelando a su posible papel en la evolución (Gissis y Jablonka, 2011; Jablonka y Lamb, 2008). Por ejemplo, no es infrecuente encontrar argumentaciones en las que se hace notar que, pese al mayor o menor mérito de las nuevas y crecientes demostraciones de herencia epigenética, su valor es cuestionable al no haberse contrastado aún su implicación en los procesos evolutivos (p.ej., Horsthemke, 2018; Sarkies, 2020, p. 113). Este tipo de actitud indica que, todavía a día de hoy, desde diversas áreas de la Biología, la HCA se sigue considerando un fenómeno menor o secundario, cuyo interés queda supeditado a su posible influencia sobre la evolución.

En definitiva, creemos que cuando el enfoque biologicista se planteó el estudio de la HCA no tomó de partida un interés genuino por este tipo de herencia, sino más bien por el binomio HCA-evolución. Adoptar este objeto dual de estudio, le ayudó a la biología a plantearse preguntas interesantes que se extienden hasta nuestros días. El debate sobre la relación HCA-evolución es hoy más interesante que nunca. Por ejemplo, no sólo se discute el posible valor evolutivo de la HCA en cuanto a la aparición de cambios estables y duraderos en las especies. También se considera la posibilidad de que este tipo de herencia dote a los organismos de una capacidad plástica que les permita ajustar rápidamente sus fenotipos a ciertos parámetros cambiantes (y quizás pendulares) del ambiente (Schmid et al., 2018; Skinner y Nilsson, 2021). Aceptar el interés de estas cuestiones no menoscaba la constatación del efecto negativo que tuvo (y puede seguir teniendo) anteponer la consideración del binomio HCA-evolución a la búsqueda de pruebas directas de diferentes formas de HCA. La HCA es un fenómeno interesante en sí mismo y, dentro de su complejidad, sus posibles efectos sobre la evolución son una importante implicación meritoria de estudio. La historia nos indica, no obstante, que la investigación sobre estos efectos no puede nunca sustituir la investigación sobre el aspecto más básico del fenómeno que, todavía a día de hoy, desconocemos parcialmente: *¿bajo qué condiciones se da la HCA?* Para paliar el retraso en el conocimiento sobre esta cuestión que arrastramos hace décadas, defenderemos el fortalecimiento de una agenda de investigación, desligada a efectos prácticos de la agenda biologicista, y centrada en la HCA como un fenómeno meramente conductual. Si se consigue que esta agenda prospere y

se amplía nuestro conocimiento sobre el aspecto más fundamental de la HCA (la variedad de formas de HCA existentes), nos encontraremos en mejor disposición para responder a cualquier otra cuestión planteada sobre el fenómeno, incluyendo sus implicaciones evolutivas.

2.2. Segunda trampa: desestimar la verosimilitud de la HCA apelando a su supuesto carácter teleológico.

Otra trampa en la que cayó la biología fue rechazar la existencia de la HCA por su supuesto carácter teleológico. En realidad, esta problemática constituye un segundo nivel de complicación dentro de la primera trampa que acabamos de explicar: históricamente, el problema no fue que la HCA pudiese requerir una explicación teleológica sino que ésta pudiese llegar a “manchar” de intencionalidad la evolución. Para entender bien esta problemática necesitamos responder a dos preguntas: ¿qué inconveniente hay en las explicaciones teleológicas? y ¿en qué aspectos de la HCA se ha percibido teleología?

El prefijo *telos* significa meta o fin, y la *teleología* puede definirse como una estrategia para explicar un objeto de estudio apelando a su finalidad en lugar de a sus causas mecánicas. Así, podemos diferenciar entre *teleología externa* e *interna*: si en la explicación de nuestro objeto de estudio apelamos a la intención de un agente externo (por ejemplo, una entidad divina) estaremos recurriendo a una *teleología externa*, pero si la finalidad surge del propio objeto hablaremos de *teleología interna*. ¿Qué inconvenientes encuentra la ciencia en las explicaciones teleológicas? Para responder a esta cuestión debemos remontarnos a lo que ocurrió hace unos cuantos siglos.

La Revolución Científica trajo consigo la expulsión de las explicaciones teleológicas de la Física, sobre todo las explicaciones *teológicas* que, al invocar a Dios o algún tipo de diseñador, aludían a fuerzas metafísicas o sobrenaturales científicamente espurias. El pensamiento humano (Galileo, Newton...) se demostró a sí mismo que era capaz de alcanzar explicaciones alternativas más satisfactorias aludiendo sólo a factores naturales sin ningún tipo de propósito. Quedaba, no obstante, por comprobar si esa epistemología de las ciencias físicas se podía trasladar a las ciencias de la vida. El trasvase se realizaba con cierta facilidad si se contemplaba a los seres vivos como elementos pasivos dominados por fuerzas naturales externas, pero los problemas aparecían si se les otorgaba una intencionalidad o papel más activo. La propuesta teórica de Lamarck (1809) es un buen ejemplo de cómo este tipo de problemas epistemológicos surgían al considerar este papel “activo” en los organismos. De hecho, buena parte de la mala fama que se ha granjeado la HCA en relación con su carácter teleológico surge a raíz de esta propuesta.

Una primera idea que hay que tener en cuenta al considerar la propuesta de Lamarck sobre la HCA es que su existencia no fue presentada como una hipótesis aislada. Lamarck propuso un amplísimo y ambicioso marco teórico en el que intentaba explicar, nada más y nada menos, que el surgimiento y evolución de todas las formas de vida. No en vano, fue Lamarck quien acuñó el término Biología (*Biologie*) para referirse a lo que él entendía que debía de ser el campo de conocimiento dedicado a este objeto de estudio tan amplio (Lamarck, 1802a, 1802b). En este marco, Lamarck caracterizó la vida como el resultado de la interacción de dos fuerzas: el *impulso de vida (elan vital)* y la *influencia de las circunstancias*.

Según Lamarck, el impulso de vida estaría presente en todas las formas de vida y conllevaría una propensión de la naturaleza hacia el cambio y el perfeccionamiento: el *elan vital* habría ido dando lugar a la aparición de formas de vida cada vez más complejas y mejor adaptadas. La ausencia de un ordenamiento perfecto de las especies de menor a mayor complejidad parecería refutar la existencia de este tipo de fuerza directiva. Pero Lamarck explicaba la horizontalidad en las ramas del árbol de la vida apelando a la interacción del impulso de vida con otra fuerza adicional: la *influencia de las circunstancias*. Esta segunda fuerza se generaría a partir de la ocurrencia de cambios en las condiciones ambientales que, a su vez, supondrían la aparición de nuevas necesidades en los organismos (necesidad de alimento, de sexo, de bienestar general y de evitación del dolor, Lamarck, 1809; p.352). Los organismos se enfrentarían a los desafíos resultantes de estas necesidades a través de la emisión de nuevos comportamientos o hábitos. Cuando estos nuevos hábitos implicasen de forma prolongada la utilización de un órgano o, por el contrario, la disminución de su uso, el órgano se vería alterado: el uso del órgano lo fortificaría (impulsaría su desarrollo) y su desuso produciría el efecto contrario. Críticamente, estos cambios adquiridos por los padres a través del uso/desuso podrían ser heredados por su progenie, dando lugar a un tipo de herencia a la que Spencer (1864) y Bain (1873) empezaron a referirse años más tarde como *herencia de modificaciones adquiridas*, lo que a la postre dio lugar al uso más frecuente del término HCA.

En las dos fuerzas propuestas por Lamarck se aprecian cargas teleológicas, pero con características distintas y, sobre todo, con implicaciones diferentes a la hora de comprometer la posible científicidad de la idea de HCA. Sobre la idea del impulso de vida, Lamarck recurrió a este concepto “vital” con la intención de dar una explicación radicalmente natural al origen de la vida (p.ej., Burkhardt, 2013; Riskin, 2021). Pretendía evitar la teleología externa presente en las explicaciones teológicas creacionistas pero, como su planteamiento fue tan vago, consiguió justo lo contrario. El impulso de vida se percibió por muchos intelectuales de la época como

una fuerza sobrenatural acientífica cargada de teleología. La crítica era razonable: Lamarck definió el impulso de vida por su finalidad o *telos* (el perfeccionamiento de las formas de vida) y no por sus causas, algo que evocaba un claro paralelismo con las explicaciones teológicas en las que se apelaba a un plan divino. Aunque planteamientos posteriores, como la teoría de la pangénesis de Darwin (1868), demostraron que el concepto de la HCA era independiente del concepto del impulso de vida, el descrédito de éste se extendió a toda la propuesta de Lamarck como un efecto halo.

Independientemente de los problemas asociados a la idea del impulso de vida, la *influencia de las circunstancias* conllevaba otras implicaciones problemáticas, algunas epistemológicas pero otras de índole socio-político. Todas contribuyeron al rechazo y descrédito de la hipótesis sobre la HCA. Si, como sugería Lamarck, el comportamiento de los seres vivos está regido por sus propósitos y este comportamiento conlleva una forma de herencia capaz de influir en la evolución, los seres vivos influirían en su propia evolución. Esta idea cargada de intencionalidad generó un gran rechazo hacia la HCA desde distintos sectores socio-políticos y en distintos momentos de la historia (Cuvier, 1831; Weismann, 1885; Mayr, 1982). Aunque Lamarck nunca enfatizó estas posibles implicaciones de la HCA, la élite intelectual de su época (alineada con las esferas de poder), vieron una promesa de cambio y progreso social en esta forma de herencia. Si la HCA era real, el hombre no sólo podía hacerse a sí mismo sino también a su descendencia, una idea que fue rotundamente rechazada por aquellos a los que, desde distintos puntos de vista, les inquietaba un horizonte de cambio. Desde un enfoque científico-intelectual, el problema no se trató abiertamente en términos socio-políticos pero sí se consideró en términos epistemológicos: no se podía aceptar la existencia de la HCA porque su supuesta intencionalidad no se ajustaba a la epistemología que se trataba de importar desde la Física. Este argumento recibió el respaldo crucial del mecanismo de *selección natural* propuesto por Darwin y Wallace (1859). Se trataba de un mecanismo que ofrecía una explicación satisfactoria de la evolución a través del papel no intencional del ambiente en la supervivencia de los seres vivos. Esta capacidad explicativa se interpretó como prueba de que una epistemología desprovista de teleología podía exportarse a las ciencias de la vida: la selección natural era causa necesaria y suficiente para la evolución. Esta argumentación fue abrazada por el neodarwinismo y la Síntesis Evolutiva Moderna del s.XX y fue percibida como la expulsión triunfal de la teleología de la Biología (Mayr, 1991). La HCA ya no era rechazada simplemente por su supuesto carácter teleológico: se rechazaba porque existía una explicación alternativa no teleológica con una gran capacidad explicativa.

En este rechazo hacia la HCA podemos identificar diversos sesgos y/o razonamientos parciales. Por un lado, claramente se observa una caída en la primera trampa que describíamos en el apartado anterior: parece que la existencia de la HCA sólo se consideraba posible en la medida en la que se requería que tuviese un papel explicativo en la evolución. Cuando se contó con la aparente suficiencia explicativa de la selección natural a este respecto, muy pocos investigadores encontraron otras razones para insistir en la búsqueda de pruebas empíricas de la HCA.

Por otro lado, cuando se perciben aspectos teleológicos en la HCA, se observan dos errores conceptuales relacionados con un posible abordaje superficial del concepto de *aprendizaje*. El primero viene heredado directamente de la visión lamarckiana de la HCA y fue dar por sentado que todas las conductas (usos/desusos) envueltas en la HCA debían ser voluntarias o intencionadas. Existen, no obstante, formas de aprendizaje automático e involuntario, como la *habituación* (Thompson y Spencer, 1966; Thompson, 2009) y el *condicionamiento clásico* (Dickinson y Mackintosh, 1978; Pavlov, 1927/1960). Incluso, el *condicionamiento operante*, que se puede equiparar conceptualmente más con el concepto lamarckiano de uso/desuso, termina dando lugar a la automatización de conductas y, por tanto, a un procesamiento no necesariamente voluntario. El anclaje en la visión lamarckiana del uso/desuso llevó a suponer erróneamente la universalidad del carácter intencional (y teleológico) de los mecanismos de adquisición envueltos en la HCA. Las consecuencias de este sesgo se extienden hasta la actualidad, siendo una cuestión por dilucidar todavía si todas las formas de aprendizaje generan caracteres adquiridos susceptibles de ser heredados a través de HCA. Más adelante defenderemos la idea de que ha de ser una agenda de investigación desplegada desde la psicología del aprendizaje la que aborde esta cuestión.

Un segundo error conceptual relacionado con el aprendizaje, que tuvo lugar en aquel escenario, fue obviar que el rechazo de la HCA no resolvía el problema sobre la intencionalidad de algunas conductas de los organismos vivos. La selección natural había conseguido expulsar una forma de teleología externa (la teología) de las ciencias de la vida. Pero su objeto de estudio, los seres vivos, parecía estar inevitablemente vinculado a un tipo de teleología interna. Fijémonos en que cuando la Física trata de explicar el comportamiento de un planeta o de una piedra deslizándose por una pendiente es relativamente fácil no aludir a ningún tipo de propósito interno. No parece razonable ni intuitivo pensar que un planeta o una piedra rodante se muevan porque persiguen algún fin con ese movimiento. Sin embargo, el comportamiento de los seres vivos, al menos una parte de él, al que denominamos

comportamiento operante, sí está abierto a ese tipo de explicación intencional (Dickinson, 1985, 1989; Dickinson y Balleine, 2000; Heyes y Dickinson, 1990): ¿por qué persigue una leona a una liebre? *Porque quiere, tiene la intención de*, comérsela. Epistemológicamente, se suele considerar que el principal problema de las explicaciones teleológicas es que vulneran el *principio de causalidad* (es decir, la idea de que las causas anteceden a las consecuencias), pero esta crítica no es aplicable al caso de la teleología interna a la que aquí nos referimos. De acuerdo con los planteamientos cognitivos actuales de la motivación y el aprendizaje (de Wit y Dickinson, 2009; Dickinson y Balleine, 1994, 2002), la meta (el *telos*) es un posible estado futuro. La anticipación de ese estado (comerse a la liebre), y su vinculación con formas posibles de comportamiento que aumenten la probabilidad de obtenerlo (perseguir y cazar a la liebre), es posible gracias al *aprendizaje asociativo* (de Wit y Dickinson, 2009; Dickinson, 2012). En este caso, el procesamiento de la meta antecede al comportamiento dirigido a obtenerla y, por tanto, es totalmente compatible con el principio de causalidad: la causa de la conducta es el procesamiento de un estado potencial futuro. Pittendrigh (1958) y Mayr (1961) se refirieron a este tipo de teleología interna con el término *teleonomía*, aceptando su validez científica dentro las ciencias de la vida.

En resumen, por tanto, la HCA fue anatematizada durante décadas por una supuesta falta de científicidad y plausibilidad debido a su posible carácter teleológico. Lo que le concede el atributo de *teleológica* a la HCA es la posible intencionalidad de los mecanismos de aprendizaje y/o conducta que subyacen en este tipo de herencia. Hemos visto, sin embargo, que existen mecanismos de aprendizaje automáticos e involuntarios que hacen posible formas de HCA basadas claramente en mecanismos no teleológicos. Y, por otra parte, hemos visto que la teleología interna presente en el condicionamiento operante no es epistemológicamente preocupante, al no violar el principio de causalidad. Por lo tanto, parece claro que rechazar la existencia de la HCA, y/o desacreditar su estudio, basándose en argumentos centrados en el carácter teleológico de este tipo de herencia fue un craso error. Aunque este error parezca superado, algo relevante que nos enseña es que el enfoque biologicista se ha visto muy desacompañado en su recorrido por el estudio de la HCA. Posiblemente, una agenda sobre la HCA centrada en el aprendizaje hubiese ofrecido una visión complementaria útil para afrontar algunos de los problemas epistemológicos planteados por la relación entre este tipo de herencia y el aprendizaje. Los problemas del pasado los vemos hoy con claridad. Pero puede que todavía no alcancemos a ver algunos problemas presentes en los enfoques actuales. La idea que defendemos en este ensayo es que si la investigación de la HCA se desarrolla desde

diferentes enfoques complementarios, estas problemáticas se detectarán y superarán con mayor facilidad y solvencia.

2.3. La tercera trampa: estimar la verosimilitud de la HCA por el mecanismo molecular posibilitador.

Durante el s.XIX y buena parte del s.XX, la existencia de la HCA, y la importancia de su estudio, se rechazaron erróneamente al desconocerse y juzgarse inverosímiles, sus mecanismos moleculares posibilitadores (p.ej., Camacho, 2020; Crick, 1958; 1970; Dawkins, 1970; Smith, 1993; Weismann, 1893). El problema se originó cuando la biología (o, al menos, una parte influyente de ese campo) tomó como equivalentes dos cuestiones relacionadas pero diferentes: se intentó responder a la pregunta *¿existe la HCA?* con las respuestas provisionales que se disponía para la pregunta *¿existe un mecanismo molecular que posibilite la HCA?* Esta estrategia fue abordada principalmente por los neodarwinistas como Weismann (1888, 1893) y cristalizó en décadas posteriores al ser aceptada por los genetistas de la Síntesis Evolutiva Moderna. Intentemos entender cómo y por qué.

Nos encontramos a finales del s.XIX, unos años en los que aún no se había redescubierto las contribuciones de Mendel (1866; Druery y Bateson, 1901) sobre la herencia ni tampoco se conocía todavía el concepto de gen propuesto por Johannsen (1909) o la presencia de material genético heredable en el ADN (Avery, Macleod y McCarty, 1944; Hershey y Chase, 1952; Watson y Crick, 1953). La biología todavía no disponía del desarrollo tecnológico suficiente para observar con suficiente nitidez el nivel molecular donde tienen lugar los mecanismos posibilitadores de la herencia. Esto no impedía, no obstante, que se recurriese a la *estrategia de caja negra* para intentar abstraer las características funcionales de dichos mecanismos. Ejemplo de ello es el ejercicio que realizó Darwin (1868) en su *teoría de la pangénesis*, esbozando un mecanismo hereditario que posibilitaba la HCA (y que la hacía compatible con la selección natural). En este mecanismo, cada parte del cuerpo sería capaz de emitir pequeñas partículas orgánicas llamadas *gémulas*, o *pangenes*. Estas partículas actuarían como representaciones minúsculas de cada componente corporal normal o alterado. Cuando los efectos ambientales modificaban las características o rasgos del individuo (sus fenotipos), la parte del cuerpo relacionada con dicho cambio emitiría unas gémulas modificadas que contendrían la información del cambio producido. Las gémulas circularían por todo el organismo y podrían entrar en las gónadas y aportar su información a los gametos. De esta manera, la información de las gémulas modificadas por el uso/desuso se convertiría en material heredable y podría transferirse a la descendencia. Esta propuesta fue una audaz

aproximación funcional a algunos mecanismos moleculares que han sido posteriormente demostrados gracias al desarrollo de la tecnología. Así, algunos autores actuales han reconocido en la noción de *gémula* el papel de diversos portadores de información no genética, como el ADN libre de células circulantes, los ARN móviles (en particular los ARN pequeños), los priones y las vesículas extracelulares (Bonner y Willms, 2021; Liu 2008; Liu y Li, 2016; Nejabati et al., 2021; Noble, 2018; Wolf, Ferguson-Smith y Lorenz, 2022).

Fijémonos en que la aproximación de Darwin sigue un *enfoque de fuera adentro* en el estudio de la HCA. Es decir, se parte del “fuera”, de la posible existencia de un fenómeno macroscópico y observable: por ejemplo, las diversas observaciones que el naturalista inglés interpretaba como pruebas de HCA y que mostraba en su obra *La variación de animales y plantas domesticados* (Darwin, 1868). Estos ejemplos macroscópicos del fenómeno recibían atención porque se consideraban interesantes en sí mismos. Además, abrían diversas cuestiones relacionadas: desde sus posibles implicaciones evolutivas hasta los mecanismos posibilitadores. El abordaje de esta última cuestión, la naturaleza de los mecanismos posibilitadores, requiere ir “adentro” del organismo e indagar en el nivel microscópico. Pero fijémonos en que la dirección del trayecto, *de fuera adentro*, nos está indicando el orden de prioridades del investigador, al menos un orden inicial. Lo importante se encuentra en el nivel macroscópico y, de hecho, lo que se busca en el nivel microscópico sólo tiene valor si está relacionado causalmente con el fenómeno macroscópico que se intenta explicar. Por ejemplo, lo que le concedía importancia al concepto de *gémula* (o al elemento microscópico del mecanismo molecular correspondiente) es que pudiese ser responsable de la transmisión fenotípica que caracteriza a la HCA.

A partir de la propuesta de Darwin (1868), se observa un cambio progresivo en el estudio de la HCA: la discusión sobre el fenómeno va a pasar gradualmente de un *enfoque de fuera adentro* a un *enfoque de dentro a fuera*. El primer gran paso en este sentido lo dio Weismann (1885) al trasladar la discusión sobre la existencia del fenómeno de la HCA al “dentro”, es decir, al mecanismo microscópico posibilitador. Weismann rechazaba el mecanismo de gémulas propuesto por Darwin (1868) y, en consecuencia, hizo una propuesta propia, la *teoría de la continuidad del plasma germinal* (Weismann, 1893), en la que el mecanismo hereditario supuesto imposibilitaba la HCA. Según este mecanismo, sólo las células germinales contendrían información heredable y éstas se encontrarían aisladas de los efectos de las células somáticas que sí podrían verse alteradas por la interacción con el medio. A esta idea de aislamiento de las células germinales respecto a la influencia del ambiente se le

conoció años más tarde bajo el concepto de *barrera somato-germinal*, o *barrera de Weismann* (Mayr, 1982; 1985; Riskin, 2020). En teoría, Weismann (1893) habría llegado a este concepto a partir de un *enfoque de fuera adentro*, es decir, haciendo inferencias sobre la estructura posibilitadora microscópica a partir de unas observaciones macroscópicas iniciales. En concreto, Weismann supuestamente basó su propuesta teórica en el hallazgo de que la mutilación de la cola en ratones no resultaba en un caso de HCA (Churchill 2015; Normandin y Wolfe 2013, p 282; Weismann, 1889). Al caracterizar un mecanismo hereditario general a partir de estos resultados nulos tan particulares, Weismann hizo un ejercicio desproporcionado de los principios de parsimonia y universalidad (p.ej., Ongay, 2019). Asumió que la HCA no era posible en ningún caso y trasladó el argumento principal para la inexistencia de este tipo de herencia a las características teóricas del mecanismo hereditario que había propuesto. A partir de ese momento, el enfoque de dentro afuera empezó a dominar en la lógica de las discusiones sobre la HCA: este tipo de herencia no era posible porque “existía” la barrera de Weismann. El problema era que dicha barrera no era “real”, simplemente era una característica funcional asumida (erróneamente), primero por Weismann y, después, por los integrantes de la Síntesis Evolutiva Moderna. La aceptación de esta idea tuvo un efecto demoledor sobre la investigación sobre la HCA: la creencia en un supuesto aspecto del funcionamiento interno (dentro) disminuyó notablemente el interés (y el respeto) por descubrir (fuera) posibles fenómenos macroscópicos de HCA.

La fé en el concepto de barrera de Weismann (y en la imposible existencia de la HCA) se fortaleció considerablemente en los años siguientes. Un avance conceptual fundamental que vivió la Biología en aquellos años fue la propuesta del concepto de *gen* y de la diferenciación *genotipo/fenotipo* (Johannsen, 1909). De manera importante, Johannsen propuso una definición *funcional* de gen, similar a la contemplada por Mendel (1866). Desde esta perspectiva, se consideraba que un gen era cualquier tipo de elemento susceptible de transmitir información fenotípica heredable. El problema es que cuando el desarrollo tecnológico permitió el descubrimiento del ADN, la Biología molecular identificó el concepto de gen con segmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN) (Kohl, Crampin, Quinn y Noble, 2010; Noble, 2018). En ese salto conceptual se restringió por completo, sin demasiada justificación, la ubicación y naturaleza de la información heredable sólo al ADN.

En este contexto, además, se produjo otro descubrimiento trascendente: Crick (1958; 1970; Watson, 1965) propuso el denominado *Dogma Central* de la Biología molecular. En este principio se intentaba definir el flujo de información en las células a través del cual se generan

los caracteres de los fenotipos. Se descubrió que el ADN contiene instrucciones para replicarse a sí mismo y para generar el ARN (ácido ribonucleico) a través de un proceso conocido como *transcripción* (Jacob y Monod, 1961; Latchman, 1997). También se descubrió que el ARN contiene la información necesaria para sintetizar proteínas (que son la *mano de obra* de las células para generar los fenotipos) a través del proceso denominado *traducción*. En su versión original más simple (Crick, 1958; 1970; Watson, 1965), el Dogma consistía en la afirmación de que el flujo de información ADN->ARN->proteínas no era reversible. Es decir, el ARN o las proteínas no podrían modificar el ADN. Este dogma, unido tanto a la creencia de que la información heredable sólo se encontraba en el ADN como al concepto de barrera de Weismann, fortaleció una imposibilidad conceptual de la HCA: los genes del ADN estaban en una especie de *búnker* y de ninguna manera podían verse alterados por los efectos de la interacción del organismo con el ambiente, por sus aprendizajes etc. A lo sumo, se contemplaba la posibilidad de algunos efectos directos del ambiente sobre el ADN. Por ejemplo, se aceptaba la posible existencia de mutaciones en la línea germinal como resultado de la exposición a estímulos tóxicos, como altas dosis de radiación ionizante (Adewoye, Lindsay, Dubrova y Hurles, 2015; Frankenberg-Schwager, 1990). Pero los efectos considerados como resultado del uso/desuso, o de la interacción organismo-ambiente, se consideraban imposibles y, en consecuencia, raramente se buscaban o indagaban.

Afortunadamente, no todos los investigadores se alinearon por completo con este marco teórico general y algunos empezaron a sembrar lo que actualmente es el floreciente campo de la Epigenética. El fundador de este campo fue Waddington (1942), con su influyente trabajo *Canalización y desarrollo de la herencia de caracteres adquiridos*. En este trabajo se sentaban las bases que han llevado más tarde al entendimiento de que una misma secuencia de ADN puede tener características funcionales distintas dependiendo de su relación con otros elementos adicionales. En concreto, diversas proteínas y metabolitos pueden adherirse al ADN y modificar no su estructura pero sí su estado funcional. Esta capa de información *epigenética* jugaría un papel fundamental tanto en el *desarrollo* como en la *herencia*. Hoy en día, sabemos que las señales epigenéticas son moduladas por la interacción del organismo con el ambiente, lo que abre una serie de grados de libertad para la forma en la que la información genética es expresada durante el desarrollo en función de las condiciones ambientales (Albuquerque Filho, De Freitas, García, de Freitas Crivelaro, Schröder y de Lima, 2017; Anastasiadi, Venney, Bernatchez y Wellenreuther, 2021; Benoit, Rakic y Frick, 2015; Villota-Salazar, Mendoza-Mendoza y González-Prieto, 2016). Además, a lo largo de las últimas dos décadas ha crecido exponencialmente nuestro conocimiento sobre la transmisión de estas señales epigenéticas

entre padres e hijos, y sobre los cambios fenotípicos que regulan (Fitz-James y Cavalli, 2022; Liberman, Wang y Greer, 2019; Szyf, 2015). El conocimiento que la epigenética ha ido acumulando estos años ha supuesto una revolución a la hora de entender cómo se regula y expresa el genoma (Cavagnari, 2012), dejando atrás el concepto erróneo de barrera de Weismann (Bline, Le Goff y Allard, 2020; Eaton et al., 2015; Gowri y Monteiro, 2021; Nilsson, Maamar y Skinner, 2020; Noble, 2018; Surani, 2016; Wang y Allard, 2022). Los principales mecanismos de acción conocidos actualmente son la *metilación*, la *modificación de las histonas* y diversos tipos de ARN (Fitz-James y Cavalli, 2022; Heard y Martienssen, 2014).

La metilación del ADN tiene lugar cuando un grupo metilo (-CH₃) se une a la posición 5 de una base de citosina (5mC), gracias a la acción de las metiltransferasas, DNMTs (Law y Jacobsen, 2010; Luo, Hajkova y Ecker, 2018). La *hipermetilación* se asocia con un silenciamiento de los genes y por tanto de su actividad, mientras que la *hipometilación* se puede llegar a asociar con la activación o una mayor actividad de los genes (Martin y Fry, 2018).

Respecto a las modificaciones de las histonas, éstas pueden darse a través de varios procesos, si bien los principales, o al menos los más estudiados por el momento, son los siguientes: la *metilación*, la *acetilación* y la *fosforilación* (Fitz-James y Cavalli, 2022). De estos procesos depende la activación de la *cromatina* y, por tanto, la expresión de los genes.

Por último, el ARN, en especial el ARN no codificante, es un mecanismo regulador directo de los estados epigenéticos, pero también incide en los mismos de manera indirecta, ya que regula y modifica el estado de activación de los otros mecanismos (Fitz-James y Cavalli, 2022): por ejemplo, hay evidencia de que los pequeños ARN interferentes (siARNs) median en los procesos de metilación del ADN y la modificación de las histonas, reprimiendo la transcripción (Holoch y Moazed, 2015).

A partir del conocimiento sobre estos mecanismos epigenéticos, el genoma ya no se considera una secuencia de texto estático sino una complejísima máquina bioquímica cuyos múltiples elementos interactúan y operan en un espacio tridimensional (Cavagnari, 2012; Duncan, Gluckman y Dearden, 2014; Jablonka, 2013; Noble, 2020). Es el comportamiento del genoma el que determina todas las expresiones fenotípicas, algunas de las cuales son especialmente relevantes al estar asociadas con enfermedades como el cáncer (para una revisión del tema ver Lee y Kim, 2021) o la obesidad y la diabetes (Ling y Rönn, 2019). De manera importante, la epigenética no sólo nos ayuda a entender la aparición de estos fenotipos relevantes sino que también supone una vía posible de intervención sobre ellos (Jin

et al., 2021; Liu, Li Wu y Liu, 2022; Nagy, Vaillancourt y Turecki, 2018; Xiao, Liu y Jiao, 2020). Por todo ello, no cabe la menor duda de que la agenda de investigación de la epigenética debe perseverar en su fortalecimiento y desarrollo tanto a nivel básico como aplicado.

La propuesta principal de este ensayo, no obstante, es que la consolidación de esta importante agenda biologicista no debe ocurrir en perjuicio del fortalecimiento de otras agendas complementarias. En concreto, defendemos la toma de un mayor protagonismo de un enfoque experimental macroscópico a la hora de estudiar la HCA. Un enfoque que: 1) permita identificar las condiciones ambientales que activan la transmisión inter y transgeneracional de fenotipos conductuales aprendidos y 2) permita descartar que dicha transmisión se produce a través de mecanismos de herencia genética y/o transmisión social. El conocimiento que puede proporcionar este enfoque es valioso con independencia de que se acompañe o no de datos microscópicos complementarios, por varias razones.

Por un lado, desligar las agendas macro y microscópica sobre la HCA, al menos a efectos prácticos a la hora de desplegar series experimentales concretas, puede contribuir a aliviar el problema de la *replicabilidad*. Uno de los problemas a los que se ha enfrentado la HCA tradicionalmente ha sido la escasa fiabilidad de los resultados obtenidos (Feil y Fraga 2012; Olstad, Nordeng, Sandve, Lyle y Gervin, 2022). El fortalecimiento de agendas centradas en el nivel macroscópico permitiría que un mayor número de grupos de investigación (no sólo los que cuentan con una especialización en medidas moleculares) contribuyesen a establecer qué efectos de HCA son robustos y cuáles no. La presencia o no de datos moleculares junto a las demostraciones macroscópicas (conductuales/morfológicas) del efecto no le suman ni le restan necesariamente rigor a la investigación realizada. Lo primero que se necesita establecer con claridad es la robustez de la relación causal entre las condiciones ambientales y los efectos fenotípicos. De hecho, en muchas ocasiones la presencia de datos moleculares conlleva una aportación relativamente escasa a las investigaciones, al apuntar a una mera correlación (no a una relación causal) entre un estado molecular determinado y la aparición de fenotipos. Las relaciones causales más fácilmente identificables (y sobre las que debemos aspirar a conocer mucho más) son las que existen entre los cambios ambientales y la aparición de fenotipos heredables.

Por otro lado, la negación histórica de la existencia de la HCA por asunciones sobre los mecanismos posibilitadores nos debe dejar algunas lecciones. La agenda de la Epigenética, o de cualquier otro campo centrado en el estudio de mecanismos moleculares concretos, se sitúa en un nivel relativamente particular de análisis. La HCA es un concepto mucho más

amplio que la Epigenética: sus mecanismos posibilitadores no tienen por qué estar limitados al rango de mecanismos moleculares contemplados en un determinado campo de estudio. Situarnos en un enfoque particular de *dentro afuera*, por ejemplo, uno centrado de partida en los mecanismos epigenéticos, puede hacer que (como en el pasado) ciertos fenómenos de HCA pasen desapercibidos. Ejemplo de ello, es que otro campo de creciente interés es el que ha empezado a identificar relaciones entre el microbioma y la HCA (David, Canario, Combes y Demars, 2019; Elgart y Soen, 2018; Rosenberg, Sharon y Zilber-Rosenberg, 2009; Rosenberg, Sharon, Atad y Zilber-Rosenberg, 2010; Salvucci, 2016). Esto nos indica varias cosas. Una es que parece que el concepto Johannseniano de gen abarca muchos más elementos de los que podíamos imaginar cuando el ADN, y posteriormente las marcas epigenéticas, fueron descubiertas. Otra es que los enfoques de *fuera adentro* siguen pareciendo indispensables: identificar primero formas de HCA macroscópicas permite optimizar la inversión de recursos en la búsqueda de sus posibles mecanismos posibilitadores. En esta línea, en los siguientes apartados, defenderemos la idea de que nuestro campo de conocimiento, la psicología del aprendizaje, está en disposición de contribuir de manera efectiva a la identificación de un tipo concreto de fenotipos heredables: los fenotipos conductuales adquiridos. En esta argumentación, primero repasaremos brevemente cómo algunos psicólogos pioneros exploraron este tipo de agenda a principios del s.XX. Revisaremos los resultados que obtuvieron y discutiremos cómo mejorar la robustez de los diseños que emplearon.

3. Antecedentes de una agenda de la psicología del aprendizaje sobre el estudio de la HCA.

Diversas figuras prominentes de la psicología de principios del s.XX recurrieron a la existencia de la HCA para explicar el origen de patrones conductuales innatos, asumiendo que estos venían mediados por los aprendizajes de generaciones ancestrales. Entre los autores favorables a esta hipótesis encontramos a Wundt, Titchener, Hall y Cope. Otros autores relevantes tenían opiniones más desfavorables: desde algunos que no abrazaban la hipótesis de la HCA pero declaraban la importancia de buscar evidencia que ayudase a aceptarla o descartarla, como era el caso de Watson (en Behavior), hasta los que se posicionaban claramente en contra de su existencia como Thorndike (The original nature of man). El que la HCA no resultase indiferente a todos estos autores indica el claro vínculo conceptual que existe entre la noción de este tipo de herencia y el aprendizaje. En esta relación aprendizaje-HCA no sólo se encuentra una explicación posible a ciertos comportamientos innatos (que no es poco) sino que residen posibles efectos que exigirían redefinir los límites del concepto de aprendizaje como proceso psicológico.

Una característica importante del interés de la psicología por la HCA en aquella época es que aportó un enfoque experimental al problema. A principios del s.XX el enorme volumen de discusión y retórica que había generado la HCA contrastaba con el número relativamente pequeño de experimentos dirigidos a obtener evidencia de este tipo de herencia (Kammerer, 1924; McDougall, 1927, 1930a, 1938; Pavlov, 1923, pp. 360-361; Rhine y McDougall, 1933; Roberts, 1918; Studentsov, 1924; Tornier, 1907). Por eso, aunque los procedimientos metodológicos de aquellos experimentos pioneros puedan ser criticados gravemente hoy en día, es más que meritoria su convicción sobre la idea de que la vía experimental era la adecuada para resolver las controversias alrededor de la HCA. Las prósperas vías actuales de investigación experimental sobre el tema se fundamentan en aquella convicción y han crecido a partir de los errores observados en aquellos primeros pasos.

El interés experimental de esos años sobre la relación entre aprendizaje y herencia no se limitó a la HCA. También surgieron diversas líneas de experimentación interesadas en la *selección artificial* de rasgos psicológicos y conductuales (e.g., Tolman, 1924; Tryon, 1940). Estos trabajos han sido importantes a la hora de identificar una vía próspera de generación de modelos animales para estudiar diferentes tipos de rasgos (Modlinska, Stryjek y Pisula, 2015; Modlinska y Pisula, 2020; Patel, Kas, Chattarji y Buwalda, 2019). Sin pretender hacer una revisión exhaustiva de todos los trabajos realizados sobre la HCA en aquella época, queremos destacar dos líneas experimentales, no tanto por los resultados obtenidos, sino por el objetivo por el que fueron diseñadas. Este objetivo se alinea con la agenda de investigación que defendemos fortalecer en el presente ensayo y consistía en comprobar la posible adquisición de fenotipos conductuales adquiridos a través de técnicas de *condicionamiento*.

La primera línea surgió en el grupo de investigación de Ivan P. Pavlov. En realidad, los resultados de esta línea nunca fueron publicados formalmente con detalle pero se ha tenido conocimiento de ellos a través de comunicaciones escritas informales (Studentsov, 1924), conferencias y testimonios personales contrastados (recogidos, p.ej., en Gantt, 1960; Razran, 1958). La lógica de estos experimentos obedece a la hipótesis de que la HCA podría estar envuelta en la capacidad de algunos estímulos para evocar de manera innata una respuesta en los organismos. Windholz y Lamal (1991) apuntan a que esta idea fue defendida por Pavlov en diversas conferencias entre los años 1911 y 1913. La hipótesis se puede entender mejor en términos del bien conocido procedimiento de *condicionamiento clásico* desarrollado por Pavlov (1927/1960). En este procedimiento se emparejan dos estímulos. Uno es un estímulo capaz de activar de manera innata con su presencia una determinada respuesta; como este

estímulo activa la respuesta sin condiciones, se le denomina estímulo incondicionado (EI). A la respuesta activada por el EI se le denomina respuesta incondicionada (RI), y al conjunto EI-RI se le suele denominar *reflejo incondicionado*. El otro estímulo inicialmente no es capaz de activar la respuesta con su ocurrencia, pero adquiere esta capacidad tras repetidos emparejamientos con el EI; como este estímulo genera la respuesta *a condición* de haber sido emparejado con el EI, se le denomina estímulo condicionado (EC). A la respuesta activada por la ocurrencia del EC se le denomina *respuesta condicionada* (RC) y al conjunto EC-RC se le denomina *reflejo condicionado*. La hipótesis de Pavlov era que los reflejos incondicionados de los individuos de una generación habían sido reflejos condicionados en generaciones pasadas. Es decir, que los efectos del condicionamiento (en este caso, la capacidad adquirida para responder ante el EC con una respuesta similar a la RI) eran transmisibles a través de la HCA.

Un colaborador de Pavlov, Studentsov (1924) fue el encargado de realizar el primer experimento para poner a prueba esta hipótesis. En el experimento, los ratones utilizados como sujetos fueron expuestos al sonido de una campana que consistentemente iba seguido de la aparición de alimento en un comedero. Se esperaba observar el efecto clásico de condicionamiento, es decir, que los emparejamientos sonido-comida resultasen en la adquisición de la conducta de entrada en el comedero ante la mera presentación del sonido. Además, se esperaba encontrar un efecto de HCA, observándose que la descendencia de los individuos que habían recibido este entrenamiento expresara este rasgo conductual de manera innata o lo adquiriesen con mayor facilidad que sus progenitores. Aunque según informa Gantt (1960), el experimento conducido por Studentson constó de 11 generaciones, el propio Studentsov (1924) aportó un informe, relativamente breve y poco detallado, en el que informó de los resultados de 5 generaciones. En la primera generación fueron necesarios 298 ensayos para producir la respuesta de acercamiento en presencia del sonido. En las cuatro generaciones posteriores, el número de ensayos disminuyó notablemente: 114, 29, 11 y 6 ensayos, respectivamente. Pavlov comunicó informal y entusiastamente estos resultados en 1923, tanto en conferencias como en reuniones de trabajo realizadas con diferentes grupos de investigación especializados en biología. Diversos asistentes a estos actos criticaron el diseño del experimento de Studentsov y le comunicaron a Pavlov interpretaciones alternativas de sus resultados que no apelaban a los efectos de una HCA sino a artefactos derivados de la creciente pericia del experimentador a la hora de entrenar a los sujetos a lo largo de las generaciones (Kol'tsov, 1967). Maiorov (1954), discípulo Pavlov confirmó que, tras aquellas críticas recibidas, Pavlov concluyó que el procedimiento experimental de Studentsov era impreciso y encargó su mejora a uno de los colaboradores en los que tenía más confianza, E. A.

Ganike. Kol'tsov (1967) informó que cuando volvió a hablar en 1925 con Pavlov, éste le trasladó que en este procedimiento mejorado, los ratones descendientes de la 8ª generación tardaban de 5 a 7 ensayos en mostrar la respuesta ante el sonido (el EC). Sin embargo, al introducir un grupo control con descendientes de ratones no entrenados y adquiridos en otra ciudad, observaron que invertían el mismo número de ensayos que el grupo descendiente de animales entrenados. Aunque Pavlov nunca publicó formalmente, parcial o totalmente, los resultados de esta línea de investigación, a la luz de sus resultados pidió explícitamente que no se le mencionara como un defensor de la existencia de la HCA.

En esta línea de investigación observamos diversos aspectos reseñables. El primero es la evidente falta de control procedimental en diferentes aspectos del trabajo realizado. El hecho de que la actuación de los ratones del experimento de Studentsov pudiese variar tanto a lo largo de las generaciones es sorprendente e indica que el procedimiento no estaba suficientemente mecanizado. Por otra parte, la ausencia de un grupo control mantenido en las mismas condiciones que el grupo experimental impide una comprobación del origen del efecto principal observado. Nótese, además, que el grupo de control que se añadió en el trabajo posterior de Ganike no es tampoco el ideal. Los padres de los sujetos de ese grupo control procedían de otra ciudad y habían sido mantenidos en condiciones diferentes a las de los padres del grupo experimental. Bajo estas condiciones, es difícil extraer conclusiones firmes ni a favor ni en contra de la existencia del tipo de HCA que se pretendía comprobar.

Existe otro factor procedimental menos evidente que también pudo jugar un papel importante a la hora de dificultar la observación de resultados más claros: el tipo de estímulo empleado como EC. Parece conveniente que un diseño que pretenda buscar efectos de HCA en condicionamiento (o en cualquier otro caso de aprendizaje específico del estímulo) se asegure de emplear un estímulo lo suficientemente distinguible de otros estímulos con los que los animales, bien del grupo experimental o bien de condiciones control, puedan tener experiencia fuera o dentro del contexto de aprendizaje. Si, por ejemplo, los sujetos del grupo experimental son expuestos a estímulos similares al estímulo diana fuera del contexto del condicionamiento es posible que la generalización (Pearce, 1987) disminuya la magnitud de cualquier efecto de adquisición o de herencia. Además, aunque los sujetos del grupo control no se expongan al estímulo diana, si son expuestos a estímulos similares, es posible que algún efecto de adquisición y/o herencia sobre dichos estímulos tienda a dificultar la observación de diferencias respecto al grupo experimental. La poca información con la que contamos sobre los experimentos de Studentsov y Ganike (sobre todo en lo relativo a las condiciones de

mantenimiento de los animales dentro y fuera de las sesiones experimentales) hace que no podamos estimar en qué medida los sujetos de los grupos experimental y control tuvieron algún tipo de experiencia con estímulos auditivos similares al estímulo empleado como EC.

Reparar en este factor nos conduce a una discusión interesante sobre qué contenidos, o informaciones, relacionados con los episodios de condicionamiento pueden ser transmitidos por HCA. Pavlov esperaba una HCA en la que el reflejo condicionado de una generación pasase a ser incondicionado en generaciones posteriores. En términos de nuestro marco teórico estándar (p.ej., Mackintosh, 1983; Rescorla y Wagner, 1972), esto supondría la herencia de una asociación EC-EI. Pero podría darse el caso de que, además (o en lugar) de esa asociación, otro tipo de información relacionada con el condicionamiento fuese heredada. Una consideración ampliamente aceptada es que los episodios de condicionamiento aumentan y mantienen la saliencia de los ECs, lo que permite que el animal aprenda (p.ej., Mackintosh, 1975) y/o responda (p.ej., Hall y Rodríguez, 2017; Pearce y Hall, 1980) sobre estos estímulos de manera más efectiva en el futuro. Quizás, este aprendizaje sobre la saliencia del estímulo sea susceptible de HCA. Consideraremos esta opción a la luz de la revisión de otra línea de investigación, en este caso, la basada en los experimentos de William McDougall (1930, 1933, 1938).

Partiendo de una hipótesis muy similar a la barajada por Pavlov, McDougall diseñó un procedimiento experimental de aprendizaje de discriminación. En este procedimiento, entrenaba a ratas jóvenes a elegir entre dos pasajes de escape de un tanque de agua. Los sujetos eran introducidos en el agua y nadaban para intentar escapar de esa situación relativamente desagradable para ellos. Uno de los pasajes de escape estaba iluminado y las ratas que escapaban por él recibían una descarga eléctrica aversiva. El otro pasadizo estaba levemente iluminado y si las ratas escapaban por él no recibían la descarga. Al repetir los ensayos de entrenamiento, las ratas aprendían progresivamente a elegir escapar del tanque a través del pasillo menos iluminado. El entrenamiento se daba por finalizado cuando una rata realizaba 12 escapes consecutivos por el pasillo menos iluminado. Las ratas entrenadas, machos y hembras, se cruzaban y la progenie resultante recibía el mismo entrenamiento, y así sucesivamente a lo largo de diversas generaciones. McDougall (1930, 1933, 1938) observó un efecto similar al que encontró Studentsov (1924) en el experimento comentado previamente: el número de ensayos requerido para finalizar el entrenamiento fue disminuyendo conforme pasaban las generaciones. McDougall interpretó estos resultados como un efecto de HCA. Es interesante notar que este supuesto efecto sería compatible con las dos posibilidades que

hemos contemplado previamente. McDougall podría haber encontrado evidencia de una HCA de la asociación luz-descarga o una HCA de un aumento de la saliencia de la dimensión estimular luz-oscuridad. En ambos casos, sería esperable encontrar el efecto beneficioso del entrenamiento de los progenitores sobre la velocidad de aprendizaje de discriminación de los hijos.

De manera interesante, McDougall incluyó algunas condiciones y procedimientos de control para fortalecer su interpretación de los resultados. Desafortunadamente, estos controles no fueron del todo ideales porque no se mantuvieron constantes a lo largo de todo el experimento. En algunas generaciones, comparó la actuación de descendientes de padres entrenados con la actuación de descendientes de padres no entrenados. En estas comparaciones se observó una mejor discriminación (una mayor tendencia a elegir el pasillo de escape no iluminado) en los descendientes de padres entrenados, un resultado consistente con la presencia de una HCA de la aversión a la luz. Además, consciente de que otra posible explicación alternativa a los resultados obtenidos sería la presencia de una selección artificial involuntaria de los sujetos más hábiles en el grupo experimental, implementó en algunas generaciones un procedimiento de "selección adversa". Bajo estas condiciones, se siguió observando el patrón de resultados esperable en función de la presencia de un efecto de HCA de fobia a la luz en el grupo experimental. En su informe final, McDougall (1938) expresó su creencia de haber aportado evidencia firme de un caso de HCA. Sin duda, sus pruebas eran algo más sólidas que las aportadas por Studentsov (1924), pero el problema llegó cuando otros autores fallaron sistemáticamente a la hora de replicar sus resultados.

Crew (1936) usó un procedimiento similar al empleado por McDougall. Comparó sistemáticamente a lo largo de 18 generaciones a sujetos descendientes de ratas entrenadas con sujetos descendientes de ratas no entrenadas. No encontró diferencias entre grupos ni evidencia de una disminución sistemática de los errores en los sujetos del grupo experimental. Al discutir las discrepancias entre los resultados de McDougall y Crew, se han señalado algunas diferencias procedimentales potencialmente relevantes (Webb, 1989). Aunque Crew intentó usar un tanque de agua similar al del trabajo original, cuando el propio McDougall visitó su laboratorio indicó que encontraba diferencias notables entre los dos aparatos. Otras diferencias notables fueron la edad con la que los sujetos comenzaban el experimento (4 semanas en el experimento de McDougall frente a 8 semanas en el de Crew), y la programación del orden y número de ensayos de entrenamiento de discriminación.

Otro posible factor diferencial no discutido en la literatura previa es la experiencia con el estímulo diana. Al igual que el efecto esperado por Pavlov (y Studentsov y Ganike) el efecto obtenido por McDougall era supuestamente específico del estímulo. Si ese efecto de HCA se basaba en el aprendizaje de una asociación luz-descarga (o en un aumento de la saliencia de la luz), cualquier experiencia diferencial con estimulación lumínica en el experimento de Crew podría haber llevado a la obtención de un resultado diferente. Desafortunadamente, tanto los informes de McDougall como el de Crew carecen de información sobre las condiciones de luminosidad/oscuridad en la que fueron mantenidos los animales de las condiciones experimental y control. Es posible que alguna situación importante (de manejo de los sujetos, alimentación, limpieza de las cajas hogar...) se diera en condiciones diferentes de luminosidad en los diferentes trabajos, pudiendo esto haber generado condicionamientos adicionales en la dimensión estimular relevante y contribuyendo así a la obtención de resultados diferentes.

Consideraciones similares a las ofrecidas para el trabajo de Crew se pueden hacer en relación a otro intento fallido de réplica del trabajo de McDougall, el realizado por Agar, Drummond y Tiegs (1935; 1942; 1948; 1954). En este trabajo se emplearon condiciones de control metodológicamente más elegantes que las usadas en los experimentos anteriores de McDougall y Crew. Agar, Drummond y Tiegs (1954) observaron cambios en la velocidad de aprendizaje a lo largo de las generaciones. Aunque la dirección de estas tendencias no fue siempre la misma (se alternaban tendencias de mejora y empeoramiento del aprendizaje) siempre se produjeron de manera paralela en los grupos experimental y control.

La impresión conjunta que dejaron en el campo todas estas líneas de investigación fue que no existían pruebas sólidas de HCA en fenotipos adquiridos en tareas de condicionamiento. Esta impresión frenó la puesta en marcha de posteriores intentos de comprobar si, con diseños metodológicamente más cuidados, y con el empleo de estímulos más diferenciables y controlables, se podría obtener una evidencia más clara a favor, o en contra, de la existencia de una HCA de fenotipos adquiridos por condicionamiento. Este desafío se afrontó bastantes años más tarde, cuando el interés por los fenómenos relacionados con la HCA resurgió de la mano de la epigenética. Quizás, el trabajo que marcó una antes y un después en el regreso del interés por la HCA de efectos específicos del estímulo, derivados del condicionamiento, es el realizado por Dias y Ressler (2014).

En este trabajo se empleó una técnica de condicionamiento del miedo olfativo con ratones, utilizando un olor como EC y una descarga eléctrica aversiva como EI. Dias y Ressler (2014) entrenaron con esta técnica a los animales de una primera generación y observaron

una serie de efectos conductuales y neuroanatómicos específicos. Para algunos animales el EC fue acetofenona, un olor que activa la población de neuronas sensoriales olfativas (OSN) que expresan M71 en la nariz. Para ellos, el entrenamiento de condicionamiento resultó en un aumento del número de estas neuronas. Otros animales, para los que el EC fue propanol no mostraron estos cambios neuroanatómicos. Por otra parte, todos los animales mostraron un aumento en la sensibilidad conductual ante el EC. Este rasgo se midió a través de una prueba de potenciación del reflejo de sobresalto. En esta prueba se parte de un estímulo auditivo cuya aparición no anunciada produce un reflejo de sobresalto. La presencia durante la prueba de un olor previamente emparejado con una descarga intensifica la magnitud de la respuesta de sobresalto, algo que se toma como índice de un aumento en la saliencia del EC a consecuencia de su condicionamiento. En esta prueba, los animales mostraron sensibilidad conductual ante el olor empleado como EC (acetofenona o propanol) pero no ante el otro olor. De manera importante, Dias y Ressler (2014) encontraron evidencia de una HCA de estos efectos conductuales y neuroanatómicos, en dos generaciones de descendientes macho (no se probaron los efectos en hembras) que no recibieron exposición a los estímulos empleados en el condicionamiento de sus ancestros. Los descendientes de padres entrenados con acetofenona heredaron sus alteraciones neuroanatómicas específicas. Dichas alteraciones no aparecieron en los descendientes de los padres entrenados con propanol. Y, por otra parte, los descendientes mostraron sensibilidad conductual (en una prueba de potenciación del reflejo de sobresalto) ante el olor que sirvió de EC para sus ancestros pero no ante el otro olor (acetofenona o propanol). Dias y Ressler (2014) apoyaron su tesis de que los presentes efectos constituían un caso de herencia no genética, no mediada por el aprendizaje social, al haberse fecundado los descendientes de la segunda generación a partir de una técnica de *fecundación in vitro* (FIV) con espermatozoides de los machos entrenados originalmente y al haberse llevado a cabo también un procedimiento de crianza cruzada.

Existen varios aspectos reseñables sobre estos resultados. El diseño de Dias y Ressler (2014) parece aportar evidencia inequívoca de efectos de HCA específicos del estímulo. Una diferencia notable de este estudio respecto a los estudios pioneros discutidos es la distinguibilidad de los olores empleados como ECs. El éxito de Dias y Ressler a la hora de encontrar estos efectos específicos del estímulo pudo residir, al menos en parte, en la acertada elección de estímulos relativamente no comunes. Por otra parte, es reseñable que los efectos obtenidos son compatibles con las dos posibilidades que hemos ido barajando: puede que la información concreta que diese pie a los efectos de HCA obtenidos fuese la asociación olor-descarga y/o puede que fuese un aumento en la saliencia del olor empleado como EC.

Tengamos en cuenta que el fenotipo conductual heredado que se midió no fue una RC de miedo ante el olor, sino una sensibilidad conductual compatible con la existencia de dicha RC pero también compatible con una saliencia aumentada del estímulo.

Además de trabajos adicionales explotando este procedimiento de condicionamiento olfativo (Aoued et al., 2020), es reseñable la observación de efectos similares en otras especies (Dunlap y Stephens 2014; Pereira, Gracida, Kagias y Zhang, 2020; Remy 2010;). También es importante la investigación en humanos que ha surgido alrededor de trastornos relacionados con la ansiedad y la depresión, y que podría estar relacionada con experiencias y aprendizajes sobre estímulos específicos. Se ha observado que la descendencia de individuos expuestos a traumas, pese a no sufrir directamente estas situaciones, tiene más probabilidades de desarrollar trastornos relacionados con la ansiedad y la depresión en comparación con los controles (Yehuda y Lehrner, 2018). Además, se ha observado que la depresión y la ansiedad maternas también influyen en el riesgo de psicopatología en la descendencia (Gjerde et al., 2021; Jovanovic et al., 2011). En contraste con los modelos animales previamente comentados, este tipo de trabajos con humanos supone un desafío a nivel metodológico a la hora de identificar las causas de estos efectos. La mayoría de los estudios investigan a los hijos criados por sus padres biológicos y, por tanto, no se puede excluir una transmisión conductual del riesgo por parte de los padres. Pese a estas limitaciones, las pruebas sugieren una herencia no genética por transmisión conductual o vías no genéticas, no conductuales, como la herencia epigenética.

En resumen, en este apartado hemos comprobado que el interés por la HCA de efectos relacionados con el condicionamiento se remonta un siglo atrás. El contexto en el que se realizaron los estudios dirigidos por Pavlov y McDougall es muy diferente al contexto más actual en el que Dias y Ressler (2014) han obtenido esta evidencia clara. Hoy en día, cada vez hay más pruebas de que la barrera de Weismann no es en realidad una barrera (Bline, Le Goff y Allard, 2020; Eaton et al., 2015; Gowri y Monteiro, 2021; Nilsson, Maamar y Skinner, 2020; Noble, 2018; Surani, 2016; Wang y Allard, 2022) y, entre otros efectos fenotípicos, la adquisición de fenotipos derivados de situaciones de condicionamiento parece susceptible de ser transmitida por HCA. No obstante, aún quedan por dilucidar diversas preguntas relacionadas con este tipo de efectos: ¿cualquier aprendizaje específico del estímulo es susceptible de HCA? En el caso del condicionamiento clásico, ¿qué se transmite por HCA? ¿Se hereda una asociación EC-EI y/o un aumento de la saliencia del EC? A continuación defendemos la conveniencia de que la psicología del aprendizaje intente responder a estas

cuestiones retomando el interés de la agenda iniciada por Pavlov y McDougall, y aportando una visión complementaria a la ofrecida por la agenda actual de la Epigenética (p.ej., Dias y Ressler, 2014).

4- Una agenda de investigación sobre la HCA desde un enfoque centrado en el aprendizaje y la conducta

Terminamos casi como empezamos, con una definición de aprendizaje desde una perspectiva cognitiva, pero incluyendo ahora en ella la existencia de la HCA que hemos constatado en la revisión de este ensayo. Podemos definir el *aprendizaje* como una función que permite a los organismos adquirir y organizar información sobre el medio en el que viven y, además, utilizarla para regular tanto su comportamiento *como el de su descendencia*. Nuestras actuales teorías de aprendizaje se basan en el amplísimo conocimiento del que disponemos sobre cómo los organismos explotan la información nueva que ellos mismos van adquiriendo por sí mismos (Mowrer y Klein, 2000; Pearce, 2013), a través de su propia experiencia (Hall y Rodríguez, 2010; Mackintosh, 1975; Pearce y Hall, 1980) y/o a través de la observación y la transmisión social (Akers, Krohn, Lanza-Kaduce y Radosevich, 1995; Bandura y Walters, 1977; Heyes, 2012; Hoppitt y Laland, 2008). Estos marcos explicativos, sin embargo, no tienen en cuenta cómo el comportamiento de un individuo puede verse también influido por información almacenada en su organismo pero adquirida por sus ancestros. La existencia de la información filogenética y de su influencia en el comportamiento individual no es novedosa (Dobson, 1985; Skinner, 1966, 1984), pero sí lo es que, al menos parte de ella, tenga un origen aprendido. Desde este punto de vista, obtener un mejor entendimiento de la HCA es necesario para lograr una caracterización completa de las funciones de adquisición y uso de información que constituyen el aprendizaje.

A día de hoy, para realizar esta caracterización se requiere aún de mucha mayor investigación sobre qué mecanismos de aprendizaje, y qué contenidos aprendidos, pueden dar lugar a fenotipos heredables a través de HCA. Por los motivos que hemos ido detallando en esta revisión, las agendas biologicistas no han explorado aún con suficiente detenimiento la susceptibilidad de formas de HCA basadas en los diversos tipos de aprendizaje ontogenético conocidos (Lester et al., 2011; Riyahi, Abdoli, Haghparast y Petrosini, 2019). Actualmente, sólo existe cierta evidencia sobre ciertos fenotipos adquiridos en tareas de condicionamiento (p.ej., Dias y Ressler, 2014) y, por tanto, queda aún mucho camino por recorrer, tanto en lo referente a los mecanismos de aprendizaje envueltos (condicionamiento, habituación, etc.) como en el contenido que da lugar a los efectos observados (p.ej., herencia de asociaciones y/o herencia

de cambios en saliencia). Proponemos que una agenda de investigación desplegada desde la psicología del aprendizaje se haga cargo de este objetivo. Y, además, proponemos que lo haga desligándose, a efectos prácticos del desarrollo de sus experimentos, de las agendas de investigación biologicistas. En realidad, lo que se propone es emular en el estudio de la HCA la estrategia que la psicología ha llevado (y lleva) a cabo a la hora de compaginar los enfoques y agendas relativamente independientes de la psicología cognitivo/conductual y la neurociencia.

El desarrollo independiente de los niveles de estudio macroscópico y microscópico en psicología fue fortuito, debido fundamentalmente a las limitaciones tecnológicas que impedían avanzar en el estudio microscópico, pero no macroscópico. No obstante, la historia ha demostrado que resultó una estrategia tremendamente fructífera para nuestro avance en el conocimiento. Durante la segunda mitad del s.XX, las limitaciones tecnológicas a la hora de estudiar el sistema nervioso inauguraron una vía de experimentación basada en la explotación de la *estrategia de caja negra*. En esta estrategia, las características de los mecanismos funcionales psicológicos son abstraídos a partir de experimentos en los que se controlan y observan variables a nivel macroscópico: se manipulan variables ambientales y se observa los efectos sobre la conducta macroscópica. Sobre el uso de esta estrategia, la psicología construyó en pocas décadas buena parte de su cuerpo teórico actual sobre los procesos psicológicos y las bases de la conducta (teorías que, actualmente, se siguen contrastando y mejorando de manera efectiva, empleando la misma estrategia). Aunque, a efectos prácticos, este nivel cognitivo y funcional es agnóstico sobre el nivel molecular que lo posibilita, la neurociencia ha cimentado sobre él sus logros. En un estudio neurocientífico, por lo general, se parte de un modelo conductual bien conocido: bajo ciertas condiciones se observa una conducta que satisface las características de un funcionamiento cognitivo propuesto. El desafío al que se enfrenta la neurociencia es identificar los elementos físicos concretos de nuestro organismo que posibilitan esos funcionamientos cognitivos asumidos teóricamente. A medida que estos enfoques macro y microscópicos han ido avanzando en sus agendas, han ido convergiendo exitosamente en la denominada *neurociencia cognitiva* (Albright, Kandel y Posner, 2000; Bennett y Hacker, 2008; Milner, Squire y Kandel, 1998; Posner, 1995).

La idea que defendemos en este ensayo es tomar un modelo similar de convivencia entre los niveles de interés macroscópico y microscópico en el estudio de la HCA. Mientras la Epigenética y otras áreas afines se encarguen del nivel microscópico de estudio (son la neurociencia de la HCA), una agenda psicológica complementaria, centrada en la relación entre las condiciones ambientales y la conducta, debe intentar acelerar nuestro conocimiento

sobre fenotipos heredables a través de HCA. Los logros de este enfoque macroscópico pueden ser explotados posteriormente como modelos de HCA por los enfoques microscópicos.

Perseguimos, así, que los investigadores del campo de la psicología del aprendizaje, sin necesidad de exhibir un interés central por los objetivos de la biología molecular, pueden aportar un punto de vista relevante, particular y necesario en el estudio de un fenómeno complejo como la HCA. De la misma manera que la ausencia de datos neurales no invalida los resultados de un estudio conductual sobre *memoria semántica* (ya que su contribución se encuentra en otro nivel) se pueden llevar a cabo estudios sobre HCA válidos y rigurosos sin necesidad de ofrecer medidas del mecanismo molecular que los facilita. Lo “único” que se requiere es un diseño experimental exhaustivo que permita adscribir el efecto a un caso de HCA, entendiendo este tipo de herencia como un mecanismo de transferencia de fenotipos adquiridos, que permite que éstos se manifiesten de manera innata en la descendencia. Esto implica recurrir a diseños en modelos animales que permitan controlar y descartar los siguientes posibles efectos confundidores:

1) Efectos debidos a la aparición de diferencias por variables no directamente relacionadas con las condiciones de exposición a los ancestros. Hay variables, como el tamaño de las camadas y la edad (y peso; estado de maduración) de los descendientes en el momento de la prueba que deben ser monitorizadas y controladas, para asegurar la ausencia de diferencias entre los grupos con ascendientes expuestos o no expuestos a las condiciones críticas. Es importante, por tanto, realizar mediciones del máximo de variables fisiológicas posible a lo largo de toda la vida de los descendientes, pero en especial en los periodos de prueba.

2) Efectos debidos al contacto directo o indirecto de los descendientes con los estímulos diana o con estímulos similares. Para anular este tipo de problemas, es conveniente que los estímulos diana empleados no sean estímulos comunes en posibles entornos de mantenimiento de los animales. Por ejemplo, si se emplean sonidos, que estos tengan varias características que los hagan altamente diferenciables de otros sonidos con los que los animales del experimento vayan a tener experiencia. Además, en el caso de ciertas modalidades sensoriales, como los estímulos sápidos, es necesario contemplar la posibilidad de que los descendientes tengan contacto con ellos a través de las deposiciones de sus ancestros. Una medida de control de este tipo de problemas es distanciar temporalmente la exposición de los ancestros a los estímulos diana del momento de concepción y cría.

3) Efectos debidos a la transmisión social de los fenotipos diana (u otros fenotipos que puedan intensificar o atenuar la observación de dichos fenotipos críticos). Para controlar estos efectos, existen diversas estrategias válidas. La más radical, pero también más costosa, es la fecundación in vitro (FIV), de manera que se asegura que los descendientes no tienen ningún contacto con sus ascendientes. Otra posibilidad es exponer los estímulos diana sólo a la línea germinal paterna y limitar la crianza de los descendientes al contacto con las madres no expuestas a las condiciones ambientales críticas. Es posible, no obstante, que durante el apareamiento hubiese habido una transmisión de información horizontal entre el macho expuesto y la hembra. Por ello, es importante limitar al máximo el contacto entre macho y hembra durante el apareamiento y no extenderlo ni antes ni después. Se puede monitorizar la conducta de las hembras y/o recurrir a la técnica de crianza cruzada (Bartolomucci et al., 2004; Zhang et al., 2021), en la que las hembras que llevan a cabo la crianza de los descendientes no son sus madres biológicas. La técnica de crianza cruzada es útil también en el caso de la exposición a la línea germinal materna. Es importante notar que todas las técnicas de control tienen también sus limitaciones. Por ejemplo, los estudios in vitro pueden acarrear posibles efectos secundarios (Duranton y Chavatte-Palmer, 2018; Feuer y Rinaudo, 2017; Ventura-Juncá et al., 2015), de la misma manera que la técnica de la crianza cruzada puede llegar a ocasionar efectos secundarios de una influencia desde poco notoria hasta dramática en los fenotipos bajo estudio (Bartolomucci et al., 2004; McCarty, 2017), incluidos cambios en la microbiota de los organismos (Daft, Ptacek, Kumar, Morrow y Lorenz, 2015) y alteraciones epigenéticas (Hager, Cheverud y Wolf, 2009).

La psicología del aprendizaje se encuentra en disposición de ofrecer trabajos con este tipo de diseños bien controlados ya que acumula décadas de experiencia en el estudio riguroso de modelos de aprendizaje y desarrollo en edades tempranas (Barnes, 1988; Dickinson y Mackintosh, 1978; Dickinson y Balleine, 1994; Ennaceur, 2010; Inui-Yamamoto et al., 2017). La mejora de estos modelos ha conllevado el desarrollo de técnicas dirigidas a diferenciar los efectos derivados del ambiente y/o de la interacción con los padres. Técnicas como la crianza cruzada permiten separar con solvencia los efectos heredados de los efectos derivados de los aprendizajes tempranos que puedan darse en el contexto de cuidado de las madres/padres y/o de la interacción entre hermanos. Además, es importante notar que la presencia o ausencia de medidas moleculares adicionales no le suma o le resta valor al control experimental sobre las variables ambientales y conductuales. A un trabajo mal controlado a este nivel no le aporta información valiosa la observación de un efecto diferencial de marcas moleculares. Puede que ese tipo de resultado, ayudase a establecer que las condiciones

ambientales manipuladas dan lugar a algún efecto en ese nivel molecular. Pero esto no ayudaría a establecer que dicho efecto molecular diferencial es la causa del efecto fenotípico encontrado.

En resumen, la HCA es un fenómeno complejo que aún necesitamos investigar intensamente tanto en su nivel conductual como molecular. Siendo los dos niveles de estudio relevantes, su relación es asimétrica. Explorar nuevos modelos conductuales de HCA no requiere conocer sus bases moleculares. Sin embargo, el estudio de las bases moleculares de la HCA parece más improbable que se haga en ausencia del conocimiento de los efectos conductuales a los que esas bases dan soporte. Parece, por tanto, que una estrategia inteligente para impulsar nuestro conocimiento en los dos niveles es acelerar y multiplicar la búsqueda de ejemplos de HCA conductuales. La psicología del aprendizaje es un área que puede y debe sumarse a este objetivo aportando su propio enfoque en el estudio de la HCA, poniendo a prueba los límites de esta posible función extendida del aprendizaje y, en caso de que dicha función sea relevante, reconsiderando sus teorías.

OBJETIVOS

El **objetivo general** de esta tesis fue retomar, desde un enfoque psicológico centrado en el aprendizaje, un interés experimental y teórico por el fenómeno de la herencia de caracteres adquiridos (HCA). La HCA es un concepto amplio que englobaría la transmisión de diversos fenotipos adquiridos por los padres a través de distintos mecanismos, críticamente, diferentes al aprendizaje social; es decir, una demostración de HCA requiere que los descendientes expresen de manera innata el fenotipo adquirido por sus padres o ancestros.

Dentro de este concepto general, nos interesa un tipo concreto de fenotipos adquiridos susceptibles de HCA. Concretamente, nos interesan los fenotipos conductuales adquiridos a través de mecanismos de aprendizaje específico del estímulo, como el condicionamiento clásico o Pavloviano y la habituación. Así, nos trazamos los siguientes objetivos concretos.

Objetivo 1. Encontrar evidencia de una herencia de un fenotipo adquirido de **generalización de la habituación a la neofobia con sabores** (Experimento 1). En este objetivo se partía de la hipótesis de que, existiendo cierta evidencia sobre la HCA de fenotipos adquiridos relacionados con los episodios de condicionamiento olfativo (p.ej., Dias y Ressler, 2014), la HCA de fenotipos conductuales podría ser un fenómeno general que incluyese otras formas de aprendizaje específico del estímulo.

Predicción 1: Los descendientes de padres expuestos a múltiples sabores nuevos mostrarán de manera innata una menor neofobia ante sabores nuevos (una mayor tendencia a consumir soluciones de agua con sacarina) que otros animales cuyos padres no hayan sido expuestos a tal variedad de sabores. Esta predicción se puso a prueba en el Experimentos 1.

Objetivo 2. Este Objetivo surgió durante el desarrollo de la tesis al encontrarse en el Experimento 1 un efecto no esperado compatible con un tipo de HCA: la herencia de una preferencia aumentada por el sabor de la sacarina. Al encontrarse evidencia más clara sobre este efecto inesperado que sobre el efecto buscado relacionado con la generalización de la habituación a la neofobia, la preferencia por la sacarina pasó a ser la prioridad en la tesis. Se diseñaron 3 experimentos para replicar e indagar sobre la naturaleza del efecto obtenido en el Experimento 1:.

Objetivo 2.1. Se partía de la siguiente hipótesis: El consumo relativamente prolongado de sacarina da lugar a un aumento en el valor hedónico del sabor y en la preferencia por él. Si estos fenotipos son adquiridos por los machos de una generación podrán ser transmitido por HCA a su progenie. A partir de esta hipótesis se derivaron diferentes predicciones que fueron puestas a prueba en 3 experimentos (Experimentos 2a, 2b y 2c).

Predicción 2: Los descendientes de padres expuestos a sacarina de manera prolongada mostrarán de manera innata una mayor preferencia por la sacarina (una mayor tendencia a consumir soluciones de agua con sacarina) que otros animales cuyos padres no hayan sido expuestos a sacarina. Esta predicción se puso a prueba en los Experimentos 1, 2b y 2c.

Predicción 3: Los descendientes de padres expuestos a sacarina de manera prolongada mostrarán de manera innata reacciones apetitivas más frecuentes y/o intensas (indicadoras de un mayor valor hedónico del estímulo) que otros animales cuyos padres no hayan sido expuestos a sacarina. Esta predicción se puso a prueba en el Experimentos 2a.

Objetivo 2.2. Se partía de la siguiente hipótesis: la expresión de estos posibles efectos de HCA puede ser dependiente de la edad y/o del tipo fenotipo conductual examinado.

Predicción 4: A partir de los resultados obtenidos en el Experimento 1, predcimos que el fenotipo conductual de consumo aumentado de sacarina podría ser más fácilmente expresado a los 60 días de edad (frente a una edad más temprana de 30 días). Esta predicción se puso a prueba en los Experimentos 2b y 2c.

Predicción 5: La prueba de reactividad al sabor (PRS) es potencialmente sensible a la expresión temprana de los efectos de herencia de un aumento del valor hedónico del sabor de la sacarina. Dado que las reacciones apetitivas de disfrute ante un sabor correlacionan con una baja actividad locomotora, durante la PRS será informativo medir la actividad locomotora de los animales. Los descendientes de padres expuestos a sacarina de manera prolongada mostrarán a temprana edad (13 días de edad) más reacciones apetitivas (*mouthing*) y menos actividad locomotora durante la exposición al sabor de la sacarina que otros animales cuyos padres no hayan sido expuestos a sacarina. Esta predicción se puso a prueba en el Experimentos 2a.

Objetivo 2.3. Se partía de la siguiente hipótesis: la magnitud de estos posibles efectos de HCA puede ser dependiente de la cantidad de exposición a la sacarina, siendo el efecto posiblemente más marcado cuanto mayor sea la exposición al edulcorante. Esta predicción se puso a prueba en los Experimentos 2a, 2b y 2c, comparando la actuación de los descendientes de dos grupos, SA-20 y SA-10, expuestos 20 y 10 días a la sacarina, respectivamente.

Predicción 6: Los descendientes de padres expuestos a más sacarina (Grupo SA-20) mostrarán de manera innata una mayor preferencia por la sacarina (una mayor tendencia a consumir soluciones de agua con sacarina) que los descendientes de padres expuestos a la sacarina en menor medida (Grupo SA-10). Esta predicción se puso a prueba en los Experimentos 2b y 2c.

Predicción 7: Los descendientes de padres expuestos a más sacarina (Grupo SA-20) mostrarán de manera innata reacciones apetitivas más frecuentes y/o intensas (indicadoras de un mayor valor hedónico del estímulo) que los descendientes de padres expuestos a la sacarina en menor medida (Grupo SA10). Esta predicción se puso a prueba en los Experimentos 2a.

Objetivo 2.4. Se querían contrastar dos hipótesis alternativas: los efectos observados en el Experimento 1 compatibles con un caso de HCA, se debían a la transmisión de información sobre el sabor específico de la sacarina o sobre el sabor dulce, en general. Para poner a prueba esta hipótesis, en el diseño del Experimento 2 se incluyó un grupo en el que los machos de la primera generación fueron expuestos a otro edulcorante, Stevia.

Predicción 8: Si los efectos de HCA observados son específicos al sabor particular de la sacarina, los descendientes de padres expuestos a sacarina (Grupo SA-20) mostrarán de manera innata una mayor preferencia por la sacarina (una mayor tendencia a consumir soluciones de agua con sacarina) que los descendientes de padres expuestos a la stevia (Grupo STV-20). Por el contrario, si los efectos de HCA observados son específicos simplemente al sabor dulce de los edulcorantes, los descendientes de padres expuestos a sacarina (Grupo SA-20) mostrarán de manera innata una preferencia por la sacarina (una mayor tendencia a consumir soluciones de agua con sacarina) similar a la mostrada por los descendientes de padres expuestos a la stevia (Grupo STV-20). Estas predicciones se pusieron a prueba en los Experimentos 2b y 2c.

Nótese que en ambos casos, no se espera encontrar que el tratamiento recibido por los padres module la actuación de la descendencia ante sabores no dulces, como el vinagre y/o el café.

Predicción 9: Si los efectos de HCA observados son específicos al sabor particular de la sacarina, los descendientes de padres expuestos a sacarina (Grupo SA-20) mostrarán de manera innata reacciones apetitivas más frecuentes y/o intensas (indicadoras de un mayor valor hedónico del estímulo) que los descendientes de padres expuestos a stevia (Grupo STV-20). Por el contrario, si los efectos de HCA observados son específicos simplemente al sabor dulce de los edulcorantes, los descendientes de padres expuestos a sacarina (Grupo SA-20) mostrarán de manera innata reacciones apetitivas similares (indicadoras de un mayor valor hedónico del estímulo) que los descendientes de padres expuestos a stevia (Grupo STV-20). Estas predicciones se pusieron a prueba en el Experimentos 2a.

Objetivo 2.5. Se querían contrastar si la aparición de los efectos y/o su magnitud se veían afectados por el sexo de los sujetos.

CAPÍTULO 2: TRABAJO EMPÍRICO

CHAPTER 2: EMPIRICAL WORK

1. Introduction

The concept of inheritance of acquired characters (IAC) is an old idea, there being evidence that it was discussed at least as early as in ancient Greece by figures such as Anaximander or Hippocrates (e.g., Trevisanato, 2016; Zirkle, 1935). It consists in the assumption that some characters acquired by individuals during their interaction with the environment can be transmitted to their progeny through their germline. This would occur in such a way that the offspring would innately show the character or phenotype acquired by their ancestors, even in the absence of the environmental conditions that promoted such acquisition.

After remaining in the collective imagination for centuries, it was Lamarck (1809) who brought the discussion on the IAC to the academic world at the beginning of the 19th century. From that moment on, the study of the IAC began a long and winding path. The interest it subsequently aroused in authors such as Darwin (1868) —who found multiple observations explainable through this type of inheritance and contemplated it as a mechanism compatible with natural selection—was defused by Neo-Darwinism (e.g., Ho & Saunders, 1979; Noble, 2015) and the subsequent Modern Evolutionary Synthesis (e.g., Dickins, & Rahman, 2012; Mayr & Provine, 1998). For decades, IAC was considered a non-existent and/or irrelevant phenomenon, not being compatible with the standard theoretical models of inheritance and evolution of the time. Consequently, research and interest in experimental scrutiny of the phenomenon declined for much of the 20th century (e.g., Landman, 1991).

The renewal of interest in this type of inheritance came hand in hand with the emergence of a field of biology, epigenetics. Although this field was inaugurated in the mid-20th century (Waddington, 1942), it did not gain momentum until the late 20th and early 21st centuries (for a review, see, e.g., Jablonka & Lamb, 2020). The conceptual barriers that made 20th century Biology consider that IAC did not exist (e.g., Nilsson, Maamar, & Skinner, 2020; Noble, 2022; Weismann, 1893) have been falling with the realization that the effects of an organism's interaction with the environment can leave heritable marks that regulate the functional expression of the DNA genetic code (e.g., Cavalli & Heard, 2019; Celiker & Kalkan, 2020; David, Canario, Combes, & Demars, 2019). As Biology became convinced that IAC was molecularly possible, it became increasingly interested in this type of inheritance. Thus, the biologicist approach is currently the most predominant in the study of IAC, resuming its two traditional objectives on the subject: to unveil the multiple molecular mechanisms involved in this type of inheritance and to clarify its possible roles in the evolution of species (Jablonka & Lamb, 2020). In addition, knowledge about these molecular aspects is enabling the better

understanding of various diseases, opening possible applied lines of improvements in their treatments (e.g., Cavalli & Heard, 2019; Choi & Friso, 2010; Jordan, Lee, McDonald & Mariño-Ramírez, 2022; Zhang, Lu, & Chang, 2020). The approach taken in the present study is a psychological approach complementary to that biologicistic approach.

We are interested in a particular type of IAC that is especially relevant to our field, the psychology of learning. This is the inheritance of behavioral phenotypes acquired through stimulus-specific learning mechanisms such as classical conditioning (e.g., Pavlov, 1927) or habituation (e.g., Groves & Thompson, 1970; Hall & Rodríguez, 2020; Thompson, 2009). We are interested in testing the possibility that some information about such learning can be inherited without social learning (e.g., Bandura & Walter, 1977; Heyes, 2012; Laland, 2004). The distinction between innate and learned behavior that has always interested the psychology of learning might take on another meaning (at least in some cases) when discussed in the light of IAC. It is possible that the innate disposition of organisms to respond in a certain way to certain stimuli comes directly from the learning of their ancestors.

There is evidence that this hypothesis was already considered at the beginning of the 20th century by authors such as Pavlov (1923; Studentsov, 1924) and McDougall (1927; 1930; 1938). Unfortunately, the designs employed in these works were poor and their results were not replicated (Agar, Drummond, & Tiegs, 1935; 1942; 1948; Agar, Drummond, Tiegs & Gunson, 1954; Crew, 1936). However, much more recent experiments conducted under much more precise conditions (e.g., Dias & Ressler, 2014) have obtained results in favor of the existence of a IAC on information related to classical conditioning episodes. For example, in an animal model with mice, Dias and Ressler (2014) demonstrated that the acquisition of fear conditioning to an odor resulted in the inheritance of phenotypes related to the specific experience with that odor: neuroanatomical phenotypes that allow for enhanced sensory reception of that particular odor and a behavioral phenotype of increased sensitivity to that odor specifically. These results suggest that at least part of the information acquired during conditioning with a stimulus can be transmitted to offspring.

In light of results such as those provided by Dias and Ressler (2014), we are faced with several challenges. On the one hand, molecular epigenetics faces the challenge of unveiling the multiple molecular mechanisms that may be involved in this type of IAC. Complementarily, from an approach focused on the psychology of learning, we find another series of related challenges. On the one hand, we need to expand our knowledge about 1) which stimulus-specific learning mechanisms are likely to generate IAC effects; 2) what specific information

related to these learnings is transmissible; and 3) how these possible effects may affect our theories about learning. Importantly, these objectives can be addressed outside the biologicistic framework, from an approach focused on environmental conditions and behavior.

In the present work, we adopted this perspective and, using an animal model with rats, we wanted to investigate the possible inheritance of effects related to non-reinforced exposure to flavors. Specifically, our initial goal was to explore whether the generalization effect of habituation to neophobia observed in some previous studies with rats (Miller & Holzman, 1981; Tarpay & McIntosh, 1977) was susceptible to be transmitted by IAC. In this effect, non-reinforced exposure to multiple tastes decreases the magnitude of the neophobic response to another previously unexposed taste (i.e., decreases the tendency to refuse consumption of this novel taste). To this end, we conducted an experiment (Experiment 1) in which three groups of first-generation male rats (G1) received different types of flavor exposure for 28 days (see Table 1). Animals in the experimental group (Group N) were exposed twice to a sequence of 42 different flavors (n1, n2, n3... n42). Two control conditions were added: in one (later revealed to be critical) the animals received free access to a saccharin water solution (0.4% concentrated; Group SA) in all trials. In the second control condition (Group NP, No Pre-Exposure), the animals had only free access to water in all trials. All animals had free access to water during the time outside the experimental sessions, so that they had 24-hour access to fluids throughout the experiment.

The logic of the experiment was to generate a generalization effect of habituation to neophobia in Group N subjects of this first generation. That is, to observe a progressive attenuation of the neophobia with which these subjects reacted to novel stimuli. Unfortunately, we did not find clear evidence of this effect and there is reason to believe that it was due to a poor choice of stimuli and parameters used in the exposure: consumption in Group N during pre-exposure remained stable at very low levels, which could have rendered the exposure ineffective. The effect that was clearly established was the high saccharin consumption in Group SA, which, reasonably, indicated an unsurprising preference for the sweet taste of that substance (e.g., Mook, 1974).

Approximately two weeks after the end of the test phase, subjects from Groups N, SA and NP were mated with naïve female rats. The offspring subjects (second generation, G2) did not live with their fathers, they only lived with the mother 21 days after parturition. Two tests were performed with these offspring. The first was performed when the subjects were about 30 days old, and consisted of the brief presentation (5 min), in the same session, of saccharin,

coffee and 6 of the flavors that were exposed to the Group N subjects of G1. Again, the parameters used in this test seem not to have been the most accurate: intakes were very low (around 1-2 ml) and no differences were observed between groups. We tried to amend the failure and performed a second test with only two flavors when the subjects were 60 days old. The test consisted of two 120-min sessions on different days, one in which a saccharin solution was presented and the other in which a vinegar solution was presented. A markedly higher saccharin consumption was observed in the offspring of the Group SA, relative to the offspring of the other two groups. And the vinegar test revealed no differences between groups.

Although we had not found the intended effect of IAC on the generalization of habituation to neophobia, we had serendipitously encountered a possible heritability of increased preference for the sweet taste of saccharin. This possible demonstration had not been obtained under the cleanest and most ideal conditions, since it was the results of a second test that the animals had arrived at after a brief experience with saccharin and 7 other flavors in a previous test that they had performed weeks earlier. Given the interest of the possible effect observed, a new study (Experiment 2) was designed to try to demonstrate it more clearly and to investigate some of its possible characteristics.

On the one hand, the fact that we detected the effect only in the test performed when the subjects were 60 days old could be the result of an unfortunate choice of parameters in the first test, when the subjects were 30 days old. But, in addition (or instead), it could indicate that the expression of the IAC effect was age or development specific. Therefore, in Experiment 2, G1 offspring were distributed in three experiments to probe the possible heritability effect at three different ages: at 13 days of age (Experiment 2a), at 30 days of age (Experiment 2b), and at 60 days of age (Experiment 2c). In Experiments 2b and 2c, similar consumption tests were used as in Experiment 1. In Experiment 2a, however, a different type of measures were used. Because the subjects in this experiment were so young, a *taste reactivity test* (TRT) was employed. Subjects were exposed to the tastes via an intraoral cannula and the frequency of certain appetitive (mouthing) and aversive reactions, as well as the locomotor activity of the animals during exposure to the tastes, were measured.

Two other variables to be explored in Experiment 2 were the length of exposure to saccharin and the specificity of the effect of saccharin versus other non-nutritive sweeteners (NNS) such as stevia. Thus, the experimental design was based on a first generation of male rats distributed in 4 groups (see Table 2). The groups differed in the treatment they received during a training phase, or initial exposure, which lasted 20 days. Subjects in all groups had 24

h per day access to two drinking tubes in their individual cages. One group (Group SA-20), had 20 days of free access to saccharin in one tube and free access to water in the other tube. Another group, (Group SA-10), received the same training as Group SA-20 but for only the last 10 days of training. For the subjects in this group, during the first 10 days, both drinking tubes contained water. A third group (Group STV-20) received training similar to that received by Group SA-20, but with access to Stevia (instead of saccharin) in one of the tubes. Finally, a control condition was added (Group NP) whose subjects had access to water through the two beverage tubes presented throughout the 20 days of training.

After this preexposure phase, a test was performed in which a preference for saccharin over stevia was found in the sweetener-exposed groups (Groups SA-20, SA-10, and STV-20) and in a relatively low and similar consumption of both sweeteners in the NP Group. Eleven days after this test, subjects from all groups were mated with naïve female rats. As in Experiment 1, the offspring subjects (G2 generation) did not live with their parents, only living with the mother 21 days until weaning.

The results of Experiment 2a showed a higher frequency of positive hedonic reactions (mouthing) to saccharin and stevia in the offspring of the groups exposed to sweetener (either saccharin or stevia: Groups G2-SA-20, G2-SA-10 and Group G2-STV-20) compared to the offspring of non-exposed parents (Group G2-NP). Consistent differences were observed in locomotor activity during the test (distance travelled). Offspring of the sweetener-exposed groups (Groups G2-SA-20, G2-SA-10 and Group G2-STV-20) showed less activity (a higher rate of enjoyment) in the tests with both flavors (saccharin and stevia) than offspring of the non-sweetener-exposed group (Group G2-NP). This pattern of results is consistent with the existence of a higher hedonic value in sweet taste in the offspring of the sweetener-exposed groups (Groups G2-SA-20, G2-SA-10 and Group G2-STV-20).

The results of Experiments 2b and 2c confirmed and extended the results obtained in Experiment 1. When the consumption test was conducted with 60 day old subjects (Experiment 2c), the offspring of the sweetener-exposed G1 groups (Groups G2-SA-20, G2-SA-10 and Group G2-STV-20) showed an increased preference for saccharin relative to the offspring of the control NP group. When the consumption test was performed with 30-day-old subjects, a similar pattern of results was observed but the differences did not reach significance.

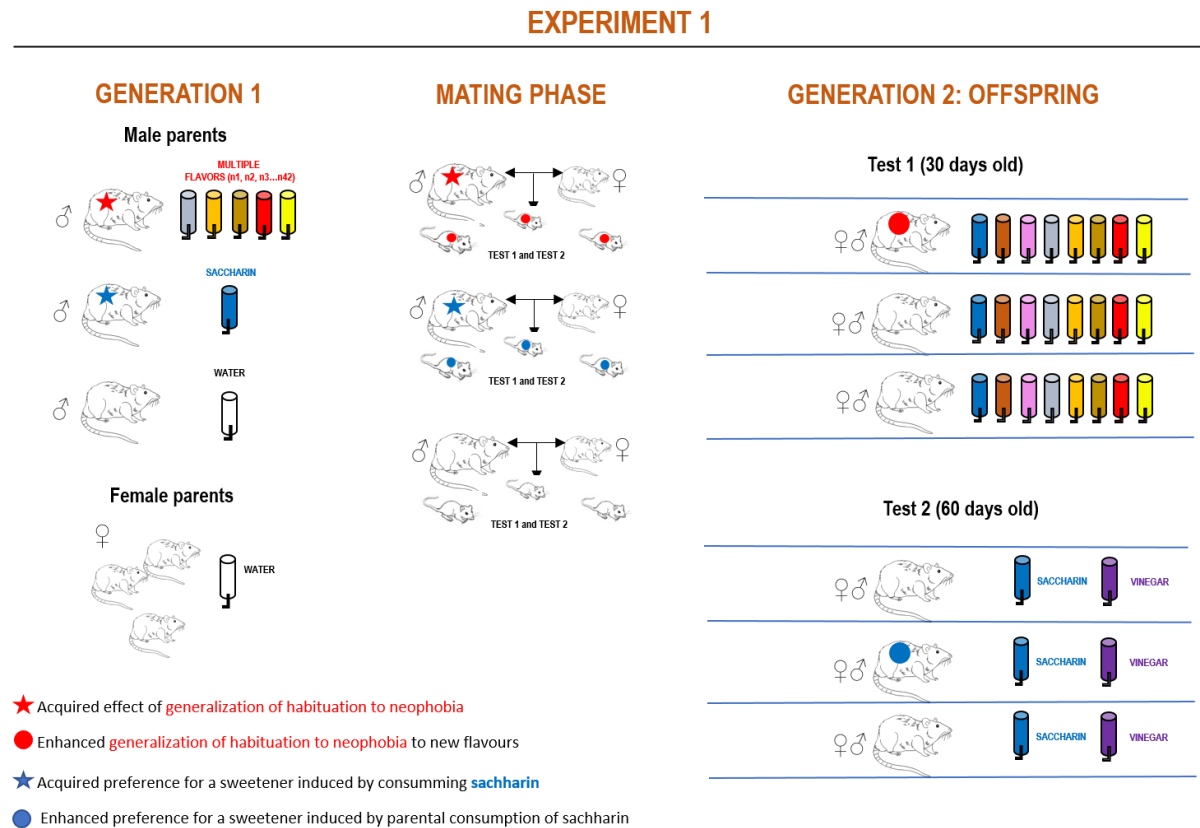
Our interpretation of this entire set of results is that repeated exposure to the sweet taste of sweeteners (such as saccharin or stevia) results in the inheritance of an increased

preference for this taste. We present the experiments performed in detail below and then, in the General Discussion, address the implications of these results and possible facilitating mechanisms.

2. Experiment 1

This experiment was designed to investigate, in a rat animal model, a possible specific case of IAC: the possible inheritance of a generalization effect of habituation to neophobia (Miller & Holzman, 1981; Tarpy & McIntosh, 1977). The experiment began with the training of three groups of first-generation male rats (G1). Each group received a different treatment during an preexposure phase lasting 28 days (see Table 1). In this phase, during each of the daily experimental sessions, the animals received 3 consecutive exposure trials, each lasting 90 minutes. Thus, in the first 14 days of exposure, the animals received a total of 42 exposure trials (14 x 3). During each of these trials, animals in the experimental group (Group N) were given free access (50 ml) to a water solution with a novel taste (n1, n2, n3... n42). Two control conditions were added. In one, animals received free access to a saccharin-containing water solution (0.4% concentrated; Group SA) in all trials. In the second control condition (Group NP), subjects did not receive exposure to flavors but had free access to water in all trials. The treatment received by the groups during the experimental sessions of the first 14 days of exposure was repeated for the following 14 days. The animals in all groups had free access to water during the time outside the experimental sessions.

Table 1. Design of Experiment 1.



Note: In Experiment 1, Group N received two consecutive and identical sequences of 42 different flavors during the exposure; Group SA received exposure to saccharin during all the trials of preexposure phase; Groups NP received water during those trials. After preexposure, a test with saccharin and coffee was conducted. After test, all rats have a rest period of 11 days, followed by a mating phase to obtain the offspring of those experimental groups. In Test 1, when subjects were around 30 days old, this offspring received a one bottle test to eight different flavoured solutions during 5 minutes to each one. Same subjects conducted Test 2 when they were around 60 days old: they received exposure to water, saccharin and vinegar during three days, with 4 sessions (each one 30 minutes).

To verify the behavioral effects acquired during training, two days after the end of the exposure, a test was performed in which the animals received, in trials performed on consecutive days, access to saccharin solution (the same that the SA group had received during training) and access to a new coffee solution for all groups. To ensure that a group of males in the NP group could produce offspring without having had any flavor experience, prior to testing, the NP group was divided into two subgroups. Subjects in the NP-test subgroup participated in the test and did not participate in the subsequent mating phase. The NP-mating subgroup, however, did not participate in the test and thus reached the post-mating phase without having received exposure to flavors.

In the test of this first generation of subjects (G1), we expected the NP-test Group to show low consumption of both saccharin and coffee flavors, which would be consistent with a neophobic response to those flavors. We expected the SA Group, familiar with the saccharin flavor during training, to exhibit high saccharin consumption but very little coffee consumption in the test, similar to that shown by the NP-test Group. That is, in Group SA we expected to observe a saccharin neophobia habituation effect (and/or the acquisition of a preference for its sweet taste) and a coffee neophobia effect. Finally, in Group N, we expected to observe a generalization effect of habituation to neophobia. That is, we expected to observe a greater consumption of the two test flavors, saccharin and coffee, with respect to the control group NP; and, at least, a greater consumption of coffee with respect to Group SA.

After the test, the subjects of the groups SA, N and NP-mating were watered and fed ad lib during a period of 11 days, and then were mated with experimentally naïve female rats. This interval between the test and the mating phases was included in order to ensure that the female rats mated with the subjects from Group N and Group SA would not receive access to any remainder of saccharin or other flavored solutions through the fecal pellets and/or urine of the males.

The resulting offspring (i.e., the second generation, G2) was assigned to three groups according to the experimental group of their fathers: G2-N, G2-SA, and G2-NP-mating (the descendants from the subjects of groups N, SA, and NP-mating in G1, respectively). These G2 subjects were reared by their mother alone for 21 days. After this period, they were housed in individual cages with continuous access to food and water.

The level of preference for different flavoured solutions exhibited by the offspring of all the groups was assessed by two different one bottle tests. The first test (Test 1) was run when the subjects of G2 were around 30 days old (range: 27-33), and consisted of a series of 8

short (5-min) consecutive stimulus presentations: saccharin was presented first and then were presented 7 of the flavors to which the parents of the G2-N group had been exposed (bitter orange, carrot, eucalyptus, oregano, geranium and peanut). If the subjects in the G2-N group had inherited a generalization of habituation to neophobia, we expected them to show a higher overall consumption in the test compared to the G2-NP-mating group, and a higher consumption of the 7 flavors presented after saccharin compared to the G2-SA group (which could have inherited a habituation to neophobia and/or a preference for saccharin). The results obtained showed a generally very low, and decreasing, consumption throughout the 8 consecutive test trials. Under these non-ideal conditions, no differences between groups were observed.

We identified two possible factors that could have detracted sensitivity of the test performed. The first, the young age of the subjects, which could have limited their performance in a test of consumption through drinking tubes. And the second, the performance of so many (and so short) tests in a single session. Consequently, an additional post-test was designed to be more sensitive.

After Test 1, all the subjects were watered and fed ad lib during a period of 30 days, and Test 2 was run when the animals of G2 were approximately 60 days old (range: 57-63): on consecutive days, rats received 120-min-presentations of only two flavors: saccharin on the first day and vinegar on the second day. Again, if subjects in the G2-N group had inherited a generalization of habituation to neophobia, we would expect them to show higher consumption of these two flavors than the G2-NP group and at least higher vinegar consumption than the G2-SA group.

2.1 Method

FIRST GENERATION (G1)

Subjects, apparatus, and stimuli

The male subjects of the G1 were 31 experimentally naïve male Sprague-Dawley rats (mean ad lib weight: 192 g, range: 152–254 g; 43-46 days old at the time of starting the experiment) supplied by the *Animal Facility Service-SGIker* of the *University of the Basque Country* (Leioa, Bizkaia, Spain). The animals were singly housed in a colony room with a constant temperature (23°) and humidity (40% +/- 10%), and a 12:12h light-dark cycle, with light on at 08:00. Their home cages measured 25 x 25 x 15 cm, and were changed once a week

using *Lignocel BK 8-15* (supplied by Rettenmaier & Söhne, JRS) as bedding. No environmental enrichment was provided in these cages during the experiment.

Animals received continuous access to liquid (filtered water and/or the flavoured solutions used as experimental stimuli) and food during the experiment (*Teklad global 18% protein rodent diets*, supplied by *Envigo*; pellets composed by the following ingredients: ground wheat, ground corn, wheat middlings, dehulled soybean meal, corn gluten meal, soybean oil, calcium carbonate, dicalcium phosphate, brewers dried yeast, iodized salt, L-lysine, DL-methionine, choline chloride, kaolin, magnesium oxide, vitamin E, acetate, menadione sodium bisulfite complex, manganous oxide, ferrous sulfate, zinc oxide, niacin, calcium pantothenate, copper sulfate, pyridoxine hydrochloride, riboflavin, thiamin mononitrate, vitamin A acetate, calcium iodate, vitamin B12 supplement, folic acid, biotin, vitamin D3 supplement, cobalt carbonate).

The female subjects of G1 were 23 experimentally naïve Sprague-Dawley rats (mean weight of 277 g; range: 248–306 g at the day before the start of the mating phase). They were supplied 40 days later than the male animals, also by the *Animal Facility Service-SGIker* of the *University of the Basque Country* (Leioa, Bizkaia, Spain). Female subjects were housed individually in standard maternity cages (25 x 50 x 15 cm), with continuous access to food (the same as that received by the males) and water. All the maternity cages were changed once a week, using the same bedding material as for the cages of the males.

The solutions used as experimental stimuli were administered in the home cages at room temperature in 50-ml plastic centrifuge tubes, each equipped with a rubber stopper fitted with a stainless steel, ball-bearing tipped spout. Consumption was measured by weighing the tubes before and after the experimental sessions, and was recorded to the nearest 0.1g. The following flavoured solutions were used: 0.4% (w/vol) saccharin (saccharin sodium salt hydrate, 98%, $C_7H_4NNaO_3S$, supplied by Sigma Aldrich); 0.5% (w/vol) decaffeinated coffee solution (NESCAFÉ[®], supplied by Nestlé Corporation, Spain); 42 different flavoured solutions (SOSA[®], supplied by Sosa Ingredients SL.), grouped in 6 different categories, each one composed by 7 solutions (w/v): fruits (0.02% bitter orange; 0.02% grapefruit; 0.1% lemon juice; 0.1% strawberry; 0.1% pineapple; 0.02% cherry and 0.1% blackcurrant); vegetables (0.02% artichoke; 0.02% fresh onion; 0.1% cucumber; 0.02% carrot; 0.1% green peas; 0.1% ripe tomato and 0.02% fresh garlic); flowers (0.02% laurel; 0.02% eucalyptus; 0.02% Mediterranean pine; 0.1% moss; 0.02% hay; 0.02% Mediterranean forest; 0.02% oak); herbs (0.02% basil; 0.02% oregano; 0.02% mint; 0.02% thyme; 0.02% rosemary; 0.02% sage and

0.02% citronella); plants/flowers (0.1% pink; 0.02% lavender; 0.1% lila; 0.02% marigold; 0.02% chamomile; 0.1% violet and 0.02% geranium) and nuts/others (0.02% peanut; 0.02% toasted hazelnut; 0.02% pistachio; 0.02% bitter almond; 0.02% brown; 0.02% black liquorices and 0.02% ginger).

All procedures relating to the maintenance and use of animals were conducted in accordance with the *European Law of Animal Welfare*, and were approved by the *Animal Welfare Committee of the University of the Basque Country (UPV/ EHU) (CEBA)*.

Procedure

After a quarantine period of 15 days (with ad lib access to food and filtered water in the standard bottles) the male rats were randomly assigned to 3 experimental conditions: Group N (n=8); Group SA (n=8) and Group NP (n=15).

Preexposure phase: this phase lasted for 28 days. On each day, subjects received three consecutive exposure trials of 90 min (from 10:00 to 11:30; from 12:00 to 13:30; and from 14:00 to 15:30). On each trial, animals were given access to 50 ml of the appropriate fluid (saccharin for Group SA; one of the 42 flavoured solutions described previously for Group N; and water for Group NP) in the drinking tubes. Group N received twice consecutively the same sequence at 42 flavors. The first sequence was completed the first 14 days (3 different solutions for each of the 14 days) and the second sequence the following 14 days. Out of the experimental sessions (from 15:30 to 10:00 of the next day) animals from all the groups received free access to filtered water in their standard bottles. 1 day after finishing the last session of preexposure, rats from group NP were randomly assigned to 2 subgroups: NP-test (n = 8) and NP-mating (n = 7).

Test: On each of the following two days, Group N (n=8), Group SA (n=8) and NP-test (n=8) were given a 90-min test trial (from 10:00 to 11:30). All the animals were given access to saccharin the first day and coffee on the second day. Animals from subgroup NP-mating were given access to water in the standard bottles during these two tests. After the second day of test, the rats from groups N (n=8), SA (n=8) and NP-mating (n=7) spent 11 days in their home cages under food and liquid ad lib conditions.

Mating phase: On the morning of the 12th day after the test, the mating phase began, by housing each of the male rats from groups N, SA and NP-mating in the cage of one of the 23 experimentally naive female rats. The female rats had spent a previous quarantine period of 15 days (with ad lib access to food and filtered water). The presence of sperm in vaginal smear

was checked every morning on this phase. When there was a positive vaginal smear, the male was separated from the female, and that day was considered as GD (Gestation Day) 0. In order to avoid big differences in age among the subjects of G2, the mating phase was terminated after seven days. No environmental enrichment was provided on the maternity cages, until two days before the birth, when some paper and paperboard was supplied. Births were checked every day from 9:00 to 14:00, and considered PD (postnatal day) 0.

SECOND GENERATION (G2)

Subjects, apparatus, and stimuli

The subjects were 48 Sprague–Dawley rats, which were part of the offspring of G1: 24 females (mean ad libitum body weight at the start of the experiment: 89 g; range: 63 –111 g) and 24 males (mean ad libitum body weight at the start of the experiment: 94 g; range: 60 – 123 g). The subjects in Group G2-SA (8 males and 8 females) were derived from 2 litters; The subjects in Group G2-N (8 males and 8 females) were derived from 2 litters and subjects in Group G2-NP (8 males, 8 females) were derived from 3 litters.

The pups were housed in the maternity cages with their mothers until post-natal day (PD) 21, after which they were singly housed in 25 x 50 x 15 cm cages with free access to food and water. The animals were assigned to each experimental condition, G2-N, G2-SA or G2-NP-mating, as a function of the experimental treatment received by their fathers: groups N, group SA or group NP-mating, from G1, respectively.

The following flavoured solutions were employed during Test 1 (30 days old): 0.4% (w/vol) saccharin, 0.5% (w/vol) coffee, and a set of six 0.02% (vol/vol) solutions: bitter orange, carrot, eucalyptus, oregano, geranium and peanut (SOSA ®). The following flavoured solutions were employed during Test 2 (60 days old): 0.4% (w/vol) saccharin, 3% (vol/vol) vinegar (Eroski Basic, Spain).

Procedure

Test 1: when animals were approximately 30 days old (range: 27-33 days), a test consisting of 8 trials of 5 min was performed. The first trial started at 10:00 and an interval of 55 min was placed between trials (on which rats received free access to water in their standard bottles; animals had free access to food during the entire test). For all the animals, the 8 flavored solutions were presented in this order: saccharin, coffee, bitter orange, carrot, eucalyptus, oregano, geranium and peanut. A day before this test, a base line was established

running a session with the same trial structure but with all the rats receiving access to water in the drinking tubes during the trials. Once the test was finished, all the rats were maintained ad lib in their cages until the Test 2 began.

Test 2: when animals were approximately 60 days old (range: 57-63 days), a test was performed in two daily sessions. On each of these days, all the animals received 4 consecutive trials of 30 min, starting at 10:00. On the first and second day, animals received access to saccharin and vinegar, respectively. A day before the beginning of the test, a base line was established in a session with the same trial structure but with all the rats receiving access to water in the drinking tubes during the trials

The data were analysed using analyses of variance (ANOVAs), adopting a statistical significance criterion of $p < .05$. Effect sizes for ANOVAs are reported as partial eta squared and those for pairwise comparisons are reported using Cohen's d . The 95% confidence intervals (CIs) around the effect sizes are also reported in parentheses following the effect size.

2.2 Results and discussion

FIRST GENERATION (G1)

The top panel of Figure 1 shows group mean consumptions (ml) during the four weeks of the preexposure phase of Experiment 1. Clearly, consumption of saccharin in group SA was higher than consumption of water in groups NP and consumption of the multiple flavoured solutions received by group N. An Analysis of Variance (ANOVA) 3 (Group) x 4 (Week) conducted with these data revealed a significant main effect of Group, $F(3, 27) = 13.06$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.59$, 95% CI [0.27, 0.71]. Post-hoc comparisons conducted with Duncan test revealed that Group SA consumed more than Groups N and NP. Neither the main effect of Week, $F(3, 81) = 1.52$, $p = 0.215$, nor the interaction Group x Week $F(9, 81) = 0.40$, $p = 0.930$, were significant.

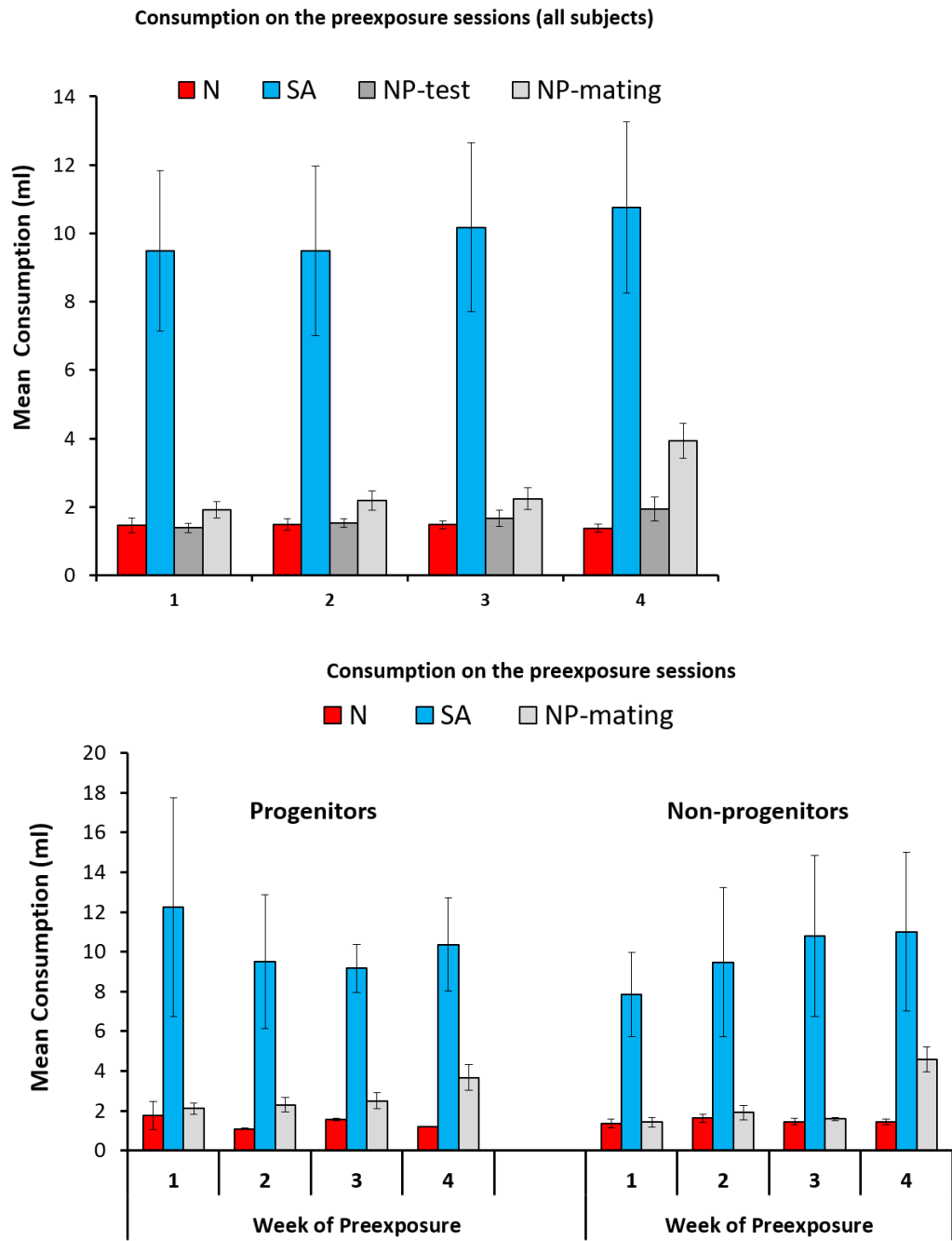


Figure 1. Experiment 1, Generation 1. *Top panel:* Group mean consumptions (ml) during the four weeks (each one consisting of seven sessions with 3 trials) of the preexposure phase of Experiment 1. *Bottom panel:* Comparison of performance of progenitors (i.e., rats that contribute with offspring to G2) and non-progenitors within each group. Vertical bars represent the standard error of the mean (SEMs). Group N received two consecutive and identical sequences of 42 different flavors during the exposure; Group SA received exposure to saccharin during all the trials of exposure; Groups NP received water during those trials.

In the bottom panel of Figure 1, we differentiate the performance during the preexposure of those rats that subsequently became progenitors or non-progenitors. It is relevant to check whether the rats that contributed to G2 with its offspring showed a representative performance relative to that showed by the entire group and the subgroup of rats that finally were not progenitors. As it can be observed, the patterns of results showed by progenitors or non-progenitors were very similar.

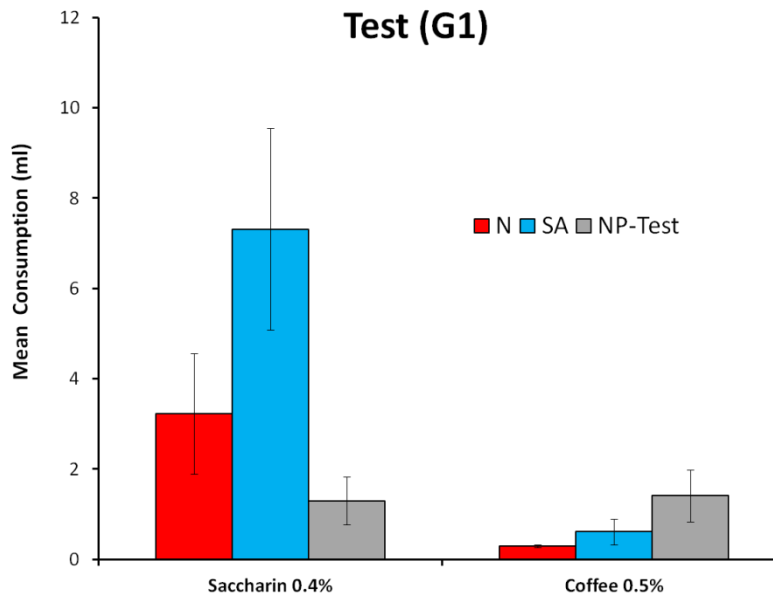


Figure 2. Experiment 1, Generation 1. Group mean consumption (ml) during the tests with saccharin and decaffeinated coffee. Vertical bars represent the standard error of the mean (SEMs). Prior to this test, Group N had received two consecutive and identical sequences of 42 different flavors during the exposure; Group SA had received exposure to saccharin during all the trials of exposure; Groups NP had received water during all those training trials.

The Figure 2 shows the group mean consumption of saccharin and coffee on test, after the preexposure phase. The consumption of the coffee solution was relatively low in all the groups N, SA and NP-test, presumably reflecting a neophobic reaction since this flavour was novel for all groups. There were, however, clear differences in the consumption of saccharin, with group SA showing the greatest consumption, and group NP-test showing the lowest consumption. Group N showed an intermediate level of consumption.

An ANOVA 3 (Group) x 2 (Stimulus) conducted with these data revealed a main effect of Stimulus, $F(1,21) = 12.22$; $p = 0.002$, $\eta^2 = 0.37$, 95% CI [0.06, 0.58], whilst the main effect of Group was borderline, $F(2,21) = 3.12$; $p = 0.065$, $\eta^2 = 0.23$, 95% CI [0.00, 0.44]. The Group x

Stimulus interaction was significant, $F(2,21) = 4.72$; $p = 0.020$, $\eta^2 = 0.31$, 95% CI [0.01, 0.52]. Further analyses conducted in order to explore the source of the Group X Stimulus interaction revealed group differences in the consumption of saccharin, $F(2,23) = 4.004$; $p = 0.034$, $\eta^2 = 0.26$, 95% CI [0.00, 0.47], with Duncan tests showing that Group SA consumed more saccharin than group NP-test. No group differences were found in the test with coffee, $F(2,23) = 2.350$; $p = 0.120$. On the other hand, the only group that clearly consumed more saccharin than coffee was Group SA, $t(7) = 2.974$, $p = 0.021$, $d = 1.49$, 95% CI [0.21, 2.70]; the same trend was observed in Group N, but it fell close to the significance level, $t(7) = 2.175$, $p = 0.066$. In the case of Group NP-test, no significant differences were found between consumption of saccharin and coffee, $t(7) = 0.156$, $p = 0.880$.

In spite of the presence of differences between the groups in the level of consumption during the experimental sessions, groups did not differ in the overall amount of filtered water consumed daily out of the experimental sessions: 1001.69 ml ($SD = 211.49$) in group SA; 1099.25 ml ($SD = 251.58$) in group NP and 1039.89 ml ($SD = 120.06$) in group N, $F(2,30) = 0.576$; $p = 0.569$.

In addition, animals from the different groups did not differ in their weights, neither before the starting of the preexposure, $F(2,22) = 0.022$; $p = 0.978$, either before the mating phase, $F(2,22) = 0.017$; $p = 0.983$ (Top panel of Figure 3). In the bottom panel of Figure 3, we differentiate the body weight of those rats that subsequently became progenitors or non-progenitors. As it can be observed, the weights of progenitors and non-progenitors were very similar at both before the exposure and before the mating phase.

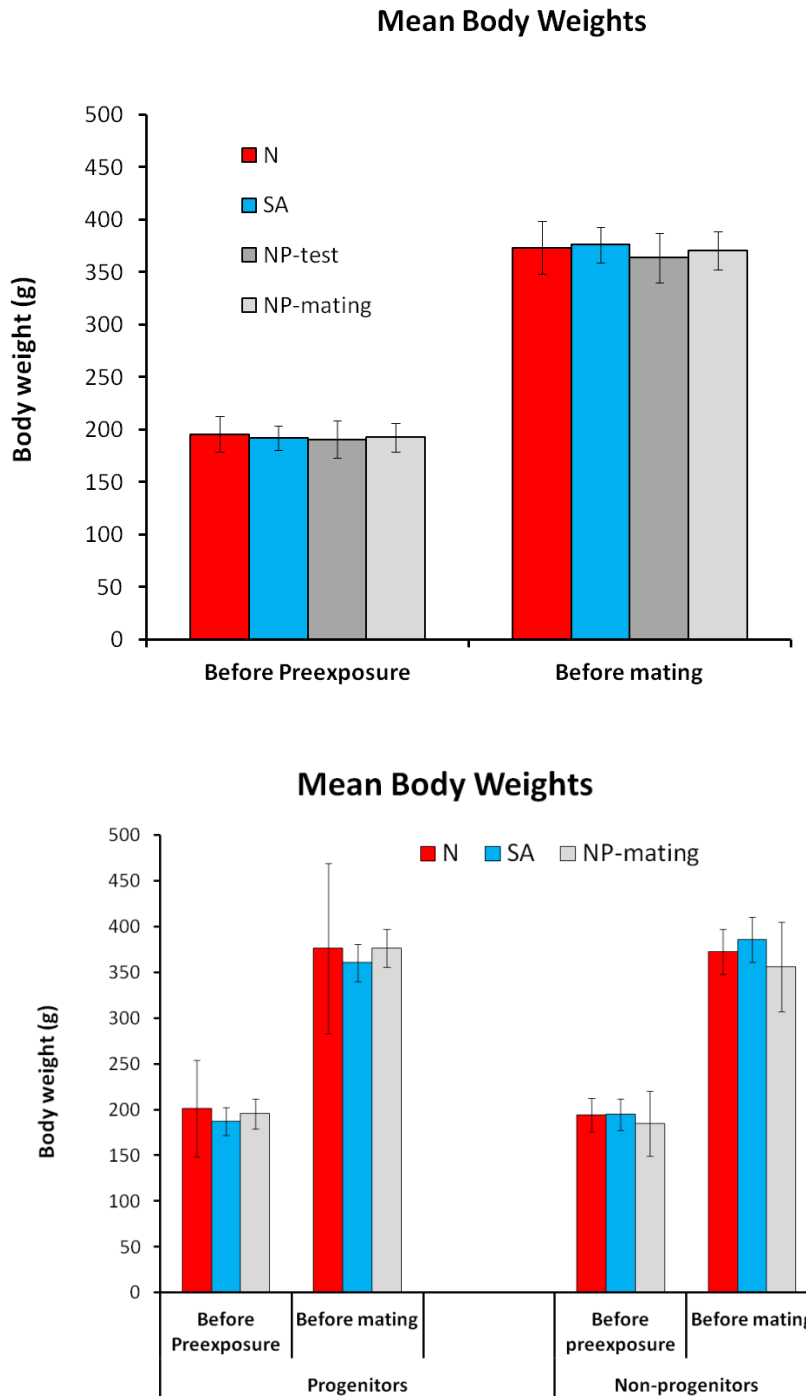


Figure 3. Experiment 1, Generation 1. *Top panel:* Group mean body weights (g) before preexposure and before the mating phase. *Bottom panel:* Comparison of these weights between progenitors (i.e., rats that contribute with offspring to G2) and non-progenitors within each group. Vertical bars represent the standard error of the mean (SEMs).

SECOND GENERATION (G2)

The body weights of the animals before the Test 1 (when they were approximately 30 days old; range: 27-33) were: 87.62 g ($SD= 8.18$), 90.97 g ($SD= 18.98$) and 91.87 g ($SD=7.93$) for animals in Groups G2-N, G2-SA, and G2-NP-mating, respectively. These values did not differ significantly, $F(2, 47) = 0.492$, $p = 0.615$. The day before this test, a base line for it was established. A session with the same trial-structure was run but, critically, all the animals received access to water in all the trials. A 3 (Group) x 2 (Sex) x 8 (Trials) ANOVA with these consumptions of water revealed no significant effects or interactions, $F_s < 0.57$, $p_s > 0.570$.

Figure 4 shows the results of the Test 1. As it can be observed, the general level of consumption was quite low, which it might be reasonable since the duration of each trial was quite short (5 min). There was no clear indication of group differences in the consumption of any of the 8 flavoured solutions presented. A 3 (Group) x 2 (Sex) x 8 (Stimulus) ANOVA with these data revealed only a significant main effect of Stimulus, $F(7, 294) = 19.88$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.32$, 95% CI [0.22, 0.38]. None of the remaining main effects and interactions were significant, $F_s < 3.21$, $p_s > 0.080$.

The effect of Stimulus was due to several differences among the level of consumption of some of the flavoured solutions, which possibly indicates differences in their palatability and/or an effect of the order of presentations (with the first solutions being more likely to be consumed than the latter ones). Animals consumed more saccharin than the remaining 7 flavoured solutions, $t_s(31) > 5.09$, $p_s < 0.0001$, $d_s > 1.49$, 95% CI [0.68, 1.85]. Consumption of coffee was significantly greater than consumption of bitter orange, carrot, eucalyptus, oregano and geranium, $t_s(31) < 5.88$, $p_s < 0.0001$; $d_s > 1.47$, 95% CI [0.85, 2.08]. Also, consumption of oregano was lower than consumption of geranium, $t(31) = 2.11$, $p = 0.043$, $d = 0.53$, 95% CI [0.02, 1.03] and peanut, $t(31) = 2.20$, $p = 0.035$, $d = 0.55$, 95% CI [0.04, 1.06].

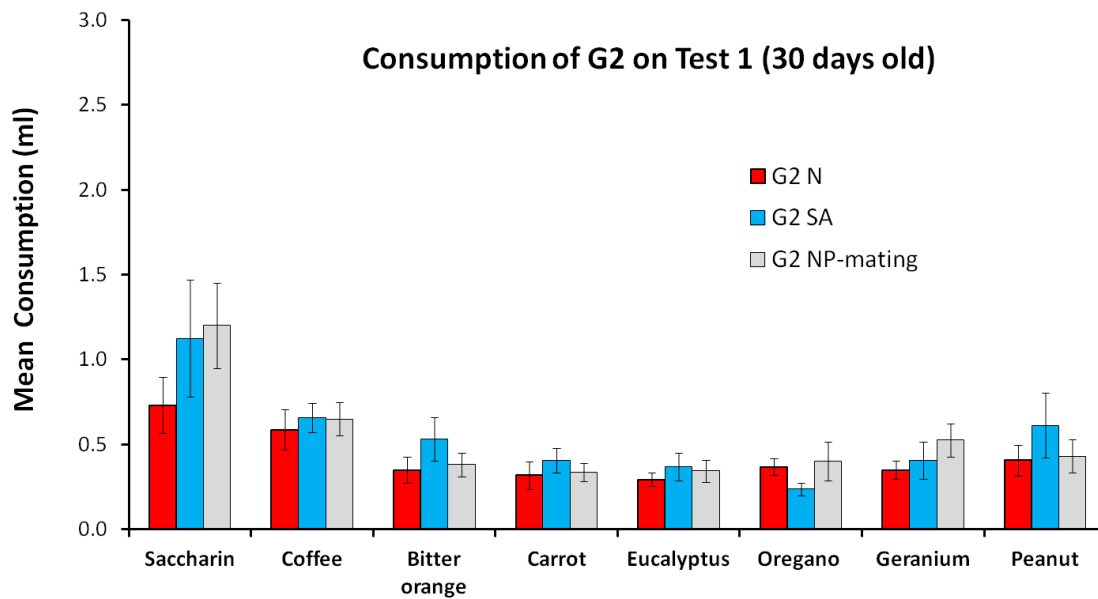


Figure 4. Experiment 1, Generation 2. Group mean consumption (ml) of 8 different flavoured solutions on Test 1. On this test, subjects were 27-33 days old. Vertical bars represent the standard error of the mean (SEMs). The animals of all the groups were naïve with respect to the exposed flavors. Fathers of Group G2-N received exposure to two sequences of 42 flavoured solutions. Fathers of Group G2-SA received equivalent exposure but only to a solution of saccharin. Fathers of Group G2-NP did not have experience with any flavoured solution and just drank water.

The level of consumption on this test was extremely low, perhaps because of two reasons: the shortness of the test trials and the short age of the animals. So, there are grounds to think that our procedure did not result sensitive enough to detect possible differences in the preference for and/or the valance of the test flavors. We aimed to improve the test procedure in Test 2.

The body weights of the animals before this second test (when they were approximately 60 days old; range 57-63) did not differ significantly: not in males, with 272.72 ($SD=31.09$), 274.16 g ($SD= 47.11$), and 275.84 g ($SD=28.56$) for animals in groups G2-N, G2-SA, and G2-NP-mating, respectively, $F(2, 47) = 0.015$, $p = 0.986$; neither in females, 185.09 ($SD=19.73$), 201.99 g ($SD= 53.37$) and 206.25 g ($SD=45.37$) for animals in groups G2-N, G2-SA, and G2-NP-mating, respectively, $F(2, 47) = 0.568$, $p = 0.575$.

A day before the beginning of the test, a session with the same trial-structure was run in which, critically, all the animals received access to water in all the trials. A 3 (Group) x 2 (Sex) ANOVA with these consumptions of water revealed no significant effects or interactions, $F_s < 1.476$, $p_s > 0.231$.

Figure 5 shows the results from Test 2 consisting of one session of testing with saccharin and other with vinegar. As can be seen, Group G2-SA exhibited a higher consumption of saccharin than groups G2-N and G2-NP-mating. General consumption of vinegar was much lower in all the groups and there were not notable differences among groups.

A 3 (Group) x 2 (Sex) ANOVA with the data from the test with saccharin revealed a main effect of Group, $F(2, 42) = 4.33, p = 0.029, \eta^2 = 0.14$. Neither the main effect of Sex, $F(1, 42) = 1.99, p = 0.167$, or the Group x Sex interaction, $F(2, 41) = 3.08, p = 0.06$, resulted to be significant. Subsequent post-hoc comparisons revealed that Group G2-SA drank more saccharin than Groups G2-N and G2-NP-mating. A 3 (Group) x 2 (Sex) ANOVA with the data from the test with vinegar revealed no significant main effect or interactions: Group, $F(2, 41) = 0.12, p = 0.886$; Sex, $F(1, 42) = 3.31, p = 0.076$, and Group x Sex interaction, $F(2, 41) = 0.238, p = 0.789$.

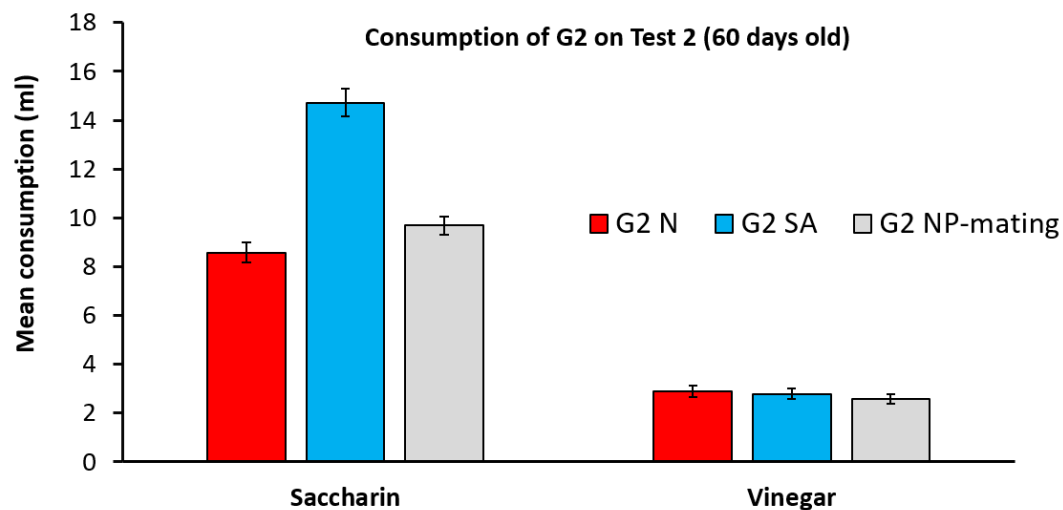


Figure 5. Experiment 1, Generation 2.: Group mean consumption (ml) of saccharin and vinegar flavoured solutions on Test 2. On this test, subjects were 57-63 days old. Vertical bars represent the standard error of the mean (SEMs). Animals had some prior and equivalent brief experience with saccharin on Test 1. Vinegar was a novel flavour for all the groups. Fathers of Group G2-N received exposure to two sequences of 42 flavoured solutions. Fathers of Group G2-SA received equivalent exposure but only to a solution of saccharin. Fathers of Group G2-NP did not have experience with any flavoured solution and just drank water.

A possible limitation of the result obtained is the small number of litters from which the offspring of each group of Generation 2 were obtained. It could have been the case that, by chance, the litters of Group SA came from males with a genetic predisposition to consume more saccharin (e.g., Nachman, 1959). Recall, however, that in the first generation results we showed that the consumption of the parental parents (from which the Generation 2 offspring were derived) was no greater than that shown by the non-parental parents. Furthermore, it seems clear that the different consumption of the litters of each group was only different in the case of the saccharin test, with no differences observed in either the baseline session in which the animals were exposed to water or in the vinegar test (see Figure 6). In summary, therefore, it does not appear that the observed effect can be easily ascribed to a random effect of litter selection.

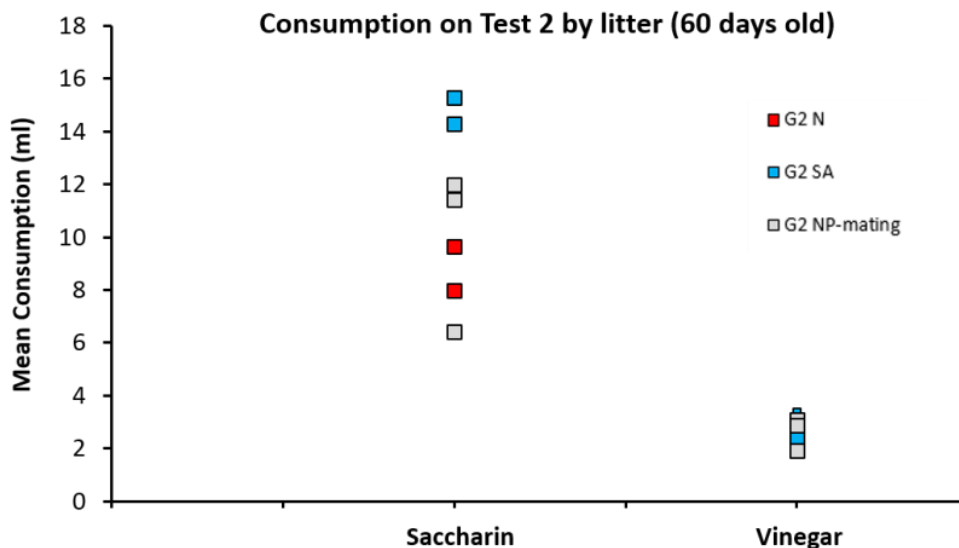


Figure 6. Experiment 1, Generation 2: Each point represents the mean consumption (ml) of saccharin (left) or vinegar (right) performed by a litter on Test 2. On this test, subjects were 57-63 days old. Animals had some prior and equivalent brief experience with saccharin on Test 1. Vinegar was a novel flavour for all the groups. The fathers of the two litters of Group G2-N received exposure to two sequences of 42 flavoured solutions. The fathers of the two litters of Group G2-SA received extended exposure to a solution of saccharin. The fathers of the three litters of Group G2-NP did not have experience with any flavoured solution and just drank water.

2.3 Discussion of Experiment 1

The results of Test 1 and 2 did not provide evidence in favour of the hypothesis we initially wanted to test with this experiment. We wanted to test a possible inheritance of a generalization effect of habituation to neophobia. The results we obtained in the first generation already suggested that the conditions were not in place to generate a generalization effect of habituation to neophobia. If this effect had been present, the consumption of the exposed solutions should have increased progressively during training. The consumption shown by this group remained very low during the exposure (at a level similar to or even lower than the level of water consumption shown by the NP groups). This indicated that probably the parameters we chose for the training of Group N were not the most appropriate. Perhaps the solutions used as "n" stimuli, due to their composition and/or concentration, were not sufficiently palatable and consumption was so low that the exposure was not effective.

The clearest result observed in this first generation was the higher constant consumption of Group SA with respect to Groups N and NP. Taking into account that the animals in the experiment were not deprived, and that the NP Group allows us to establish a base level of water consumption under these conditions, the high consumption of the SA Group indicates a preference for the sweet taste of this substance.

Not surprisingly, therefore, the results of the final test with the first-generation subjects were consistent with the presence of a preference for saccharin in Group SA and with the absence of clear evidence of a generalization effect of habituation to neophobia in Group N. Nevertheless, we thought it plausible to expect some sort of differential effect of the treatments employed in the offspring of the trained subjects and went on to test it. Two tests were conducted with this offspring. The first was not very informative. We observed very low intakes of the test solutions, something that indicated that we had again got the test parameters wrong. Under these conditions it seemed difficult to have room to observe differences in consumption between the groups. Consequently, a second test was designed to obtain more sensitivity: only two flavors were tested, one per daily session, and the duration of the sessions was extended from 5 minutes in Test 1 to 120 minutes in Test 2.

According to the hypothesis of the possible inheritance of a generalization of neophobia habituation, subjects in Group G2-N should have consumed more saccharin and vinegar than subjects in Group G2-NP. In addition, this G2-N group should also have consumed

more vinegar than the G2-SA Group. This pattern of results was not found. However, a notable difference was found in saccharin consumption during the test. Subjects in Group G2-SA consumed noticeably more than subjects in Groups G2-N and G2-NP. The results of the subjects in Group G2-SA were thus consistent with the phenotype we had observed in their parents. It appeared that we had accidentally encountered an unexpected heritability effect. Instead of an inheritance of generalization of taste neophobia we had found a result compatible with the inheritance of an increased preference for saccharin taste.

It is true that the results obtained in Test 2 could have been affected by the subjects' experience in Test 1. However, it should be kept in mind that the three groups in generation 2 had the same type of experience in Test 1 and, moreover, were not exposed to different amounts of one or the other flavor. All groups consumed similar and equivalent amounts of the 8 flavors presented in Test 1, with a brief 5-min exposure to each flavor. Taking this into account, it seems unlikely that the result obtained in Test 2 was due to some artifact derived from the experience of the subjects in Test 1. Other variables that can be ruled out as artifacts are those derived from the general condition of the subjects: throughout the experiment, the animals of all groups showed equivalent weights and equivalent intakes in all the baselines of the tests in which they consumed water.

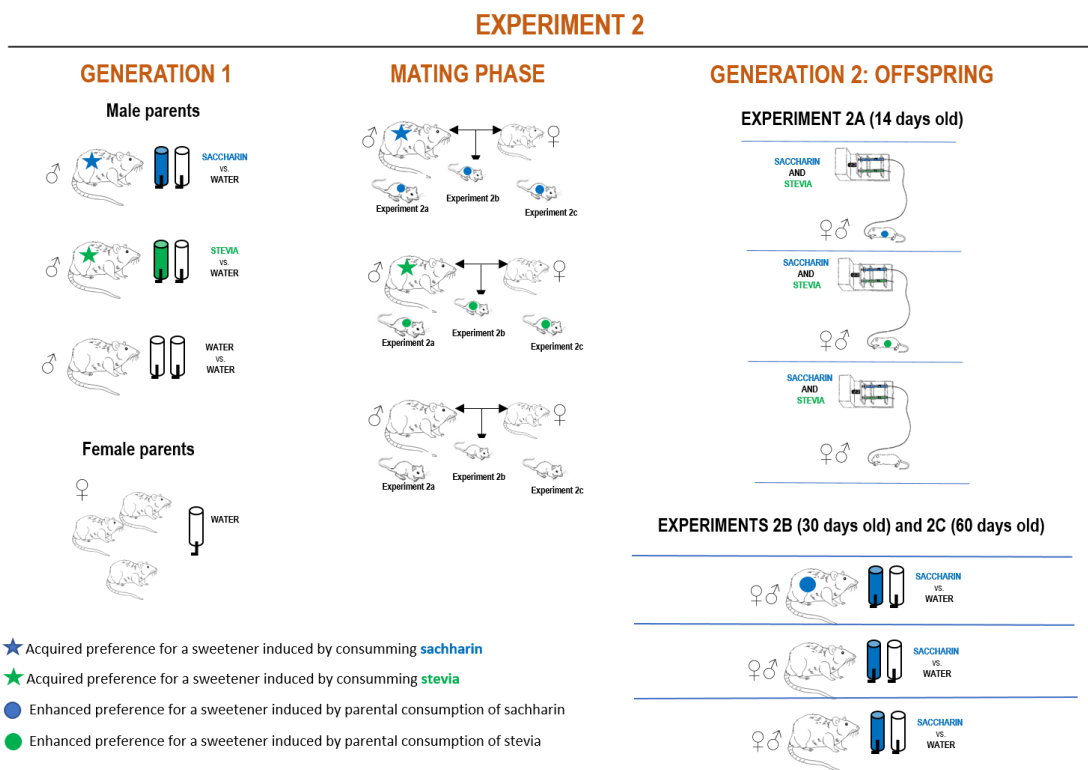
Another possible artifact that could have led to the result obtained is that, by chance, the males of the SA group that contributed their offspring to the G2-SA group had a special genetic predisposition to saccharin taste preference. This characteristic would have been inherited by their progeny and would explain the high consumption in the saccharin test. This hypothesis does not seem plausible in the light of the comparisons we made between Generation 1 subjects who did or did not produce offspring in Generation 2. In none of the comparisons we made, neither in weights nor in consumption of water or flavored solutions, were possible differences appreciated. Finally, the fact that differences appeared in the saccharin test but not in the vinegar test suggests that the observed effect could be a stimulus-specific learning inheritance effect: it appears that saccharin-exposed parents transmitted some kind of information through their germline to their offspring. Experiment 2 was designed to obtain more robust evidence to test this hypothesis.

3. Experiment 2

In this experiment, there were four groups of first generation (G1) male rats (see Table 2), which received different fluid exposure schedules. All groups received 24-h double-bottle training for 20 days. All subjects had access to fluids in their home cages through two drinking tubes. For animals in Group SA-20, during the 20 days of training, one tube contained a 0.4% saccharin solution and the other contained water. Animals in Group SA-10 received identical training to SA-20 on the last 10 days of exposure, but on the initial 10 days the two drinking tubes contained water. Animals in the STV-20 Group received similar training to the SA-20 Group, but had access to stevia (2% stevia), a sweetener different from saccharin: for each animal, one of the tubes contained stevia and the other tube contained water. Finally, rats in Group NP received no exposure to any sweetener or flavor, having access to water through the two tubes. After exposure, a two-bottle preference test was performed. In this test, all animals received saccharin in one tube and stevia in the other.

Twelve days after the test, all male rats from the 4 groups were paired with experimentally naïve female rats. The offspring resulting from this mating were assigned to four experimental conditions, from three experiments, according to the treatment received by their male parents: Groups G2-SA-20, G2-SA-10, G2-ST-20 and G2-NP (where G2 indicates that these groups constitute the second generation of the study).

Table 2. Design of Experiment 2.



Note: In Experiment 2, Group SA-20, was exposed during 20 days to a 0.4% saccharin solution and to water. Group SA-10 received identical training to SA-20 on the last 10 days of exposure, but on the initial 10 days the two drinking tubes contained water. Group STV-20 was exposed during 20 days to a 2% stevia solution and to water. Group NP received no exposure to any sweetener or flavor, having access to water through the two tubes. After exposure, a two-bottle preference test was performed. After test, all rats have a rest period of 12 days, followed by a mating phase to obtain the offspring of those experimental groups. Three experiments were conducted with result offspring: In Experiment 2a (13 days old) the appetitive and aversive responses to saccharin and stevia was evaluated using TRT procedure. In Experiments 2b (30 days old) and 2c (60 days old) identical procedure was employed, a saccharin two-bottle preference test.

In Experiment 2a, when the pups were 13 days old, a taste reactivity test (TRT) was performed with saccharin and stevia. Possible differences in orofacial responses to tastes and locomotor activity during testing were evaluated. If the possible heritability effect of increased saccharin preference led to a change in the hedonic value of saccharin-specific taste, we expected to observe more positive reactions (mouthing), and less locomotor activity, to saccharin in the G2-SA-20 and G2-SA-10 groups relative to the G2-STV-20 and G2-NP groups. A similar heritability effect specific to stevia taste would lead us to expect more positive reactions to stevia in the G2-STV-20 group relative to the G2-SA-20, G2-SA-10 and G2-NP groups. However, if the effect observed in Experiment 1 was due to prolonged exposure to a sweetener, we would expect to observe more positive reactions (mouthing) to saccharin and stevia in the G2-SA-20, G2-SA-10, and G2-STV-20 groups relative to the G2-NP group. Any effect of saccharin exposure length on the magnitude of the heritability effect should be ascertainable through a comparison of the G2-SA-20 and G2-SA-10 groups.

In Experiments 2b and 2c, a saccharin preference test was performed. Specifically, a two-bottle preference test was conducted, with one of the presented measuring tubes containing saccharin and the other containing water. In Experiment 2b, the test was conducted when the subjects were 30 days old. In Experiment 2c, the test was performed when the subjects were 60 days old. In this way, we wanted to more cleanly test the results of Experiment 1 in which the enhanced saccharin preference phenotype in the G2-SA group was observed in the 60-day-old test but not in the 30-day-old test. In addition to testing the robustness of these previous results, the design allowed us to probe (as in Experiment 2a) the degree of specificity of the effect, i.e., whether the increased preference effect would be caused specifically by parental exposure to saccharin (Groups G2-SA-20 and G2-SA-10) or by exposure to any other sweetener (Group G2-STV-20). And, again, any effect of saccharin exposure length on the magnitude of the heritability effect should be ascertainable through a comparison of the G2-SA-20 and G2-SA-10 groups.

3.1 Method

FIRST GENERATION

Subjects, apparatus, and stimuli

The male subjects of the G1 were 32 experimentally naïve Sprague-Dawley rats (mean ad lib weight: 123 g, range: 70–164 g; 30 days old at the time of starting the experiment) supplied by the *Animal Facility Service-SGIker* of the *University of the Basque Country* (Leioa,

Vizcaya, Spain). Animals were housed, and maintained in the same conditions as those described in Experiment 1.

The female subjects of G1 were 32 experimentally naïve Sprague-Dawley rats (mean weight of 224.5 g; range: 189–271 g at the day before the start of the mating phase). They were supplied 40 days later than the male animals, also by the *Animal Facility Service-SGIker of the University of the Basque Country* (Leioa, Vizcaya, Spain). Female subjects were housed and maintained in the same maternity cages and conditions as those described in Experiment 1.

The saccharin solution was identical to those used in Experiment 1. In addition, a solution of 2% (w/vol) stevia (Truvia[®], supplied by the Cargill and Azucarera Iberia corporation, Spain) was used.

Procedure

Exposure phase. Rats were randomly assigned to one of four equal-sized ($n = 8$) experimental groups, SA-20, SA-10, STV-20, and NP, the day before starting the exposure phase. This phase lasted for 20 days during which all the animals received continuous access to food and were given access to fluid in two drinking tubes (separated by a distance of 15 cm), each containing 50 ml of the appropriate fluid (saccharin solution, stevia solution, or water). The left/right position of the tubes was switched daily to control for the possibility of a position preference. On each day, the animals in Group SA-20 received access to the saccharin solution in one tube and access to water in the other. Animals in Group SA-10, however, received access to water in both tubes during the first 10 days of exposure, and then for the last 10 days received identical treatment to that given to Group SA-20. Animals in Group STV-20 received access to the stevia solution in one tube and access to water in the other during the 20 days of exposure, whilst subjects in Group NP received access to water in both tubes during the 20 days of this phase. The consumption of the subjects was measured every day at 12:00. Once the exposure phase had finished, animals remained in their home cages for three further days with continuous access to food and the standard water bottles (rather than the drinking tubes previously employed).

Test consumption of saccharin and stevia. On the following day, all the animals were given a test trial that consisted of a 90-min presentation of the two drinking tubes (from 10:00 to 11:30). For half of the animals in each group, both tubes contained 50 ml of the saccharin solution, and for the remainder, the tubes contained 50 ml of the stevia solution. On the next morning, the animals that had been tested with saccharin the previous day were given an

identical test trial with stevia, and vice versa. After the second day of test, all the rats spent 13 days in their home cages under food and liquid ad lib conditions.

Mating phase: On the morning 12 days after the test, the mating phase began, by housing each of the male rats in the cage of one of the 32 experimentally naïve female rats. The female rats had spent a previous quarantine period of 15 days (with ad lib access to food and filtered water).

2ND GENERATION (EXPERIMENTS 2A, 2B AND 2C)

Subjects, apparatus, and stimuli

The subjects were 169 Sprague–Dawley rats (105 tested in Experiment 2a; 32 tested in Experiment 2b and 32 tested in Experiment 2c) which were the offspring of first generation. The animals were assigned to each experimental condition as a function of the experimental treatment received by their fathers. In Experiment 2a, Groups G2-SA-20 (n=32), G2-SA-10 (n=15), G2-STV-20 (n=32) and G2-NP (n=26) were formed. Unfortunately, due to problems with the cannulae in the TRT of 3 subjects in group G2-SA-20 and 1 subject IN Group G2-STV-20, these subjects had to be discarded, leaving the final composition of the groups as follows in Experiment 2a: Groups G2-SA-20 (n=29), G2-SA-10 (n=15), G2-STV-20 (n=31) and G2-NP (n=26). In Experiments 2b and 2c, the same four experimental conditions had a smaller size (n=8).

For subjects in Experiment 2a the experiment began when they were approximately 13 days old (range: 13-14 days); for subjects in Experiment 2b, the experiment began when they were approximately 30 days old (range: 27-29 days), whilst for subjects in Experiment 2c, the experiment began when they were approximately 60 days old (range: 61-63 days).

In Experiment 2a, 49 females and 52 males were assigned to the experimental conditions, with males having a mean weight of 25.74 g (range: 16.98–34.78 g) at the start of the experiment, and females having a mean weight of 25.50 g (range: 19.04–36.10 g). The subjects in Group G2-SA-20 (15 males and 14 females) were derived from 6 litters; subjects in Group G2-SA-10 (9 males and 6 females) were derived from 2 litters; subjects in Group G2-ST-20 (16 males and 15 females) were derived from 4 litters; and subjects in Group G2-NP (12 males, 14 females) were derived from 4 litters.

In Experiment 2b, 17 females and 15 males were assigned to the experimental conditions, with males having a mean weight of 67 g (range: 52–84g) at the start of the

experiment, and females having a mean weight of 61 g (range: 47–76 g). The subjects in Group G2-SA-20 (4 males and 4 females) were derived from 3 litters; subjects in Group G2-SA10 (4 males and 4 females) were derived from 2 litters; subjects in Group G2-ST20 (4 males and 4 females) were derived from 4 litters; and subjects in Group G2-NP (3 males, 5 females) were derived from 4 litters.

In Experiment 2c, 17 females and 15 males were assigned to the experimental conditions, with males having a mean weight of 246 g (range: 196–288 g) at the start of the experiment, and females having a mean weight of 176 g (range: 140–195 g). The subjects in Group G2-SA-20 (4 males and 4 females) were derived from 4 litters; the subjects in Group G2-SA-10 (4 males and 4 females) were derived from 2 litters; the subjects in Group G2-ST-20 (4 males and 4 females) were derived from 4 litters; and the subjects in Group G2-NP (4 males and 4 females) were derived from 4 litters.

The saccharin and stevia solutions were identical to those used in the procedure of the first generation.

Procedure

Experiment 2a

Taste reactivity test (TRT): The test was conducted when pups were 13/14 days old, following the procedure described in Arias and Chotro (2005a; 2005b) and Gaztañaga (2016). 30 minutes before the test, pups were separated from the mother and placed in holding chambers (15 cm x 8 cm x 15 cm) maintained at 28 to 30°C with heating pads. Subjects were cannulated intraorally (this procedure is subsequently deeply described), so that they could receive the flavored solutions from a syringe placed in an automated pusher pump (KDS Scientific). Prior to the test, the bladders of the subjects were vaccinated by gently brushing the genital area, and after this procedure, the body weights were registered and pups were placed into heated individual chambers. The test was carried out in a trapezoidal shaped chamber with a transparent glass front wall, and the rest of the walls and floor were mirrored, to allow observation of the orofacial expressions and body movements of the pups in any position. All subjects led to two experimental sessions to be exposed to both saccharin and stevia, 5 minutes each one, divided into 5 trials, where in each trial they received the sweetener diluted in water (saccharin 0.4% and stevia 2%). The order of saccharin and stevia solutions administration was counterbalanced, so randomly half of the subjects were exposed firstly to saccharin and latterly to stevia (codified in data analyses as Order 1) while the other

half was exposed firstly to stevia and latterly to saccharin (codified in data analyses as Order 2).

Intraoral infusions were performed using an automated pump scheduled to administer the fluids at a rate of 0.1 ml/min per infusion. This pump was connected to the intraoral cannula of each pup. Infusions were 15s long, separated by intervals of 45s; in other words, pups received one infusion per minute, and the volume of each infusion was 0.025 ml. After finishing the first experimental session, subjects were cleaned by infusing filtered water via the cannulae, using a clean new 10ml syringe, in order to avoid any contamination of the employed sweetener solution on next test. After that, animals were placed again into heated holding cages, before they were tested again in a second sessions to the second flavoured solution, saccharin or stevia, depending on Order condition. Once the entire litter was tested, pups were returned to the mother, and next litter subjects were tested. All experimental sessions were videotaped for subsequent analysis of both orofacial responses and to measure locomotor activity. Two cameras were employed to record the experimental sessions, and each one contained the experimental session of two subjects, given that two pups at same time were evaluated, one per section of the chamber.

Based on the literature with TRT procedures, we considered two categories of orofacial reactions/responses: hedonic/appetitive and aversive. Within the appetitive reactions we included mouthing (with and without tongue protrusion) and paw licking. Within the category of aversive responses, different behaviors were included: gaping, head shaking, forelimb flailing, paw treading, chin rubbing, and wall climbing. Two rating judges, blinded to the experimental conditions, conducted the evaluations. Locomotor activity during test was also codified, as set out below.

Cannulation. Cannulae placed in the subjects' right cheeks were used to allow them to receive the sweeteners diluted in water through syringes containing these solutions. The cannulae creation and procedure to implant it in pups was conducted by following the procedure employed by Arias and Chotro (2005a; 2005b) and Gaztañaga (2016): cannulas were made from 7-cm sections of polyethylene tubing (i.d. $\frac{1}{4}$.28 mm). One end of the section was heated to form a small flange. The cannula was placed on the internal surface of the pup's right cheek. The wire was then pushed through the oral mucosa until the flanged end of the cannula was positioned over the internal surface of the cheek while the remainder of the cannula exited from the oral cavity. This procedure takes less than 10 second per pup and

induces minimal stress to animals. Then, these cannulas were attached to the syringes employing a PE-50 polyethylene tube, and finally the syringes were put in to the pumps.

Locomotor activity during the TRT: locomotor activity was coded as the general movement of subjects during the trials, frame by frame in the video-analyses, and codified mainly as "distance travelled in meters". For this purpose, we employed video analysis using a free tracker software: "*Tracker: video-analyses and Modeling tool*", a free video analysis and modelling tool built on the Open-Source Physics (OSP) Java framework. After recording the experimental sessions in video, the locomotor activity was codified. After opening the video file, the first of two subjects were codified. After setting the display variable in seconds, and checking the exact moment at which the test began (and therefore the pumps to push the syringes containing saccharin or stevia solutions), before starting, the "calibration rod" tool was used to establish a measurement relationship that corresponded to the size in reality. Once the calibration was established, the following points were established before starting the tracking process: the x , r and y positions as components of the image, as well as the speed and acceleration tools. Once these points had been established, necessary for an adequate and accurate tracking system of the locomotor activity of the subject in the video, it was also established that the tracking of the locomotor activity of the subjects would be measured in metres. Once these steps were completed, the process of coding the subject's locomotor activity, measured as distance in metres, began, always using the space between the subject's ears as a reference point. This tracking process was manual, given that when the automatic mode tracking set was established, it was found that the programme made errors, maybe due to problems of image quality and resolution of the recorded videos.

Thus, manual tracking was carried out frame by frame, with each frame corresponding to 0.04 seconds. A prior analysis of correlation between rating judges was committed, to ensure to ensure high reliability of measurements when using this tool to assess the locomotor activity of the subjects during experimental sessions. The "*distance covered in metres*" measure, which represents the locomotor activity of the subjects during the test, was obtained from the x , r and y position axes of the image: from these axes, the absolute value of the distance travelled in metres per 0.040 seconds of the video was subsequently calculated. The distance covered in the first and last trial of the test, that is, minutes 1 and 5, was coded.

Experiment 2b and Experiment 2c:

Two-bottle tests. On 6 consecutive days between 10:00 to 17:00, the rat received access to two drinking tubes, one containing 50 ml of the 0.4% saccharin solution and the

other containing 50 ml of water. The left/right position of the tubes was switched daily to control for the possibility of a position preference. Outside of this test period, all the animals had unrestricted access to water in standard bottles. Access to food was permanently unrestricted during this phase. Consumption was measured by weighing the tubes before and after the experimental sessions, and was recorded to the nearest 0.1g.

In both experiments, animals were housed, and maintained in the same conditions as those described in Experiment 1. They were fed and watered ad lib until the beginning of the test phase which in Experiment 2b was when the subjects were approximately 30 days old (range: 27-29 days) and in Experiment 2c was when the subjects were approximately 60 days old (range: 61-63 days).

3.2 Results and discussion

FIRST GENERATION

Figure 7 shows the group mean consumptions of fluid across the 20 days of the exposure phase. Subjects in Groups SA-20 and SA-10 showed a greater consumption of saccharin than water, indicating a clear preference for saccharin. Group STV-20 showed a less marked preference for stevia, with greater consumption of this sweetener than water. A set of statistical analyses confirmed these observations. In Group SA-20, there was a greater overall mean consumption of saccharin ($M = 43.07$; $SD = 8.68$) than water ($M = 12.00$; $SD = 2.68$), $t(7) = 10.08$, $p < 0.001$, $d = 5.04$, 95% CI [2.79, 6.84]. In Group SA-10, the overall mean consumption of water during the first 10 days of exposure was similar in both tubes, 14.86 ml ($SD = 1.77$) for consumption of water from Tube 1, and 14.61 ml ($SD = 2.78$) for consumption of water from Tube 2, $t(7) = 0.178$, $p = 0.863$. During the latter 10 days of exposure, there was a greater overall consumption of saccharin ($M = 45.82$; $SD = 4.04$) than water ($M = 10.31$; $SD = 3.13$), $t(7) = 25.90$, $p < 0.001$, $d = 12.95$, 95% CI [6.09, 13.54]. In Group STV-20, the difference between the overall mean consumption of stevia ($M = 23.01$; $SD = 8.61$) and water ($M = 12.57$; $SD = 4.19$) was borderline, $t(7) = 2.33$, $p = 0.052$. Further analyses confirmed the presence of a significant difference between the consumption of stevia and water on Day 2, $t(7) = 4.685$, $p = 0.002$, and a borderline difference on Day 16, $t(7) = 2.187$, $p = 0.065$. In Group NP, the overall mean consumption of water was similar in both tubes, 15.26 ml ($SD = 1.00$) for consumption of water from Tube 1, and 16.69 ml ($SD = 3.09$) for consumption of water from Tube 2, $t(7) = 1.12$, $p = 0.301$.

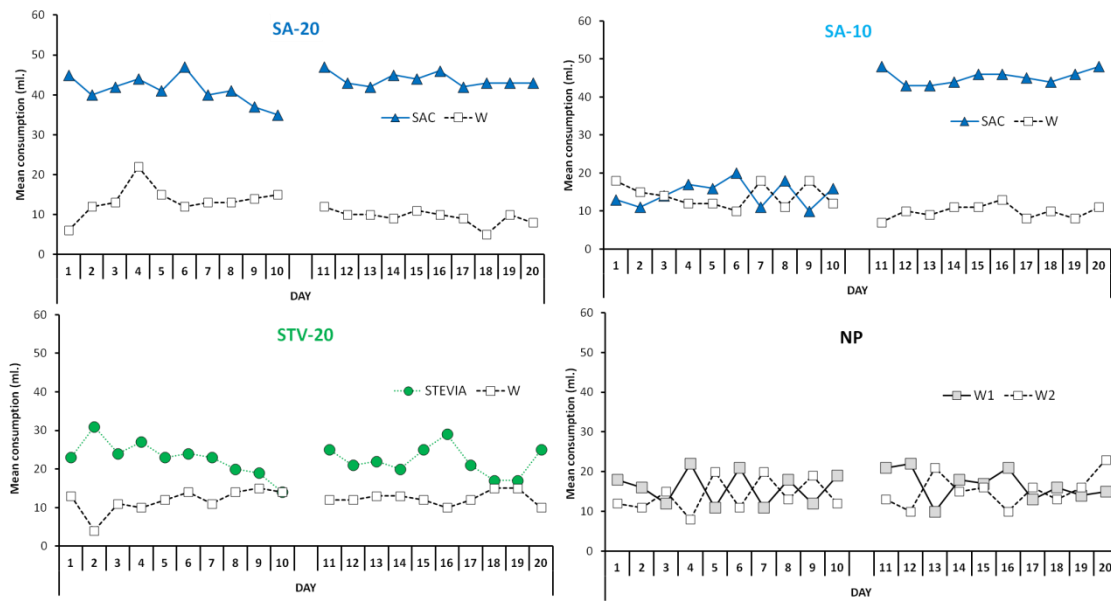


Figure 7. Experiment 2, Generation 1: Group mean consumption of sweetener (saccharin or stevia) and water during the 20 days of exposure. Note that Group SA-10 received water in both tubes for the first 10 days, and from day 11 onwards received saccharin in one tube and water in the other.

Figure 8 shows the group mean consumptions of saccharin and stevia on the test after the exposure phase for G1. Subjects in the groups exposed to sweeteners (Groups SA-20, SA-10, STV-20) consumed more saccharin than stevia, this difference being more marked in the groups exposed to saccharin (Groups SA-20 and SA-10). Subjects in Group NP showed a similar lower consumption of both sweeteners, which might be taken to indicate a certain degree of neophobia to these flavors. The intermediate level of consumption of saccharin shown by Group STV-20 could also be a consequence of neophobia to this substance, but less marked in this case, possibly as a result of generalization from the habituation of neophobia to stevia. Note that there was no sign of these neophobic responses during the exposure phase (in the groups exposed to sweeteners), possibly because in this case we measured consumption of the fluids after 24h, a period of time that may be sufficient for habituation to occur, thus obscuring the detection of these initial and temporary defensive responses.

In Figure 9, we compared the test performance of those rats that subsequently became progenitors or non-progenitors. It is relevant to note that, within-each group, test performance was quite similar in both subgroups of progenitors and non-progenitors.

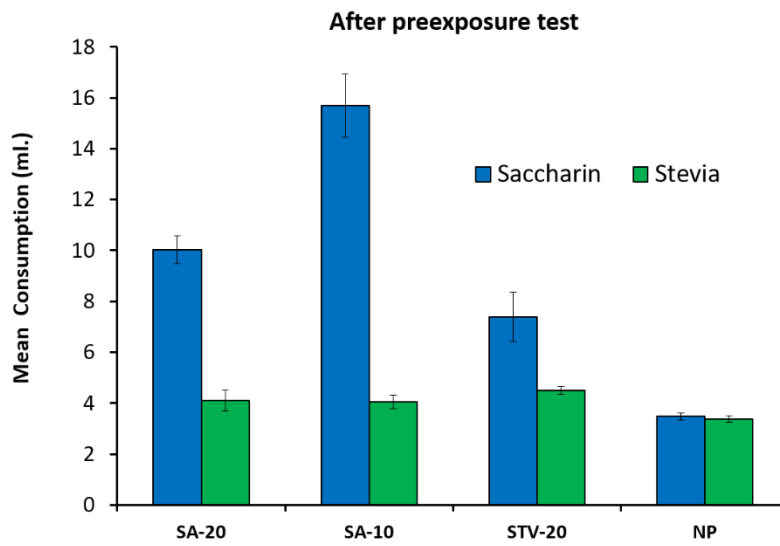


Figure 8. Experiment 2, Generation 1: Group mean consumption (ml) of saccharin and stevia on the test after exposure. Vertical bars represent the standard error of the mean (SEMs). Animals of Groups SA20 and SA10 had received exposure to saccharin during 20 and 10 days, respectively; animals of Group STV20 had received exposure to stevia during 20 days, and animals of Group NP did not receive exposure to any sweetener.

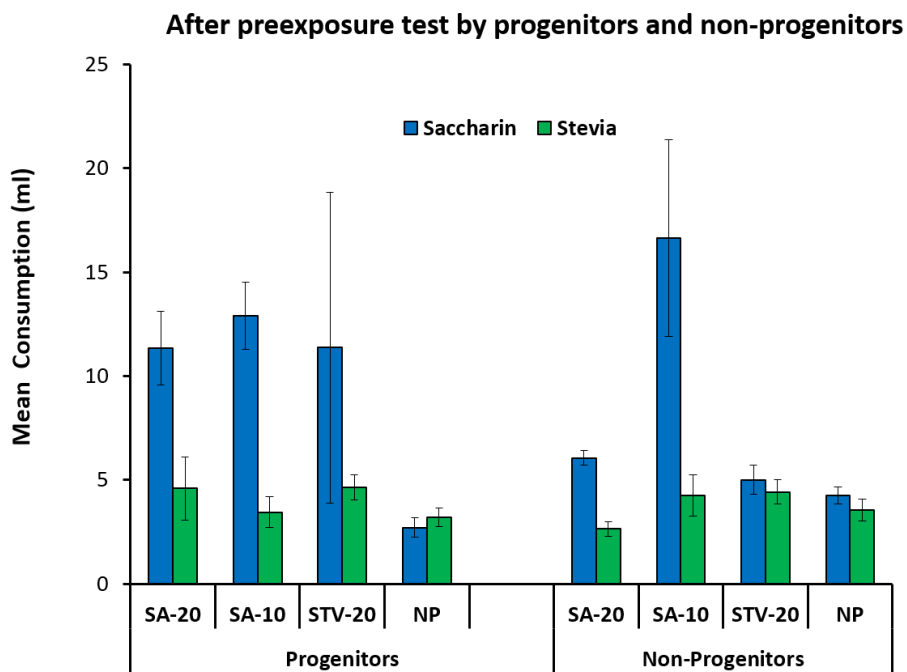


Figure 9. Experiment 2, Generation 1. Comparison of test performance of progenitors (i.e., rats that contribute with offspring to G2) and non-progenitors within each group. Vertical bars represent the standard error of the mean (SEMs). Animals of Groups SA-20 and SA-10 had received exposure to saccharin during 20 and 10 days, respectively; animals of Group STV-20 had received exposure to stevia during 20 days, and animals of Group NP did not receive exposure to any sweetener.

An ANOVA 4 (Group) x 2 (Stimulus) conducted with these data revealed main effects of Group, $F(3,28) = 4.38$; $p = 0.012$, $\eta^2 = 0.32$, 95% CI [0.02, 0.49] and Stimulus, $F(1,28) = 18.01$; $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.39$, 95% CI [0.11, 0.58]. The Group x Stimulus interaction was also significant, $F(3,28) = 4.17$; $p = 0.015$, $\eta^2 = 0.31$, 95% CI [0.01, 0.48]. Further analyses conducted in order to clarify the source of this interaction revealed an effect of Stimulus (more consumption of saccharin than stevia) in the groups preexposed to saccharin (Groups SA-20, SA-10), $t(7) < 2.93$, $p < 0.02$, but not in the non-preexposed Group NP, $t(7) = 0.22$, $p = 0.82$, or the group preexposed to stevia, Group STV-20, $t(7) = 1.11$, $p = 0.30$. In addition, there were group differences in the consumption of saccharin, $F(3, 31) = 4.65$, $p = 0.009$, $\eta^2 = 0.31$, 95% CI [0.03, 0.48], but not in the consumption of stevia, $F < 1$. Post-hoc comparisons conducted with Tukey's HSD test revealed that Group SA-10 consumed more saccharin than Group NP. It is also relevant to note that the different treatments received by the groups did not produce statistically significant differences in their body weight at the beginning of the mating phase (Figure 10): 329.64 g (SD= 32.58) for animals in groups SA20; 319.31 g (SD=31.08) for animals in group SA10; 341.69 g (SD=42.26) for animals in group STV20 and 328.17 g (SD=26.13) for animals in group NP, $F(3, 31) = 0.60$, $p = 0.619$. As it can be observed in Figure 10, the weights of progenitors and non-progenitors were very similar at this moment mating.

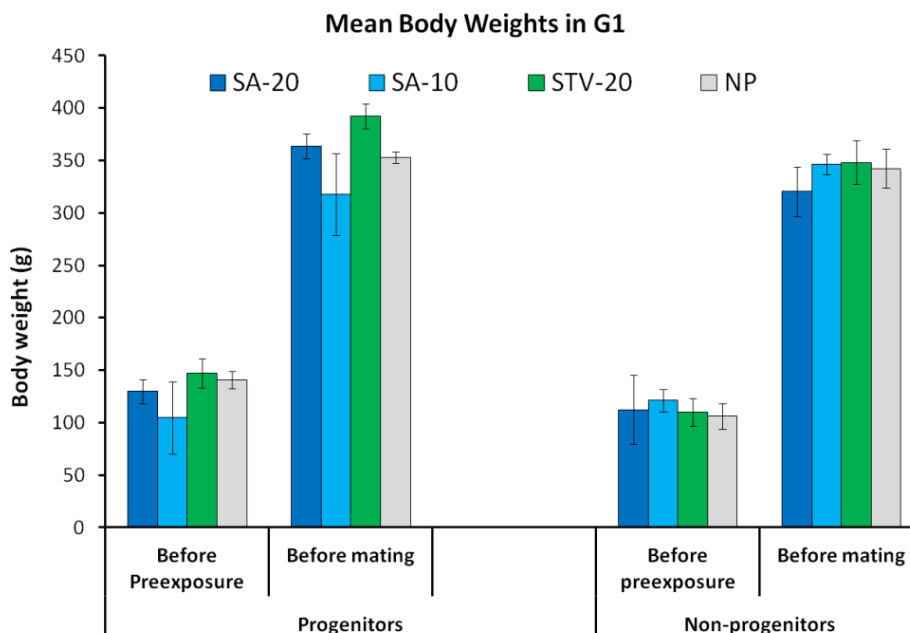


Figure 10. Experiment 2, Generation 1. Mean body weights (g) before the exposure phase and before the mating phase, organized in subgroups of progenitors (i.e., rats that contribute with offspring to G2) and non-progenitors within each group. Vertical bars represent the standard error of the mean (SEMs).

In summary, results from the first generation let us these impressions. Results from the exposure phase indicate a clear preference for non-nutritive sweeteners (NNS), which is more marked in the case of saccharin than in the case of stevia. Results from the subsequent test confirmed a preference for saccharin over stevia that could possibly have been obscured in some cases by the effect of neophobia. On the other hand, the greater consumption of saccharin in the STV-20 group compared to the control group, NP, indicates a possible generalization of increased preference or habituation to neophobia due to exposure to another sweetener, in this case stevia, during the exposure phase of the STV-20 group, which makes it interesting to observe whether there will be changes in the behavioral phenotypes inherited by the offspring of this group in relation not only to stevia, but also to saccharin.

SECOND GENERATION

Experiment 2a (13 days old)

TRT test

Before the test, the mean body weights in groups G2-SA-20, G2-SA1-0, G2-STV-20, and G2-NP were, respectively: 26.23 g (SD= 5.05), 23.73 g (SD=1.89), 25.77 g (SD= 3.27), and 25.80 g (SD= 3.23). These weights did not differ, $F(3, 100) = 1.571$, $p = 0.201$. No significant differences between males (mean = 25.74 g and SD= 3.82) and females (mean = 25.50 g and SD= 3.80) were detected, $t(100) = 0.321$, $p = 0.749$.

During the test, aversive reactions were barely observed to either saccharin (only wall-climbing in 15 subjects: 6 subjects from group G2-SA-20; 1 subject from group G2-SA-10; 4 subjects from group G2-STV-20 and 4 subjects from group G2-NP) or stevia (only wall-climbing in 11 subjects: 4 subjects from group G2-SA-20; 6 subjects from group G2-SA-10; no subjects from group G2-STV-20 and 1 subject from group G2-NP). This was expected given the sweet taste and palatability properties of the used sweeteners.

Regarding the appetitive orofacial responses, we focused on mouthing and paw licking. For each subject, we calculated the aggregate time in which he or she emitted either of these two reactions throughout each of the 5 minutes of testing. The flavored solution was infused during the first 15 seconds of each minute, so there were 5 trials of flavor presentation.

Figure 11 shows the mean time (in seconds) in which the animals in each group showed appetitive reactions (mouthing and paw licking) to the flavors. As can be seen, the presence of these responses was more frequent in the test with saccharin, indicating that the taste of this solution is more palatable than that of stevia for the rats. However, a notable number of appetitive responses to stevia were also observed, indicating that it is a stimulus with some positive hedonic value. While there appeared to be no notable differences between groups in the appetitive responses to stevia, there were clear differences in the saccharin test. The two groups of offspring of parents exposed to saccharin (Groups G2-SA-20 and G2-SA-10) showed more appetitive responses than the groups whose parents were not exposed to this particular sweetener (Groups G2-STV-20 and G2-NP). The group of offspring of parents exposed to a different sweetener, stevia (Group G2-STV-20) showed an intermediate level of appetitive responses, neither as high as the groups exposed to saccharin nor as low as the group of offspring of parents not exposed to any sweetener (Group G2-NP).

An ANOVA of 4 (Group) x 2 (Sex: male vs. female) x 2 (Stimulus: saccharin vs. stevia) x 5 (Test trials) analysis confirmed these impressions. The effect of Group was not significant, $F(1, 91) = 1.87, p = 0.14$. Neither was the effect of Sex, $F(1, 91) = 0.499, p = 0.482$. The main effects of Stimulus, $F(1, 91) = 78.97, p < 0.001$, and of Trial, $F(4, 91) = 6.322, p < 0.001$, were significant. The Stimulus X Minute interaction was significant, $F(4, 91) = 4.281, p = 0.002$, indicating that especially in the saccharin test, the number of appetitive responses was increasing during the test. Critically, the Group X Stimulus interaction was significant, $F(3, 91) = 5.02, p = 0.003$. Further analysis to identify the source of the interaction indicated, on the one hand, that there were between-group differences in appetitive responses to saccharin, $F(3, 100) = 3.57, p = 0.017$, but not to stevia, $F(3, 101) = 1.736, p = 0.165$. Post hoc Tukey tests revealed that Groups G2-SA-20 and G2-SA-10 made more appetitive responses to saccharin than Group G2-NP. Group G2-STV-20 did not differ significantly from either group. All other interactions were not significant, with the closest interaction being the Stimulus X Sex interaction, $F(1, 91) = 1.052, p = 0.308$.

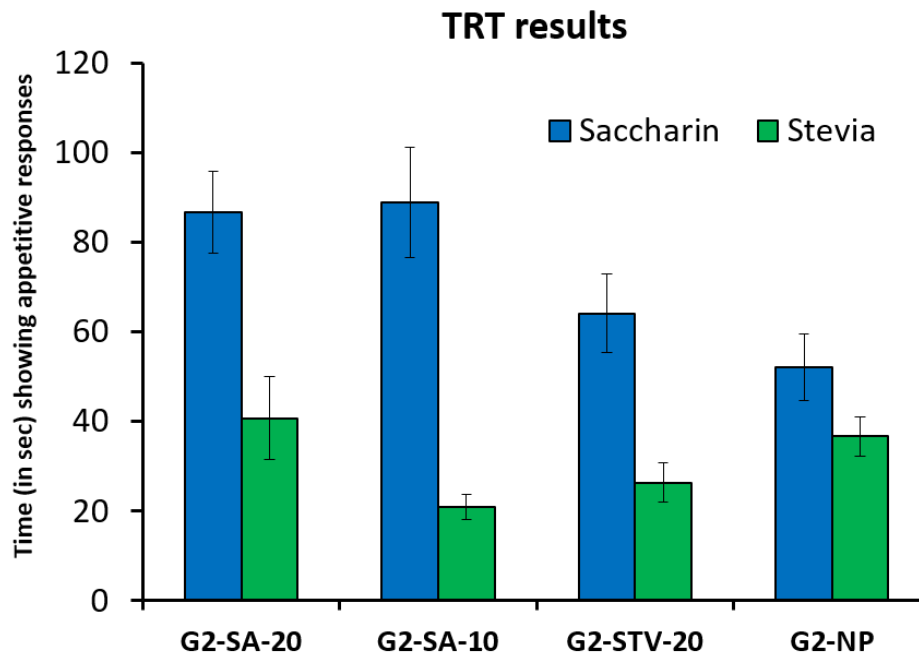


Figure 11. Experiment 2a, Generation 2. Group means of the time (in seconds) in which appetitive responses (mouthing and paw-licking) were exhibited during the 5-minute TRT tests with saccharin and stevia. On these tests, subjects were 13 days old. Vertical bars represent the standard error of the mean (SEMs). The animals of all the groups were naïve with respect to the exposed flavoured stimuli. Fathers of Groups G2-SA-20 and G2-SA-10 received 20 and 10 days, respectively, of exposure to saccharin exposure. Fathers of Group G2-STV-20 received 20 days of exposure to stevia, and fathers of Group G2-NP did not have experience with any flavoured solution and just drank water.

Regarding locomotor activity during the TRT trials, due to the large number of data required to perform a manual tracking of all test minutes, it was decided to perform a coding of the distance traveled only during the first and last trial of each test (minutes 1 and 5). Figure 12 shows the mean distances covered (in metres) at minutes 1 and 5 of the TRT tests with saccharin and stevia by animals in each group. These data were analyzed with an ANOVA similar to the one used for appetitive responses. A 4 (Group) x 2 (Sex: male vs. female) x 2 (Stimulus: saccharin vs. stevia) x 2 (Minute 1 vs. Minute 5) ANOVA was performed. Results revealed significant effects of Group, $F(3, 93) = 3.15, p = 0.029$, Stimulus, $F(1, 93) = 40.70, p < 0.001$ and Minute, $F(1, 93) = 52.58, p < 0.001$. The interactions Minute x Stimulus, $F(1, 93) = 18.983, p < 0.001$, and Minute X Stimulus X Sex, $F(1, 93) = 4.37, p = 0.039$, were significant. As in the case of appetitive responses, these effects indicate that as the flavors were exposed in the 5 test trials, the animals habituated to them showing more appetitive reactions; in this case, a tendency to decrease locomotor activity was observed that was more marked with

saccharin and in male rats. Finally, a Group X Minute interaction was significantly observed, $F(3, 93) = 2.951$, $p = 0.037$. Additional analyses performed to reveal the source of this interaction indicated the presence of differences between Groups at Minute 5, $F(3, 97) = 3.42$, $p = 0.02$, but not at Minute 1, $F(3, 97) = 2.44$, $p = 0.068$. Post-hoc tests performed on the Minute 5 data showed that offspring of saccharin-exposed parents (Groups G2-SA-20 and G2-SA-10) showed less locomotor activity in the tests than offspring of parents not exposed to any sweetener, (Group G2-NP). Again, the group of offspring from stevia-exposed parents (Group G2-STV-20) showed an intermediate level of performance and did not differ from either group. The other interactions, including the Group X Stimulus interaction, $F(3, 93) = 0.844$, $p = 0.47$, were not significant, the closest being the Minute X Sex interaction, $F(3, 93) = 1.82$, $p = 0.18$.

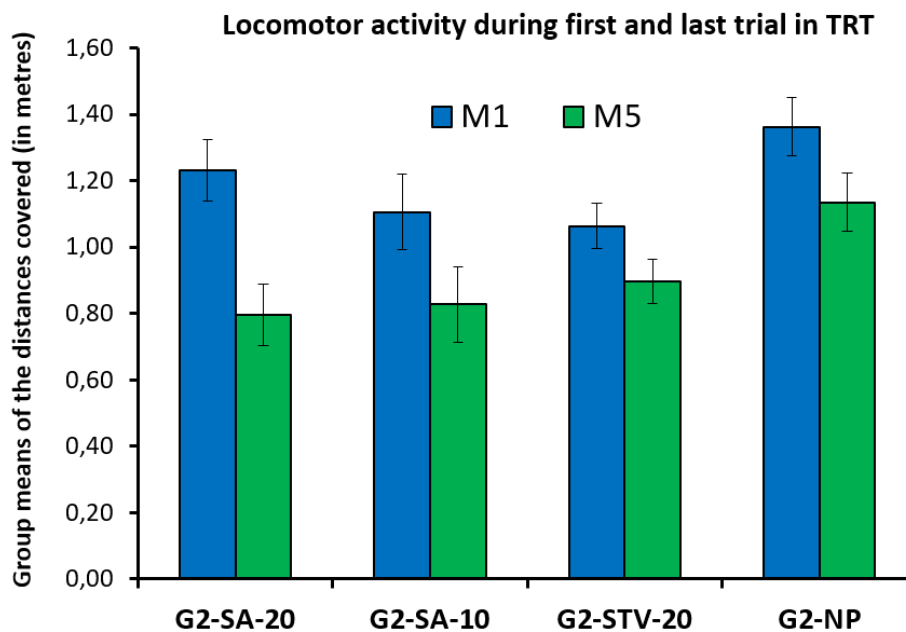


Figure 12. Experiment 2a, Generation 2. Group means of the distances covered (in metres) at minutes 1 and 5 of the TRT tests with saccharin and stevia. On these tests, subjects were 13 days old. Vertical bars represent the standard error of the mean (SEMs). The animals of all the groups were naïve with respect to the exposed flavoured stimuli. Fathers of Groups G2-SA-20 and G2-SA-10 received 20 and 10 days, respectively, of exposure to saccharin exposure. Fathers of Group G2-STV-20 received 20 days of exposure to stevia, and fathers of Group G2-NP did not have experience with any flavoured solution and just drank water.

Overall, the results obtained indicate that the offspring of saccharin-exposed groups show an increased preference for the taste of this sweetener. This heritability effect does not appear to be mediated by the sex variable or by the length of saccharin exposure. It is possible, however, that the shorter level of exposure we employed in this experiment (10 days of free and continuous access to saccharin) does not allow us to detect the importance of this variable at lower magnitudes.

The elicitation of these effects in tests performed when the offspring are only 13 days old indicates that the inherited information (or at least some of it) is active early in development. On the other hand, the fact that no clear effects are observed in the offspring of Stevia-exposed parents is open to several explanations. One is that the parents of the G2-SA-20 and G2-SA-10 groups passed on specific saccharin taste information. This explanation, however, is contradicted by the fact that we found a general effect of locomotor activity in both the saccharin and stevia tests. An inspection of the sweetener intakes of the first generation subjects indicates that the parents of the STV-20 Group self-exposed themselves to less sweetener, possibly due to a relatively lower palatability than saccharin. It may be that the difficulty in detecting the effects of this ancestral exposure lies in that factor rather than in the transmission of accurate information about sensory differences between saccharin and stevia.

Experiments 2B (30 days old) 2C (60 days old)

In both experiments, the animals of the different groups started the test procedures with equivalent weights. In Experiment 2b, the mean weights were 68.00 g (SD= 6.44), 60.24 g (SD=5.39), 62.27 g (SD= 10.58), and 63.25 g (SD= 11.65), for animals in Groups G2-SA-20, G2-SA-10, G2-STV-20, and G2-NP, respectively. These weights did not significantly differ, $F(3, 31) = 1.088$, $p = 0.370$. In Experiment 2c, the mean weights were 298.50 g (SD= 64.54), 257.32 g (SD=61.74), 271.36 g (SD= 52.24) and 259.95 g (SD= 53.66), for animals in Groups G2-SA-20, G2-SA-10, G2-STV-20, and G2-NP, respectively. These weights also did not significantly differ, $F(3, 31) = 0.835$, $p = 0.486$.

Figure 13 shows the results of the two-bottle tests (one containing saccharin and the other water) performed in experiments 2b and 2c. Note that different subjects were used in each experiment. In Experiment 2b (the results from the left panels), there seems to be a slightly higher consumption of saccharin than water in all groups. In Experiment 2c, however,

there is a clear indication of this preference in Group G2-NP (namely, more consumption of saccharin than water), and an even more marked preference in the remaining groups, Groups G2-SA-20, G2-SA-10 and G2-STV-20, which showed an enhanced consumption of saccharin if we compare with that showed by Group G2-NP.

A 4 (Group) x 2 (Stimulus) x 2 (Sex) x 6 (Session) ANOVA, performed with the data from Experiment 2b (tested at the age of, approximately, 30 days), revealed that there were significant main effects of Stimulus, $F(1, 24) = 26.19$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.52$, 95% CI [0.21, 0.68] and Trial, $F(5, 120) = 2.65$, $p = 0.026$, $\eta^2 = 0.10$, 95% CI [0.00, 0.18]. None of the remaining main effects and interactions were significant, $F_s < 3.11$, $p > 0.09$. These results indicate that there was a general preference for saccharin, but that the size of it did not differ among the groups.

Regarding Experiment 2c (tested at the age of, approximately, 60 days), a parallel 4 (Group) x 2 (Stimulus) x 2 (Sex) x 6 (session) ANOVA revealed that there were significant main effects of Trial, $F(5, 120) = 8.11$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.25$, 95% CI [0.10, 0.35] and Stimulus, $F(1, 24) = 172.20$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.88$, 95% CI [0.75, 0.92]. The Stimulus x Trial interaction, $F(5, 120) = 11.62$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.33$, 95% CI [0.17, 0.42] was significant, indicating greater differential consumption of saccharin and water in the latter test trials. Critically, the Group X Stimulus interaction, $F(3, 24) = 4.80$, $p = 0.009$, $\eta^2 = 0.37$, 95% CI [0.03, 0.54] was also significant. No other main effects or interactions were significant, $F_s < 2.29$, $p_s > 0.14$. Further analyses conducted in order to explore the source of the Group X Stimulus interaction revealed group differences in the consumption of saccharin, $F(3, 31) = 5.94$, $p = 0.003$, $\eta^2 = 0.36$, 95% CI [0.06, 0.52], but not in the consumption of water, $F < 1$. Post-hoc comparisons conducted with Tukey's HSD test showed that Groups G2-SA-20, G2-SA-10, and G2-STV-20 consumed more saccharin than Group G2-NP (see right panels of Figure 13). These results indicate an enhanced preference for saccharin in the offspring of male parents exposed to sweeteners (Groups SA-20, SA-10, and STV-20 from the first generation).

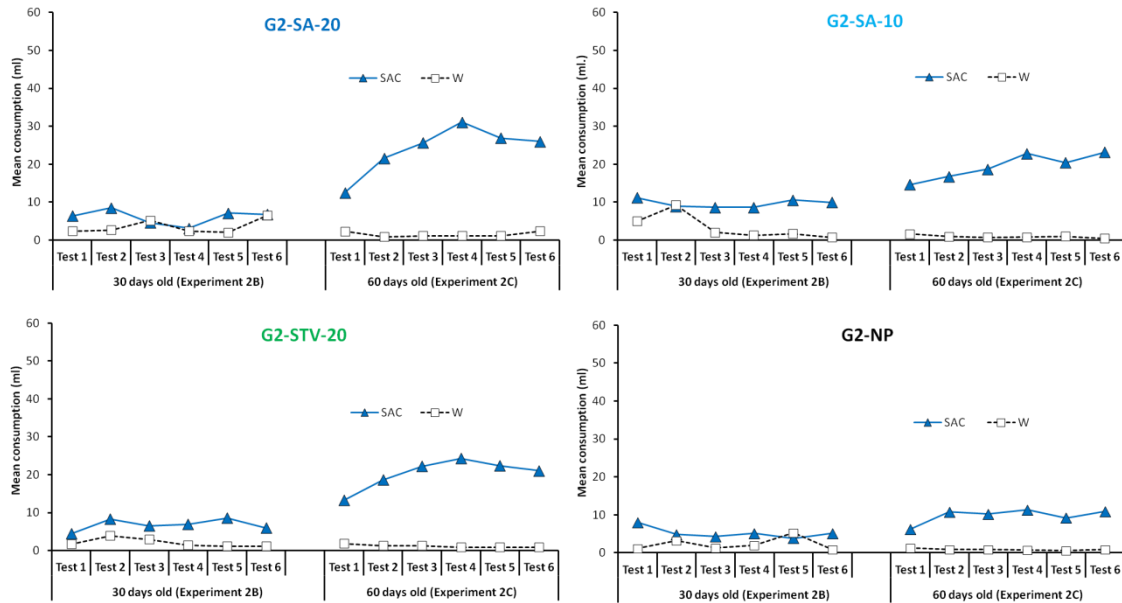


Figure 13. Experiments 2b and 2c, Generation 2. Group mean consumptions of saccharin and water during the preference tests. On Experiment 2b, subjects were, approximately, 30 days old when tested. On Experiment 2c, subjects were, approximately, 60 days old when tested. Vertical bars represent the standard error of the mean (SEMs). The animals of all the groups were naïve with respect to the exposed flavoured stimuli. Fathers of Groups G2-SA-20 and G2-SA-10 received 20 and 10 days, respectively, of exposure to saccharin exposure. Fathers of Group G2-STV-20 received 20 days of exposure to stevia, and fathers of Group G2-NP did not have experience with any flavoured solution and just drank water.

We found a pattern of results similar to that obtained in Experiment 1. The improvements introduced in the present experiment allow us to establish with more certainty the reliability of the heritability effect of an increased preference for saccharin in the offspring of sweetener-exposed parents. We have again observed that this effect is clearly expressed through consumption tests (in this case a two-bottle preference test) at the age of 60 days but not at the age of 30 days. Furthermore, unlike the results found in Experiment 2a, which suggested that the heritability effect might be specific to ancestral exposure to saccharin, the present results indicate that ancestral exposure to stevia also results in offspring showing an increased preference for saccharin. A question to be elucidated in the future is, therefore, why ancestral exposure to stevia may generate in the offspring a phenotype of elevated saccharin consumption (Experiment 2c) but not the phenotypes of increased appetitive reactions (Experiment 2a).

As in the case of Experiment 1, a possible limitation that could be pointed out in this study is the relatively small number of litters from which the offspring of each group of

Generation 2 were obtained. In Figure 14 we have represented, as we did in Experiment 1, the average consumption of each of the litters used in the experiment, indicating the experimental group to which they belong. As we can observe, while in Experiment 2b there is no clear pattern in the distribution of the litters across consumption levels, in Experiment 2c, a clearer ordering appears with the groups of offspring of parents exposed to sweetener exhibiting higher consumption. In neither experiment is a similar ordering observed when the stimulus consumed is water. Given these results with a larger number of litters, and added to those of Experiment 1, it seems implausible to attribute the observed effects to a random selection, in all groups exposed to sweetener, of those males with a marked genetic predisposition to consume more saccharin.

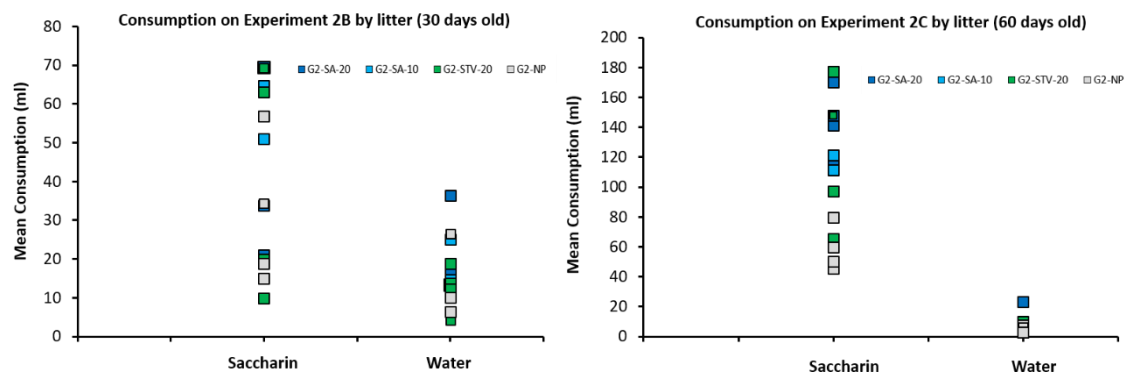


Figure 14. Experiments 2b and 2c, Generation 2. Group mean consumptions of saccharin and water during the preference tests by litter. On Experiment 2b, subjects were, approximately, 30 days old when tested. On Experiment 2c, subjects were, approximately, 60 days old when tested. The animals of all the groups were naïve with respect to the exposed flavoured stimuli. Fathers of Groups G2-SA-20 and G2-SA-10 received 20 and 10 days, respectively, of exposure to saccharin exposure. Fathers of Group G2-STV-20 received 20 days of exposure to stevia, and fathers of Group G2-NP did not have experience with any flavoured solution and just drank water.

4. General Discussion

In this study, we were looking for new IAC effects that stemmed from stimulus-specific learning by parents. Experiment 1 was designed to explore the possible intergenerational transmission of a generalization effect of habituation to neophobia. The parameters used to generate such learning were not appropriate, but one of the control conditions, a group exposed to a single flavor, saccharin, resulted in the parental acquisition of a well-known saccharin-preference phenotype (Domjan and Gillan, 1976; McCarthy et al., 2020; Mook, 1974; Sclafani, Bahrani, Zukerman and Ackroff, 2010). Tests with offspring (who never interacted with their parents) showed evidence of possible inheritance of this acquired phenotype.

Offspring of saccharin-exposed parents showed higher consumption of a saccharin solution than offspring of non-saccharin-exposed parents (Experiment 1).

Given the novelty and potential relevance of these results, we designed three additional experiments (Experiments 2a, 2b, and 2c) to confirm the reliability of the effect and, in addition, to probe some of its possible features. The subjects in these three experiments were the offspring of one generation of male rats that were distributed into four groups. In two groups, the rats were exposed to saccharin (10 or 20 days), in another group they were exposed to another non-nutritive sweetener (stevia, for 20 days), and in another group they were not exposed to any flavored solution. In Experiment 2a, the offspring of these groups were tested (at a very early age of about 13 days of life) for their orofacial reactions to an intraoral infusion of saccharin and stevia. It was observed that offspring of saccharin-exposed parents exhibited more appetitive responses to saccharin than parents not exposed to either sweetener. In addition, when measuring locomotor activity during these tests, it was found that offspring of saccharin-exposed parents exhibited less locomotor activity during the infusion of saccharin and stevia, suggesting greater enjoyment when tasting the flavor of the solutions.

In Experiments 2b and 2c, the same type of saccharin preference test was performed by presenting rats for repeated days simultaneously with two beverage tubes, one with saccharin and the other with water. This two-bottle test, standard for measuring taste preference, revealed no difference in the magnitude of saccharin preference when the offspring were about 30 days old (Experiment 2b). However, when other offspring subjects were tested at about 60 days of age (Experiment 2c), it was observed that offspring of parents exposed to sweetener (saccharin or stevia) showed an increased preference for saccharin compared to offspring of parents not exposed to any flavored solution.

The results obtained are consistent with the transmission of an intergenerational heritability effect of increased preference for sweet taste after relatively prolonged exposure to sweeteners. The design of our study allows us to rule out with some confidence that the observed effects are due to social learning. The offspring in our experiments never interacted with their parents, who received the differential treatments tested. It could be possible that some behavioral phenotype was transmitted from fathers to mothers during mating, and that the mothers subsequently transmitted this phenotype to the offspring. However, this possibility seems remote and, moreover, given the mating conditions, would be

inconsequential in modulating phenotypes related to sweetener consumption and/or reactions to sweeteners.

In both experiments, an interval of more than one week was added between the end of the treatments and the mating phase. This prevented the dams from being exposed to any residues of the sweeteners used in the treatments. Since, in addition, only water was available to the animals in their cages during mating, only a phenotype of higher or lower water consumption could have been transmitted between fathers and mothers through social learning. Had this unlikely transmission occurred in either group, we should have observed some differences in the consumption of water or flavors other than saccharin (and stevia) in the offspring of our experiments. These differences were never observed.

Our results are also not attributable to differences in weight and/or development of the animals. The different treatments never produced, in addition, differences in water consumption in the water baselines established before each test. Therefore, we believe that the most plausible explanation for the effects found is an effect of inheritance of acquired characteristics. Several challenges arise from this finding. One of them, which does not represent our central interest, is what molecular mechanisms are involved in this type of inheritance. The most plausible candidates seem to be epigenetic mechanisms involved in the modification of information in parental sperm (McCarthy et al., 2020). We provide here a behavioral model that can be explored in this sense by specialists interested in these mechanisms.

Other challenges that are more in line with our field of study, the psychology of learning, arise when considering what type of information related to sweetener exposure is likely to be transmitted through HCAs. In this regard, we find two relevant questions. One, is whether parental exposure to saccharin, or stevia, results in the transmission of information specific to the sensory properties of these stimuli beyond their most salient feature: their sweet taste. Our results do not allow us to answer this question clearly. Some of the offspring phenotypes modulated by parental experience have been revealed to be specific to parental exposure to saccharin (Experiment 2a), but others have been revealed to be mediated by any type of parental exposure to sweeteners (Experiment 2c).

The second issue we highlight is the possible implication of these results (added to that of other cases of inheritance of phenotypes acquired through learning mechanisms, e.g., Dias and Ressler, 2014) to our theories of learning. Our results, and those of previous work (e.g., Dias and Ressler, 2014; McDougall, 1930) are consistent with the idea that repeated

parental/ancestral experience with a stimulus can modulate its salience. Our results can be explained by alluding to an increase in sweet taste salience. Our theories assume that the higher the salience of a stimulus the more effectively it is represented mentally and the more readily it activates the response mechanisms to which it is related (e.g., Rescorla & Wagner, 1972). An increased salience of the sweet taste would have resulted in a greater facility of this stimulus to activate the response mechanisms to which it is related and which give rise to the phenotypes known, and measured in our experiments, of increased consumption (Experiments 1, 2b and 2c) or emission of appetitive reactions (Experiment 2a). At the physiological level, the psychological feature of "salience" could correlate with the development of specific neuroanatomical phenotypes that facilitate sensory reception and transmission of the stimulus. This is consistent with the findings of Dias and Ressler (2014) of increased proliferation, in offspring, of neurons specialized in the reception of the odor with which their parents and/or grandparents were conditioned. As a hypothesis, this would imply admitting that the salience parameters stimulated in our theories (e.g., Hall & Rodriguez, 2010; 2020; Mackintosh, 1975; Pearce & Hall, 1980; Rescorla & Wagner, 1972; Wagner, 1981) would not be initially determined only by the physical characteristics of the stimuli but would be modulated by the parental/ancestral experiences that would have made these stimuli more or less salient. The theoretical relevance of this potential implication requires consideration in future work designed to test it.

CAPÍTULO 3: CONCLUSIONES

El **objetivo general** de esta tesis era retomar, desde un enfoque psicológico centrado en el aprendizaje, un interés experimental y teórico por el fenómeno de la herencia de caracteres adquiridos (HCA). Nos trazamos una serie de objetivos concretos que pasamos a evaluar a la luz de los resultados obtenidos en los experimentos realizados.

Objetivo 1.

En este objetivo nos proponíamos explorar una posible herencia de una **generalización de la habituación a la neofobia con sabores** (Experimento 1). Los resultados del experimento evidenciaron una mala elección de parámetros para partir de un efecto robusto de partida. Las predicciones sobre este objetivo no pudieron ponerse a prueba de manera solvente. Accidentalmente, sin embargo, encontramos un fenotipo conductual robusto, la adquisición de una preferencia aumentada por la sacarina, que nos sirvió de base para seguir persiguiendo nuestro objetivo general.

Objetivo 2.

Objetivo 2.1. Se partía de la siguiente hipótesis: El consumo relativamente prolongado de sacarina da lugar a un aumento en el valor hedónico del sabor y en la preferencia por él. Si estos fenotipos son adquiridos por los machos de una generación podrán ser transmitido por HCA a su progenie. A partir de esta hipótesis se derivaron diferentes predicciones que fueron puestas a prueba en 3 experimentos (Experimentos 2a, 2b y 2c). Los resultados de nuestros experimentos fueron consistentes con nuestras Predicciones 2 y 3 (ver apartado Objetivos).

Los descendientes de padres expuestos a sacarina de manera prolongada mostraron de manera innata una mayor preferencia por la sacarina (una mayor tendencia a consumir soluciones de agua con sacarina) que otros animales cuyos padres no habían sido expuestos a sacarina (Predicción 2; Experimentos 1 y 2c).

Los descendientes de padres expuestos a sacarina de manera prolongada mostraron de manera innata reacciones apetitivas más frecuentes y/o intensas (indicadoras de un mayor valor hedónico del estímulo) que otros animales cuyos padres no habían sido expuestos a sacarina. (Predicción 3; Experimento 2a).

Objetivo 2.2. (Predicciones 4 y 5). Se partía de la siguiente hipótesis: la expresión de estos posibles efectos de HCA puede ser dependiente de la edad y/o del tipo fenotipo conductual examinado. Nuestros resultados indican que los efectos de la experiencia parental

a edulcorantes pueden ser expresados a edades muy tempranas (13 días de edad; Experimento 2a). No obstante, parece que la comprobación de estos efectos a través de pruebas de consumo puede requerir que los sujetos tengan una edad suficiente para expresar un consumo elevado de la solución dulce (Experimento 2b frente a Experimento 2c).

Objetivo 2.3. Se partía de la siguiente hipótesis: la magnitud de estos posibles efectos de HCA puede ser dependiente de la cantidad de exposición a la sacarina, siendo el efecto posiblemente más marcado cuanto mayor sea la exposición al edulcorante. No encontramos evidencia favorable a esta posibilidad en ninguno de los tres experimentos diseñados con este objetivo (2a, 2b y 2c). Parece, no obstante, probable que el parámetro que empleamos como “exposición corta” a sacarina (10 días con continuo libre acceso a esta sustancia) constituya en la práctica una exposición bastante prolongada. Parece preciso explorar en el futuro otros parámetros de exposición más limitada que puedan ser más sensibles (Predicciones 6 y 7).

Objetivo 2.4. Se quería contrastar dos hipótesis alternativas: los efectos observados en el Experimento 1 compatibles con un caso de HCA, se debían a la transmisión de información sobre el sabor específico de la sacarina o sobre el sabor dulce, en general. Para poner a prueba esta hipótesis, en el diseño del Experimento 2 se incluyó un grupo en el que los machos de la primera generación fueron expuestos a otro edulcorante, stevia. Los resultados de nuestros experimentos no nos permiten contrastar las hipótesis planteadas (Predicciones 8 y 9). De hecho, la aparición de los fenotipos observados en el Experimento 2a sí parecen específicos de una experiencia parental con la sacarina, pero los fenotipos de consumo medidos en los Experimentos 2b y 2c se observan tras la exposición parental a sacarina y stevia. Quizás, esto indica que más de un tipo de información (con distintos grados de especificidad estimular) fueron transmitidos de manera intergeneracional. Pero es posible que, simplemente, los procedimientos empleados en el Experimento 2a son menos sensibles que los empleados en el Experimento 2c. De nuevo, parece una cuestión que merece ser explorada en el futuro.

Objetivo 2.5. Se querían contrastar si la aparición de los efectos y/o su magnitud se veían afectados por el sexo de los sujetos. Los resultados obtenidos no han mostrado que los efectos encontrados se vean modulados por el sexo de los individuos de la descendencia.

REFERENCIAS

- Anastasiadi, D., Venney, C. J., Bernatchez, L., y Wellenreuther, M. (2021). Epigenetic inheritance and reproductive mode in plants and animals. *Trends in Ecology & Evolution*, 36(12), 1124-1140. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2021.08.006>
- Adewoye, A. B., Lindsay, S. J., Dubrova, Y. E., y Hurles, M. E. (2015). The genome-wide effects of ionizing radiation on mutation induction in the mammalian germline. *Nature communications*, 6 (1), 1-8. <https://doi.org/10.1038/ncomms7684>
- Agar, W. E., Drummond, F. H., y Tiegs, O. W. (1935). A first report on a test of McDougall's Lamarckian experiment on the training of rats. *Journal of Experimental Biology*, 12(3), 191-211. <https://doi.org/10.1242/jeb.12.3.191>
- Agar, W. E., Drummond, F. H., y Tiegs, O. W. (1942). Second report on a test of McDougall's Lamarckian experiment on the training of rats. *Journal of Experimental Biology*, 19(2), 158-167. <https://doi.org/10.1242/jeb.19.2.158>
- Agar, W. E., Drummond, F. H., y Tiegs, O. W. (1948). Third report on a test of McDougall's Lamarckian experiment on the training of rats. *Journal of Experimental Biology*, 25(2), 103-122. <https://doi.org/10.1242/jeb.25.2.103>
- Agar, W. E., Drummond, F. H., Tiegs, O. W., y Gunson, M. M. (1954). Fourth (final) report on a test of McDougall's Lamarckian experiment on the training of rats. *Journal of Experimental Biology*, 31(3), 307-321. <https://doi.org/10.1242/jeb.31.3.307>
- Albright, T. D., Kandel, E. R., y Posner, M. I. (2000). Cognitive neuroscience. *Current opinion in neurobiology*, 10(5), 612-624. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00132-X](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00132-X)
- Albuquerque Filho, M. O., De Freitas, B. S., Garcia, R. C. L., de Freitas Crivelaro, P. C., Schröder, N., y de Lima, M. N. M. (2017). Dual influences of early-life maternal deprivation on histone deacetylase activity and recognition memory in rats. *Neuroscience*, 344, 360-370. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.12.054>
- Aoued, H. S., Sannigrahi, S., Hunter, S. C., Doshi, N., Sathi, Z. S., Chan, A. W., Walum, H. y Dias, B. G. (2020). Proximate causes and consequences of intergenerational influences of salient sensory experience. *Genes, Brain and Behavior*, 19(4), e12638. <https://doi.org/10.1111/gbb.12638>
- Akers, R.L., Krohn, M.D., Lanza-Kaduce, L., Radosevich, M. (1995). Social Learning and Deviant Behavior: A Specific Test of a General Theory. In: McCord, J., Laub, J.H. (eds)

- Contemporary Masters in Criminology*. The Plenum Series in Crime and Justice. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9829-6_12
- Arias, C., y Chotro, M. G. (2005a). Increased palatability of ethanol after prenatal ethanol exposure is mediated by the opioid system. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 82, 434–442. doi: 10.1016/j.pbb.2005.09.015
- Arias, C., y Chotro, M. G. (2005b). Increased preference for ethanol in the infant rat after prenatal ethanol exposure, expressed on intake and taste reactivity tests. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 29, 337–346. doi: 10.1097/01.alc.0000156115.35817.21
- Avery, O. T., Macleod, C. M., y McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type iii. *The Journal of experimental medicine*, 79(2), 137–158. <https://doi.org/10.1084/jem.79.2.137>
- Bain, A. (1873). *Review of 'Darwin on Expression': Being a Postscript to The Senses and the Intellect*. Longmans, Green & Company.
- Bandura, A., y Walters, R. H. (1977). *Social learning theory* (Vol. 1). Prentice Hall: Englewood cliffs.
- Barnes, C. A. (1988). Spatial learning and memory processes: the search for their neurobiological mechanisms in the rat. *Trends in neurosciences*, 11(4), 163-169. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(88\)90143-9](https://doi.org/10.1016/0166-2236(88)90143-9)
- Bartolomucci, A., Gioiosa, L., Chirieleison, A., Ceresini, G., Parmigiani, S., y Palanza, P. (2004). Cross fostering in mice: behavioral and physiological carry-over effects in adulthood. *Genes, Brain and Behavior*, 3(2), 115-122. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2003.00059.x>
- Bateson, W. (1919). Dr. Kammerer's testimony to the inheritance of acquired characters. *Nature*, 103(2592), 344-345. <https://doi.org/10.1038/103344b0>
- Bennett, M. R., y Hacker, P. M. S. (2008). *History of cognitive neuroscience*. John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781118394267>
- Benoit, J. D., Rakic, P., y Frick, K. M. (2015). Prenatal stress induces spatial memory deficits and epigenetic changes in the hippocampus indicative of heterochromatin formation and

- reduced gene expression. *Behavioural brain research*, 281, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.12.001>
- Blaine, A. P., Le Goff, A., y Allard, P. (2020). What is lost in the weismann barrier?. *Journal of developmental biology*, 8 (4), 35, 1-12. <https://doi.org/10.3390/jdb8040035>
- Bonner, S. E., y Willms, E. (2021). Intercellular communication through extracellular vesicles in cancer and evolutionary biology. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 165, 80-87. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2021.08.006>
- Burkhardt Jr, R. W. (2013). Lamarck, evolution, and the inheritance of acquired characters. *Genetics*, 194(4), 793-805. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.151852>
- Camacho, M. P. (2020). What's all the fuss about? The inheritance of acquired traits is compatible with the Central Dogma. *History and Philosophy of the Life Sciences*, 42(3), 1-15. <https://doi.org/10.1007/s40656-020-00329-8>
- Cavagnari, B. M. (2012). Regulación de la expresión génica: cómo operan los mecanismos epigenéticos. *Archivos argentinos de pediatría*, 110(2), 132-136. <https://doi.org/10.5546/aap.2012.132>
- Cavalli, G., y Heard, E. (2019). Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. *Nature*, 571(7766), 489-499. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1411-0>
- Celiker, C., y Kalkan, R. (2020). Genetic and epigenetic perspective of microbiota. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(19), 8221-8229. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10849-9>
- Chen, Q., Yan, W., y Duan, E. (2016). Epigenetic inheritance of acquired traits through sperm RNAs and sperm RNA modifications. *Nature Reviews Genetics*, 17(12), 733-743. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.106>
- Choi, S. W., y Friso, S. (2010). Epigenetics: a new bridge between nutrition and health. *Advances in nutrition*, 1(1), 8-16. <https://doi.org/10.3945/an.110.1004>
- Churchill, F. B. (2015). *August Weismann*. In August Weismann. Harvard University Press.
- Cock, A. G., y Forsdyke, D. R. (2022). The Kammerer Affair. In *Treasure Your Exceptions* (pp. 487-502). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-92099-9_21

- Crew, F. A. E. (1936). A repetition of modougall's lamarckian experiment. *Journal of genetics*, 33(1), 61-102. <https://doi.org/10.1007/BF03027604>
- Crews D. y Gore A.C. (2014). Controversies and debate of generational epigenetic inheritance. In: Tollefsbol T (ed.), *Transgenerational Epigenetics: Evidence and Debate*. Waltham, MA: Academic Press, 2014, 369–90. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-405944-3.00026-X>
- Crick, F. H. (1958). On protein synthesis. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 12, 138–163.
- Crick, F. (1970). Central Dogma of molecular biology. *Nature*, 227(5258), 561–563. <https://doi.org/10.1038/227561a0>.
- Cuvier, G. (1810). *Rapport historique sur les progrès des sciences naturelles depuis 1789, et sur leur état actuel*. Paris: Imprimerie Impériale.
- Cuvier, G. (1831). Eloge de M. de Lamarck, lu à l'Académie des Sciences le 26 novembre 1832 (par M. le Baron Silvestre). In: *Mémoires de l'Académie des Sciences de l'Institut de France, Tome XIII*. Gauthier-Villars, Firmin Didot frères, Paris, pp 1–31.
- Daft, J. G., Ptacek, T., Kumar, R., Morrow, C., & Lorenz, R. G. (2015). Cross-fostering immediately after birth induces a permanent microbiota shift that is shaped by the nursing mother. *Microbiome*, 3(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0080-y>
- Darwin, C. (1859). *On the origin of species*. Edited with an Introduction and Notes by Gillian Beer, 1996. Oxford: Oxford University Press.
- Darwin, C. (1868), *The Variation Of Animals And Plants Under Domestication*, 2 Vols (1868/1868).
- David, I., Canario, L., Combes, S., y Demars, J. (2019). Intergenerational transmission of characters through genetics, epigenetics, microbiota, and learning in livestock. *Frontiers in Genetics*, 10, 1058. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01058>
- Dawkins, R. (1970). *The extended phenotype*. Oxford: Oxford University Press.
- de Wit, S., Dickinson, A (2009). Associative theories of goal-directed behaviour: a case for animal–human translational models. *Psychological Research* 73, 463–476. <https://doi.org/10.1007/s00426-009-0230-6>

- Dias, B. G., y Ressler, K. J. (2014). Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations. *Nature Neuroscience*, 17(1), 89-96. <https://doi.org/10.1038/nn.3594>
- Dickins, T. E., y Rahman, Q. (2012). The extended evolutionary synthesis and the role of soft inheritance in evolution. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1740), 2913-2921. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.0273>
- Dickinson, A., y Mackintosh, N. J. (1978). Classical conditioning in animals. *Annual Review of Psychology*, 29, 587-612. <https://doi.org/10.1146/annurev.ps.29.020178.003103>
- Dickinson, A. (1985). Actions and habits: the development of behavioural autonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 308 (1135), 67-78. <https://doi.org/10.1098/rstb.1985.0010>
- Dickinson, A. (1989). *Expectancy theory in animal conditioning*, in: S.B. Klein, R.R. Mowrer Eds., Contemporary Learning Theories: Pavlovian Conditioning and the Status of Traditional Learning Theory, Lawrence Erlbaum Associates, Hillsdale, NJ, 1989, pp. 279-308.
- Dickinson, A., y Balleine, B. (1994). Motivational control of goal-directed action. *Animal Learning & Behavior*, 22(1), 1-18. <https://doi.org/10.3758/BF03199951>
- Dickinson, A., y Balleine, B. W. (2000). *Causal cognition and goal-directed action*. In C. Heyes & L. Huber (Eds.), The evolution of cognition (pp. 185-204). The MIT Press.
- Dickinson, A., y Balleine, B. W. (2002). *The role of learning in the operation of motivation systems*. In H. Pashler & C. R. Gallistel (Eds.), Steven's handbook of experimental psychology: Vol. 3. Learning, motivation, and emotion (3rd ed., pp. 497-533). New York: John Wiley & Sons.
- Dickinson, A. (2012). Associative learning and animal cognition. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367 (1603), 2733-2742. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0220>
- Dobson, F. S. (1985). The use of phylogeny in behavior and ecology. *Evolution*, 39(6), 1384-1388. <https://doi.org/10.2307/2408794>
- Dobzhansky, T. (1937). *Genetics and the Origin of Species* (Columbia Univ. Press, New York); 2nd Ed., 1941; 3rd Ed., 1951.

- Domjan, M., y Gillan, D. (1976). Role of novelty in the aversion for increasingly concentrated saccharin solutions. *Physiology & behavior*, 16(5), 537-542. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(76\)90211-0](https://doi.org/10.1016/0031-9384(76)90211-0)
- Druery, C. T., y Bateson, W. (1901). Experiments in plant hybridization. *Journal of the Royal Horticultural Society*, 26, 1-32.
- Duncan, E. J., Gluckman, P. D., y Dearden, P. K. (2014). Epigenetics, plasticity, and evolution: How do we link epigenetic change to phenotype?. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 322(4), 208-220. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22571>
- Dunlap, A. S., y Stephens, D. W. (2014). Experimental evolution of prepared learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(32), 11750-11755. <https://doi.org/10.1073/pnas.1404176111>
- Duranthon, V., y Chavatte-Palmer, P. (2018). Long term effects of ART: What do animals tell us?. *Molecular Reproduction and Development*, 85(4), 348-368. <https://doi.org/10.1002/mrd.22970>
- Eaton, S. A., Jayasooriah, N., Buckland, M. E., Martin, D. I., Cropley, J. E., y Suter, C. M. (2015). Roll over Weismann: extracellular vesicles in the transgenerational transmission of environmental effects. *Epigenomics*, 7(7), 1165-1171. <https://doi.org/10.2217/epi.15.58>
- Elgart, M., y Soen, Y. (2018). Microbiome-germline interactions and their transgenerational implications. *BioEssays*, 40(4), 1700018. <https://doi.org/10.1002/bies.201700018>
- Elsdon-Baker, F. (2015). Contested inheritance: debates on the role of 'inheritance of acquired characteristics' in late nineteenth century Darwinian and Weismannian thought. *Textual Practice*, 29 (3), 547-571. <https://doi.org/10.1080/0950236X.2015.1023654>
- Ennaceur, A. (2010). One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behavioural brain research*, 215(2), 244-254. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.036>
- Feil, R., & Fraga, M. F. (2012). Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nature reviews genetics*, 13(2), 97-109. <https://doi.org/10.1038/nrg3142>

- Feuer, S. K., y Rinaudo, P. F. (2017). Physiological, metabolic and transcriptional postnatal phenotypes of in vitro fertilization (IVF) in the mouse. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 8(4), 403–410. <https://doi.org/10.1017/S204017441700023X>
- Fisher, R. A. (1932). The bearing of genetics on theories of evolution. *Science Progress* 27, 273-287.
- Fitz-James, M. H., y Cavalli, G. (2022). Molecular mechanisms of transgenerational epigenetic inheritance. *Nature Reviews Genetics*, 23(6), 325-341. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00438-5>
- Frankenberg-Schwager, M. (1990). Induction, repair and biological relevance of radiation-induced DNA lesions in eukaryotic cells. *Radiation and environmental biophysics*, 29(4), 273-292. <https://doi.org/10.1007/BF01210408>
- Franklin, T. B., Russig, H., Weiss, I. C., Gräff, J., Linder, N., Michalon, A., Vizi, S. y Mansuy, I. M. (2010). Epigenetic transmission of the impact of early stress across generations. *Biological psychiatry*, 68(5), 408-415. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.05.036>
- Gantt, W. H. (1960). *Pavlov and Darwin*. S. Tax, S., The Evolution of Man. Man, Culture, and Society. Vol. II of Evolution after Darwin, Chicago and London (The University of Chicago Press) 1960, pp. 219-238.
- Gaztañaga Echeverria, M. (2016). *Prenatal appetitive learning about ethanol in the rat: possible reinforcers*. Universidad del País Vasco (UPV/EHU). https://addi.ehu.es/bitstream/handle/10810/18790/TESIS_GAZTAÑAGA_ECHEVERRIA_MIRARI.pdf?sequence=1
- Gilbert, S. (2011). The decline of soft inheritance. In: Gisis SB, Jablonka E (eds), *Transformation of Lamarckism: From Subtle Fluids to Molecular Biology*. Cambridge, MA: The MIT Press, 2011, 121–126. <https://doi.org/10.7551/mitpress/9780262015141.003.0012>
- Gisis S.B., Jablonka, E. (2011). Introduction: The Exclusion of Soft (“Lamarckian”) Inheritance from the Modern Synthesis. In: Gisis SB, Jablonka E (eds), *Transformation of Lamarckism: From Subtle Fluids to Molecular Biology*. Cambridge, MA: The MIT Press, 2011, 109–120. <http://dx.doi.org/10.7551/mitpress/9780262015141.001.0001>

- Gjerde, L. C., Eilertsen, E. M., Hannigan, L. J., Eley, T., Røysamb, E., Reichborn-Kjennerud, T., Rijdsdijk, F.V., McAdams, T.A. y Ystrom, E. (2021). Associations between maternal depressive symptoms and risk for offspring early-life psychopathology: the role of genetic and non-genetic mechanisms. *Psychological Medicine*, 51(3), 441-449. doi:10.1017/S0033291719003301
- Gliboff, S. (2002). The Spoiler: Paul Kammerer's fight for the inheritance of acquired characteristics.
- Gowri, V., y Monteiro, A. (2021). Inheritance of Acquired Traits in Insects and Other Animals and the Epigenetic Mechanisms That Break the Weismann Barrier. *Journal of Developmental Biology*, 9(4), 41. <https://doi.org/10.3390/jdb9040041>
- Grossniklaus, U., Kelly, W. G., Ferguson-Smith, A. C., Pembrey, M., y Lindquist, S. (2013). Transgenerational epigenetic inheritance: how important is it?. *Nature Reviews Genetics*, 14(3), 228-235. <https://doi.org/10.1038/nrg3435>
- Groves, P. M., & Thompson, R. F. (1970). Habituation: a dual-process theory. *Psychological review*, 77(5), 419-450. <https://doi.org/10.1037/h0029810>
- Guerrero-Bosagna, C. (2016). High type II error and interpretation inconsistencies when attempting to refute transgenerational epigenetic inheritance. *Genome Biology*, 17(1), 1-4. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0982-4>
- Guerrero-Bosagna, C., Morisson, M., Liaubet, L., Rodenburg, T. B., De Haas, E. N., Košťál, L., y Pitel, F. (2018). Transgenerational epigenetic inheritance in birds. *Environmental Epigenetics*, 4(2), dvy008, 1-8. <https://doi.org/10.1093/eep/dvy008>
- Hagen, J. B. (1999). Naturalists, molecular biologists, and the challenges of molecular evolution. *Journal of the History of Biology*, 32(2), 321-341. <https://doi.org/10.1023/A:1004660202226>
- Hager, R., Cheverud, J. M., y Wolf, J. B. (2009). Change in maternal environment induced by cross-fostering alters genetic and epigenetic effects on complex traits in mice. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1669), 2949-2954. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0515>
- Haldane, J. B. S. (1932) The causes of evolution. Princeton University Press, Princeton.

- Hall, G., y Rodríguez, G. (2010). *Associative and nonassociative processes in latent inhibition: An elaboration of the Pearce-Hall model*. *Latent inhibition: Cognition, neuroscience and applications to schizophrenia*, 114-136. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511730184.007>
- Hall, G., y Rodríguez, G. (2020). When the stimulus is predicted and what the stimulus predicts: Alternative accounts of habituation. *Journal of Experimental Psychology: Animal Learning and Cognition*, 46(3), 327-340. <https://doi.org/10.1037/xan0000237>
- Heard, E., y Martienssen, R. A. (2014). Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. *Cell*, 157(1), 95-109. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.045>
- Hershey, A.D. y Chase, M. (1952). Independent functions of viral proteins and nucleic acid in growth of bacteriophage. *Journal of General Physiology*, 36, 39– 56.
- Heyes, C., y Dickinson, A. (1990). The intentionality of animal action. *Mind & Language*, 5(1), 87-103. <https://doi.org/10.1111/j.1468-0017.1990.tb00154.x>
- Heyes, C. (2012). What's social about social learning?. *Journal of comparative psychology*, 126(2), 193-202. <https://doi.org/10.1037/a0025180>
- Ho, M. W., y Saunders, P. T. (1979). Beyond neo-Darwinism—an epigenetic approach to evolution. *Journal of theoretical Biology*, 78(4), 573-591. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(79\)90191-7](https://doi.org/10.1016/0022-5193(79)90191-7)
- Hoppitt, W., y Laland, K. N. (2008). Social processes influencing learning in animals: a review of the evidence. *Advances in the Study of Behavior*, 38, 105-165. [https://doi.org/10.1016/S0065-3454\(08\)00003-X](https://doi.org/10.1016/S0065-3454(08)00003-X)
- Holoch, D., y Moazed, D. (2015). RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nature Reviews Genetics*, 16(2), 71-84. <https://doi.org/10.1038/nrg3863>
- Horsthemke, B. (2018). A critical view on transgenerational epigenetic inheritance in humans. *Nature communications*, 9(1), 1-4. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05445-5>
- Inui-Yamamoto, C., Yamamoto, T., Ueda, K., Nakatsuka, M., Kumabe, S., Inui, T., e Iwai, Y. (2017). Taste preference changes throughout different life stages in male rats. *PLoS One*, 12(7), e0181650. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181650>

- Jablonka, E., Lachmann, M., y Lamb, M. J. (1992). Evidence, mechanisms and models for the inheritance of acquired characters. *Journal of theoretical biology*, 158 (2), 245-268. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(05\)80722-2](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(05)80722-2)
- Jablonka, E., y Lamb, M. J. (2008). The epigenome in evolution: beyond the modern synthesis. *Информационный вестник ВОГУС*, 12(1-2), 242-254.
- Jablonka, E. (2013). Epigenetic inheritance and plasticity: the responsive germline. *Progress in biophysics and molecular biology*, 111(2-3), 99-107. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2012.08.014>
- Jablonka, E., y Lamb, M. J. (2015). The inheritance of acquired epigenetic variations. *International journal of epidemiology*, 44(4), 1094-1103. <https://doi.org/10.1093/ije/dyv020>
- Jablonka, E., y Lamb, M. J. (2020). *Inheritance systems and the extended evolutionary synthesis*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9781108685412>
- Jacob, F., y Monod, J. (1961). *On the regulation of gene activity*. In Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology (Vol. 26, pp. 193-211). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/SQB.1961.026.01.024>
- Jin, N., George, T. L., Otterson, G. A., Verschraegen, C., Wen, H., Carbone, D., Herman, J., Bertino, E.M., y He, K. (2021). Advances in epigenetic therapeutics with focus on solid tumors. *Clinical Epigenetics*, 13(1), 1-27. <https://doi.org/10.1186/s13148-021-01069-7>
- Johannsen, W. (1909). *Elemente der Exakten Erblchkeitslehre*. Jena: Gustav Fischer.
- Jordan, I. K., Lee, K. K., McDonald, J. F., y Mariño-Ramírez, L. (2022). Epigenetics and cancer disparities: when nature might be nurture. *Oncoscience*, 9, 23-24. <https://doi.org/10.18632/oncoscience.555>
- Jovanovic, T., Smith, A., Kamkwala, A., Poole, J., Samples, T., Norrholm, S. D., Ressler, K.J. y Bradley, B. (2011). Physiological markers of anxiety are increased in children of abused mothers. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 52(8), 844-852. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7610.2011.02410.x>
- Kammerer, P. (1906). Experimentelle Veränderung der Fortpflanzungstätigkeit bei Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*) und Laubfrosch (*Hyla arborea*). *Archiv für*

- Entwicklungsmechanik der Organismen*, 22(1), 48-140.
<https://doi.org/10.1007/BF02162325>
- Kammerer, P. (1909). Vererbung erzwungener Fortpflanzungsanpassungen. III. Mitteilung: Die Nachkommen der nicht brutpflegenden *Alytes obstetricans*. *Arch Entwickl Mech Org* 28, 447–545.
- Kammerer, P. (1924). *The Inheritance of Acquired Characteristics*. Translated by A. Paul Maerker-Branden. New York: Boni and Liveright.
- Kočandrlje, R., y Kleisner, K. (2013). Evolution born of moisture: analogies and parallels between Anaximander's ideas on origin of life and man and later pre-Darwinian and Darwinian evolutionary concepts. *Journal of the History of Biology*, 46 (1), 103-124.
<https://doi.org/10.1007/s10739-012-9334-8>
- Kol'tsov, N. K. (1967). Trud zhizni velikogo biologa [The work of the life of a great biologist]. IP Pavlov v vospominaniyakh sovremennikov [IP Pavlov in the memoirs of contemporaries]. Leningrad: *Nauka Publ*, 111-116.
- Kohl, P., Crampin, E. J., Quinn, T. A., y Noble, D. (2010). Systems biology: an approach. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 88 (1), 25-33. <https://doi.org/10.1038/clpt.2010.92>
- Laland, K. N. (2004). Social learning strategies. *Animal Learning & Behavior*, 32(1), 4-14.
<https://doi.org/10.3758/BF03196002>
- Lamarck, J.-B. (1802a). *Hydrogéologie, ou Recherches sur l'influence qu'ont les eaux sur la surface du globe terrestre; sur les causes de l'existence du bassin des mers, de son déplacement et de son transport successif sur les différens points de la surface du globe: enfin sur les changemens que les corps vivans exercent sur la nature et l'état de cette surface* Agasse et Maillard, Paris.
- Lamarck, J.-B. (1802b). *Recherches sur l'organisation des corps vivans et particulièrement sur son origine, sur la cause de ses développemens et des progrès de sa composition, et sur celle qui, tendant continuellement à la détruire dans chaque individu, amène nécessairement sa mort; précédé du discours d'ouverture du course de zoologie, donné dans le Muséum national d'Histoire Naturelle* Maillard, Paris.
- Lamarck, J.-B. (1809). *Philosophie zoologique, ou exposition des considérations relatives à l'histoire naturelle des animaux; à la diversité de leur organisation et des facultés qu'ils*

en obtiennent; aux causes physiques qui maintiennent en eux la vie et donnent lieu aux mouvemens qu'ils exécutent; enfin, à celles qui produisent les unes le sentiment, et les autres l'intelligence de ceux qui en sont doués. Baillièrre, Paris.

- Lamb M.J. (2011). Attitudes to soft inheritance in Great Britain, 1930s-1970s. In: Gissis SB, Jablonka E (eds), *Transformation of Lamarckism: From Subtle Fluids to Molecular Biology*. Cambridge, MA: The MIT Press, 2011, 109–120. <http://dx.doi.org/10.7551/mitpress/9780262015141.003.0011>
- Landman O. E. (1991). The inheritance of acquired characteristics. *Annual review of genetics*, 25, 1–20. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ge.25.120191.000245>
- Landman, O. E. (1993). Inheritance of acquired characteristics revisited. *Bioscience*, 43(10), 696-705. <http://dx.doi.org/10.2307/1312341>
- Latchman, D. S. (1997). Transcription factors: an overview. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 29(12), 1305-1312. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(97\)00085-X](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(97)00085-X)
- Law, J. A., y Jacobsen, S. E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics*, 11(3), 204-220. <https://doi.org/10.1038/nrg2719>
- Lee, J. E., y Kim, M. Y. (2021). Cancer epigenetics: Past, present and future. *In Seminars in Cancer Biology*, 33, 4-14. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.03.025>
- Lester, B. M., Tronick, E., Nestler, E., Abel, T., Kosofsky, B., Kuzawa, C. W., ... y Wood, M. A. (2011). Behavioral epigenetics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1226(1), 14-33. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06037.x>
- Lieberman, N., Wang, S. Y., y Greer, E. L. (2019). Transgenerational epigenetic inheritance: from phenomena to molecular mechanisms. *Current opinion in neurobiology*, 59, 189-206. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.09.012>
- Ling, C., & Rönn, T. (2019). Epigenetics in human obesity and type 2 diabetes. *Cell metabolism*, 29(5), 1028-1044. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.03.009>
- Liu, Y. (2008). A new perspective on Darwin's Pangenesis. *Biological Reviews*, 83 (2), 141-149. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00036.x>

- Liu, Y. (2011). Inheritance of acquired characters in animals: a historical overview, further evidence and mechanistic explanations. *Italian Journal of Zoology*, 78(4), 410-417. <https://doi.org/10.1080/11250003.2011.562554>
- Liu, Y., y Li, X. (2016). Darwin's Pangenesis as a molecular theory of inherited diseases. *Gene*, 582(1), 19-22. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.01.051>
- Liu Y. (2020). Revisiting Darwin's thoughts on environmentally induced heritable changes. The Science of the total environment, 738, 139540. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139540>
- Liu, J., Li, J. N., Wu, H., y Liu, P. (2022). The Status and Prospects of Epigenetics in the Treatment of Lymphoma. *Frontiers in Oncology*, 12, 874645. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.874645>
- Loenen, J. H. (1954). Was Anaximander an evolutionist?. *Mnemosyne*, 7 (1), 215-232. <https://doi.org/10.1163/156852554X00225>
- Loison, L. (2018). Lamarckism and epigenetic inheritance: a clarification. *Biology & Philosophy*, 33(3), 1-17. <https://doi.org/10.1007/s10539-018-9642-2>
- Loison, L. (2021). Epigenetic inheritance and evolution: a historian's perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 376 (1826), 20200120. 1-8. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0120>
- Luo, C., Hajkova, P., y Ecker, J. R. (2018). Dynamic DNA methylation: In the right place at the right time. *Science*, 361(6409), 1336-1340. <https://doi.org/10.1126/science.aat6806>
- Mackintosh, N. J. (1975). A theory of attention: Variations in the associability of stimuli with reinforcement. *Psychological Review*, 82, 276 –298. <http://dx.doi.org/10.1037/h0076778>
- Mackintosh, N. J. (1983). *Conditioning and associative learning*. Oxford: Oxford University Press.
- Maierov, F. P. (1954). *Istoriia Ucheniia ob Uslovnykh Refleksakh*, 2d ed. revised and enlarged, Izdatel'stvo Akademii Nauk SSSR, Moscow, Leningrad.

- Martin, E. M., y Fry, R. C. (2018). Environmental influences on the epigenome: exposure-associated DNA methylation in human populations. *Annual Review of Public Health*, *39*(1), 309-333. <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-040617-014629>
- Mayr, E. (1942) Systematics and the origin of species. Columbia University Press, Nueva York.
- Mayr, E. (1961). Cause and effect in biology: Kinds of causes, predictability, and teleology are viewed by a practicing biologist. *Science*, *134* (3489), 1501-1506. <https://doi.org/10.1126/science.134.3489.1501>.
- Mayr, E. (1974). Teleological and Teleonomic, a New Analysis. In: Cohen, R.S., Wartofsky, M.W. (eds) *Methodological and Historical Essays in the Natural and Social Sciences. Boston Studies in the Philosophy of Science*, vol 14. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-010-2128-9_6
- Mayr, E. (1982). *The Growth of Biological Thought: Diversity, Evolution, and Inheritance*. Cambridge. Harvard University Press.
- Mayr, E. (1985). Weismann and evolution. *Journal of the History of Biology*, *18* (3), 295-329. <https://doi.org/10.1007/BF00138928>
- Mayr, E. (1991). *One long argument: Charles Darwin and the genesis of modern evolutionary thought* (Vol. 2). Harvard University Press.
- Mayr, E., y Provine, W. B. (Eds.). (1998). *The evolutionary synthesis: perspectives on the unification of biology*. Harvard University Press
- McCarty, R. (2017). Cross-fostering: elucidating the effects of genex environment interactions on phenotypic development. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *73*, 219-254. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.12.025>
- McCarthy, D. M., Lowe, S. E., Morgan, T. J., Cannon, E. N., Biederman, J., Spencer, T. J., y Bhide, P. G. (2020). Transgenerational transmission of behavioral phenotypes produced by exposure of male mice to saccharin and nicotine. *Scientific Reports*, *10*(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68883-6>
- McDougall, W. (1927). An experiment for the testing of the hypothesis of Lamarck. *British Journal of Psychology*, *17*(4), 267-304. <https://doi.org/10.1111/j.2044-8295.1927.tb00432.x>

- McDougall, W. (1930a). Second report on a Lamarckian experiment. *British journal of psychology*, 20(3), 201-218. <https://doi.org/10.1111/j.2044-8295.1930.tb00545.x>
- McDougall, W. (1938). Fourth report on a Lamarckian experiment. *British journal of psychology*, 28(4), 321-345. <https://doi.org/10.1111/j.2044-8295.1938.tb00878.x>
- Mendel, G. (1866). Versuche über Pflanzenhybriden Verh. *Des Naturf. Vereines in Brünn (Abhandlungen)*, 4, 3-47.
- Miller, R. R., y Holzman, A. D. (1981). Neophobias and conditioned taste aversions in rats following exposure to novel flavors. *Animal Learning & Behavior*, 9(1), 89-100. <https://doi.org/10.3758/BF03212030>
- Milner, B., Squire, L. R., y Kandel, E. R. (1998). Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*, 20(3), 445-468. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80987-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80987-3).
- Modlinska, K., Stryjek, R., y Pisula, W. (2015). Food neophobia in wild and laboratory rats (multi-strain comparison). *Behavioural processes*, 113, 41-50. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2014.12.005>
- Modlinska, K., y Pisula, W. (2020). The Norway rat, from an obnoxious pest to a laboratory pet. *eLife*, 9, e50651. <https://doi.org/10.7554/eLife.50651>
- Mook, D. G. (1974). Saccharin preference in the rat: some unpalatable findings. *Psychological review*, 81(6), 475-490. <https://doi.org/10.1037/h0037238>
- Moore, R. S., Kaletsky, R., y Murphy, C. T. (2019). Piwi/PRG-1 argonaute and TGF- β mediate transgenerational learned pathogenic avoidance. *Cell*, 177(7), 1827-1841. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.024>
- Mowrer, R. R., & Klein, S. B. (Eds.). (2000). *Handbook of contemporary learning theories*. Psychology Press.
- Nagy, C., y Turecki, G. (2015). Transgenerational epigenetic inheritance: an open discussion. *Epigenomics*, 7 (5), 781-790. <https://doi.org/10.2217/epi.15.46>
- Nagy, C., Vaillancourt, K., y Turecki, G. (2018). A role for activity-dependent epigenetics in the development and treatment of major depressive disorder. *Genes, Brain and Behavior*, 17(3), e12446. <https://doi.org/10.1111/gbb.12446>

- Nahm, M. (2021). Paul Kammerer and epigenetics—a reappraisal of his experiments. *Contributions to Zoology*, 90(3), 318-343. <https://doi.org/10.1163/18759866-bja10019>
- Nejabati, H. R., Shahnazi, V., Faridvand, Y., Fathi-Maroufi, N., Bahrami-Asl, Z., Nikanfar, S., y Nouri, M. (2021). Epididymosomes: the black box of Darwin’s pangenesis?. *Molecular Human Reproduction*, 27(2), gaaa079. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaaa079>
- Nilsson, E. E., Maamar, M. B., y Skinner, M. K. (2020). Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance and the Weismann barrier: the dawn of neo-Lamarckian theory. *Journal of developmental biology*, 8(4), 28. <https://doi.org/10.3390/jdb8040028>
- Nizhnikov, M. E., Popoola, D. O., y Cameron, N. M. (2016). Transgenerational transmission of the effect of gestational ethanol exposure on ethanol use-related behavior. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 40 (3), 497-506. <https://doi.org/10.1111/acer.12978>
- Noble, D. (2015). Evolution beyond neo-Darwinism: a new conceptual framework. *Journal of Experimental Biology*, 218(1), 7-13. <https://doi.org/10.1242/jeb.106310>
- Noble, D. (2018). Central dogma or central debate?. *Physiology*, 33(4), 246-249. <https://doi.org/10.1152/physiol.00017.2018>
- Noble, D. (2020). Charles Darwin, Jean-Baptiste Lamarck, and 21st century arguments on the fundamentals of biology. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 153, 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2020.02.005>
- Noble, D. (2022). Neither Dogmas nor Barriers are absolute: reply to commentary by Koen B Tanghe. *Biosemiotics*, 15, 57–60. <https://doi.org/10.1007/s12304-022-09475-x>
- Normandin, S., y Wolfe, C. T. (2013). *Vitalism and the scientific image in post-Enlightenment life science, 1800-2010* (Vol. 2). Dordrecht: Springer.
- Olstad, E. W., Nordeng, H. M. E., Sandve, G. K., Lyle, R., y Gervin, K. (2022). Low reliability of DNA methylation across Illumina Infinium platforms in cord blood: implications for replication studies and meta-analyses of prenatal exposures. *Clinical Epigenetics*, 14(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s13148-022-01299-3>
- Ongay, I. (2019). The principle of parsimony and how August Weismann used it. *Ludus Vitalis*, 26(50), 17-33.

- Pasquier, E. (1832). *Éloge de M. le baron Georges Cuvier*. Chambre des Pairs. Séance du. 17 décembre 1832. Paris: [s.n.].
- Patel, D., Kas, M. J., Chattarji, S., y Buwalda, B. (2019). Rodent models of social stress and neuronal plasticity: Relevance to depressive-like disorders. *Behavioural brain research*, 369, 111900. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.111900>
- Pavlov, I. P. (1923). New researchs on conditioned reflexes. *Science*, 58, 359-361. <https://doi.org/10.1126/science.58.1506.359>
- Pavlov, I.P. (1927) *Conditioned Reflexes*. Oxford University Press, London.
- Pavlov, I. P. (1960). *Conditioned reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex* (1927). Edited by Anrep GV. New York: Boyer.
- Pearce, J. M. (1987). A model for stimulus generalization in Pavlovian conditioning. *Psychological review*, 94 (1), 61-73 <https://doi.org/10.1037/0033-295X.94.1.61>.
- Pearce, J. M., y Hall, G. (1980). A model for Pavlovian learning: variations in the effectiveness of conditioned but not of unconditioned stimuli. *Psychological review*, 87(6), 532-552. <https://doi.org/10.1037/0033-295X.87.6.532>
- Pearce, J. M. (2013). *Animal learning and cognition: an introduction*. Psychology press. <https://doi.org/10.4324/9781315782911>
- Pereira, A. G., Gracida, X., Kagias, K., y Zhang, Y. (2020). C. elegans aversive olfactory learning generates diverse intergenerational effects. *Journal of neurogenetics*, 34(3-4), 378-388. <https://doi.org/10.1080/01677063.2020.1819265>
- Pittendrigh, C.S. (1958). *Adaptation, natural selection, and behavior*. In: Roe A, Simpson GG, eds. *Behavior and Evolution*. Yale University Press (New Haven) pp 360–416
- Posner, M. I. (1995). *Attention in cognitive neuroscience: An overview*. In M. S. Gazzaniga (Ed.), *The cognitive neurosciences* (pp. 615–624). The MIT Press.
- Razran, G. (1958). Soviet Psychology and Psychophysiology: How successful are the two sciences in the Soviet Union? Are the Russians able to synthesize them?. *Science*, 128(3333), 1187-1194. <https://doi.org/10.1126/science.128.3333.118>
- Recorla, R. A., y Wagner, A. R. (1972). *A Theory of Pavlovian Conditioning: Variations in the Effectiveness of Reinforcement and Nonreinforcement*. In A. H. Black, & W. F. Prokasy

- (Eds.), *Classical Conditioning II: Current Research and Theory* (pp. 64-99). New York: Appleton- Century-Crofts.
- Remy, J. J. (2010). Stable inheritance of an acquired behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology*, *20*(20), 877-878. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.08.013>
- Rhine, J. B., y McDougall, W. (1933). Third report on a Lamarckian experiment. *British Journal of Psychology*, *24*(2), 213. <https://doi.org/10.1111/j.2044-8295.1933.tb00698.x>
- Riskin, J. (2020). Biology's mistress, a brief history. *Interdisciplinary Science Reviews*, *45*(3), 268-298. <https://doi.org/10.1080/03080188.2020.1794388>
- Riskin, J. (2021). Nature's Evolving Tastes. *The New Yorker Review of Books*.
- Riyahi, J., Abdoli, B., Haghparast, A., y Petrosini, L. (2019). Intergenerational effect of parental spatial training on offspring learning: evidence for sex differences in memory function. *Brain Research Bulletin*, *153*, 314-323. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.08.020>
- Roberts, E. (1918). Fluctuations in a Mendelian character and selection. *University of Illinois*.
- Rosenberg, E., Sharon, G., y Zilber-Rosenberg, I. (2009). The hologenome theory of evolution contains Lamarckian aspects within a Darwinian framework. *Environmental microbiology*, *11*(12), 2959-2962. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01995.x>
- Rosenberg, E., Sharon, G., Atad, I., y Zilber-Rosenberg, I. (2010). The evolution of animals and plants via symbiosis with microorganisms. *Environmental microbiology reports*, *2*(4), 500-506. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00177.x>
- Salvucci, E. (2016). Microbiome, holobiont and the net of life. *Critical reviews in microbiology*, *42*(3), 485-494. <https://doi.org/10.1002/bies.201700018>
- Sarkies, P. (2020). Molecular mechanisms of epigenetic inheritance: possible evolutionary implications. *Seminars in Cell & Developmental Biology* (97), 106-115. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.06.005>
- Sclafani, A., Bahrani, M., Zukerman, S., y Ackroff, K. (2010). Stevia and saccharin preferences in rats and mice. *Chemical Senses*, *35*(5), 433-443. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjq>
- Schaukowitch, K., y Kim, T. K. (2014). Emerging epigenetic mechanisms of long non-coding RNAs. *Neuroscience*, *264*, 25-38. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.12.009>

- Schmid, M. W., Heichinger, C., Coman Schmid, D., Guthörl, D., Gagliardini, V., Bruggmann, R., ... y Grossniklaus, U. (2018). Contribution of epigenetic variation to adaptation in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, *9*(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06932-5>
- Simpson, G. G. (1944). *Tempo and mode in evolution*. Columbia University Press, Nueva York.
- Skinner, B. F. (1966). The phylogeny and ontogeny of behavior: contingencies of reinforcement throw light on contingencies of survival in the evolution of behavior. *Science*, *153*(3741), 1205-1213. <https://doi.org/10.1126/science.153.3741.1205>
- Skinner, B. F. (1984). The phylogeny and ontogeny of behavior. *Behavioral and Brain Sciences*, *7*(4), 669-677. <https://doi.org/10.1017/S0140525X00027990>
- Skinner, M. K., y Nilsson, E. E. (2021). Role of environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance in evolutionary biology: *Unified Evolution Theory*. *Environmental Epigenetics*, *7*(1), dvab012. <https://doi.org/10.1093/eep/dvab012>
- Smith, J. M. (1993). *The theory of evolution*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Smythies, J., Edelstein, L., y Ramachandran, V. (2014). Molecular mechanisms for the inheritance of acquired characteristics—exosomes, microRNA shuttling, fear and stress: Lamarck resurrected?. *Frontiers in genetics*, *5*, 133. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00133>
- Spencer, H. (1864). *Principles of biology, vol. 1* London. UK: Williams and Norgate [Google Scholar].
- Steele, E. J. (1981). *Somatic selection and adaptive evolution: on the inheritance of acquired characters*. University of Chicago Press.
- Studentsov, N. P. (1924). Nasledovanie priruchennosti u belykh mysheF, Russki. *FiziologicheskiY Zhurnal* *7*, 317-318.
- Surani, M. A. (2016). Breaking the germ line–soma barrier. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *17*(3), 136-136. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.12>
- Suvorov, N. F., y Andreeva, V. N. (1991). Problems of the inheritance of conditioned reflexes in Pavlov's school. *Neuroscience and Behavioral Physiology* *21* (1), 8-16. <https://doi.org/10.1007/BF01184231>

- Szyf, M. (2015). Nongenetic inheritance and transgenerational epigenetics. *Trends in molecular medicine*, 21(2), 134-144. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.12.004>
- Tarpy, R. M., y McIntosh, S. M. (1977). Generalized latent inhibition in taste-aversion learning. *Bulletin of the Psychonomic Society*, 10(5), 379-381. <https://doi.org/10.3758/BF03329366>
- Thompson, R. F., y Spencer, W. A. (1966). Habituation: A model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychological Review*, 73, 16 – 43. <http://dx.doi.org/10.1037/h0022681>
- Thompson, R. F. (2009). Habituation: A history. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92, 127–134. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2008.07.011>
- Tolman, E. C. (1924). The inheritance of maze-learning ability in rats. *Journal of Comparative Psychology*, 4(1), 1-18. <https://doi.org/10.1037/h0071979>
- Tornier, G. (1907). Nachweis über das Entstehen von Albinismus, Melanismus und Neotenie bei Fröschen. *Zool. Anz*, 32, 284-288.
- Trevisanato, S. I. (2016). Reconstructing anaximander's biological model unveils a theory of evolution akin to darwin's, though centuries before the birth of science. *Acta medico-historica Adriatica: AMHA*, 14(1), 63-72.
- Tryon, R. C. (1940). Studies in individual differences in maze ability. VII. The specific components of maze ability, and a general theory of psychological components. *Journal of Comparative Psychology*, 30(2), 283-335. <https://doi.org/10.1037/h0054238>
- Van Alphen, J. J., y Arntzen, J. W. (2016). Paul Kammerer and the inheritance of acquired characteristics. *Contributions to Zoology*, 85(4), 457-470. <https://doi.org/10.1163/18759866-08504005>
- Van Steenwyk, G., Roszkowski, M., Manuella, F., Franklin, T. B., y Mansuy, I. M. (2018). Transgenerational inheritance of behavioral and metabolic effects of paternal exposure to traumatic stress in early postnatal life: evidence in the 4th generation. *Environmental epigenetics*, 4(2), dvY023. <https://doi.org/10.5167/uzh-159543>
- Vargas A. O. (2009). Did Paul Kammerer discover epigenetic inheritance? A modern look at the controversial midwife toad experiments. *Journal of experimental zoology. Part B*,

- Molecular and developmental evolution, 312(7), 667–678.
<https://doi.org/10.1002/jez.b.21319>
- Vargas, A. O., Krabichler, Q., y Guerrero-Bosagna, C. (2017). An epigenetic perspective on the midwife toad experiments of Paul Kammerer (1880–1926). *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 328(1-2), 179-192.
<https://doi.org/10.1002/jez.b.22708>
- Ventura-Juncá, P., Irrarázaval, I., Rolle, A. J., Gutiérrez, J. I., Moreno, R. D., y Santos, M. J. (2015). In vitro fertilization (IVF) in mammals: epigenetic and developmental alterations. Scientific and bioethical implications for IVF in humans. *Biological Research*, 48(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s40659-015-0059-y>
- Villota-Salazar, N. A., Mendoza-Mendoza, A., y González-Prieto, J. M. (2016). Epigenetics: from the past to the present. *Frontiers in Life Science*, 9(4), 347-370.
<https://doi.org/10.1080/21553769.2016.1249033>
- Waddington, C. H. (1942). Canalisation of development and the inheritance of acquired characters. *Nature*, 150, 563–564.
- Wade, M. J., y Kalisz, S. (1990). The causes of natural selection. *Evolution*, 44 (8), 1947-1955.
<https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1990.tb04301.x>
- Wagner, A.R., (1981). SOP: a model of automatic memory processing in animal behavior. In: Spear, N.E., Miller, R.R. (Eds.), *Information Processing in Animals: Memory Mechanisms*. Erlbaum, Hillsdale, NJ, pp. 5–47.
- Wang, Y., Liu, H., y Sun, Z. (2017). Lamarck rises from his grave: parental environment-induced epigenetic inheritance in model organisms and humans. *Biological Reviews*, 92(4), 2084-2111. <https://doi.org/10.1111/brv.12322>
- Wang, H. D., y Allard, P. (2022). Challenging dogmas: How transgenerational epigenetics reshapes our views on life. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, 337(1), 70-74. <https://doi.org/10.1002/jez.2465>
- Watson, J.D. y Crick, F.H.C. (1953). Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171, 737– 738. <https://doi.org/10.1038/171737a0>
- Watson, J. D. (1965) *Molecular Biology of the Gene*, W. A. Benjamin.

- Webb, W. B. (1989). William McDougall's Lamarckian experiments. *The Psychological Record*, 39(2), 159-176. <https://doi.org/10.1007/BF03395060>
- Weismann, A. (1885). The continuity of germ-plasm as the foundation of a theory of heredity. In E. B. Poulton, S. Schönland, & A. E. Shipley (Trans Eds.), *Essays upon heredity and kindred biological problem* (1891, pp. 163–256). Oxford Clarendon Press.
- Weismann, A. (1888). On the Supposed Botanical Proofs of the Transmission of Acquired Characters. In *Essays Upon Heredity and Kindred Biological Problems*, edited and translated by Edward B. Poulton, Selmar Schönland, and Arthur E. Shipley, 1, 397-430. Oxford: Clarendon Press.
- Weismann, A. (1889). The Supposed Transmission of Mutations. 1888. In *Essays Upon Heredity and Kindred Biological Problems*, edited and translated by Edward B. Poulton, Selmar Schönland, and Arthur E. Shipley, 1, 385–417. Oxford: Clarendon Press.
- Weismann, A. (1893). *The Germ-Plasm: A Theory of Heredity*. Translated by W. Newton Parker and Harriet Rönnefeldt. New York: Scribner's.
- Weismann, A. (1904). *The evolution theory* (trans J.A. and M.R. Thomson). London: Edward Arnol.
- Windholz, G., y Lamal, P. A. (1991). Pavlov's view of the inheritance of acquired characteristics as it relates to theses concerning scientific change. *Synthese*, 88(1), 97-111. <https://doi.org/10.1007/BF00540094>
- Wolf, J. B., Ferguson-Smith, A. C., y Lorenz, A. (2022). Mendel's laws of heredity on his 200th birthday: What have we learned by considering exceptions?. *Heredity*, 1-3. <https://doi.org/10.1038/s41437-022-00552-y>
- Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 16, 97–159.
- Xiao, X., Liu, X., y Jiao, B. (2020). Epigenetics: Recent advances and its role in the treatment of Alzheimer's disease. *Frontiers in Neurology*, 11, 538301. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.53830>
- Yehuda, R., y Lehrner, A. (2018). Intergenerational transmission of trauma effects: putative role of epigenetic mechanisms. *World psychiatry*, 17(3), 243-257. <https://doi.org/10.1002/wps.20568>

- Zhang, L., Lu, Q., y Chang, C. (2020). Epigenetics in Health and Disease. In: Chang, C., Lu, Q. (eds) *Epigenetics in Allergy and Autoimmunity*. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 1253. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3449-2_1
- Zhang, X., Wang, M., He, T., Long, S., Guo, Y., y Chen, Z. (2021). Effect of different cross-fostering strategies on growth performance, stress status and immunoglobulin of piglets. *Animals*, 11(2), 499-508. <https://doi.org/10.3390/ani11020499>
- Zhu, J., Lee, K. P., Spencer, T. J., Biederman, J., y Bhide, P. G. (2014). Transgenerational transmission of hyperactivity in a mouse model of ADHD. *Journal of Neuroscience*, 34(8), 2768-2773. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4402-13.2014>
- Zirkle, C. (1935). The inheritance of acquired characters and the provisional hypothesis of pangenesis. *The American Naturalist*, 69(724), 417-445. <https://doi.org/10.1086/280617>

