

CONTROVERSIAS / *Controversies*

INVESTIGACIÓN DE UN FENÓMENO NATURAL: ¿ESTUDIOS *IN VIVO*, *IN VITRO* O *IN SILICO*?

Brenda Lorena Fina, Mercedes Lombarte, Alfredo Rigalli*

Laboratorio de Biología Ósea, Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe 3100, Rosario, Argentina.

Resumen

Un tema de controversia y discusión en la investigación biomédica es la validez de la información obtenida de los experimentos realizados. Los modelos experimentales utilizados determinan el tipo de conclusiones así como la información obtenida. Básicamente podemos clasificar los modelos experimentales en: experimentos *in vivo*, *in vitro* e *in silico*. Se entiende por experimento *in vivo* aquel que se lleva a cabo con especies animales. Los experimentos *in vitro* son realizados en dispositivos de laboratorio utilizando tejidos, células o moléculas provenientes de las especies animales. Por último, los experimentos *in silico* son simulaciones o reproducciones de experimentos *in vivo* o *in vitro*, que emplean modelos matemáticos y softwares de simulación. ¿Cuál de ellos es más adecuado? Es una pregunta que no debe hacerse el investigador. La pregunta que se debe hacer es: ¿Qué modelo es más adecuado para responder a mi interrogante respecto del fenómeno natural que estoy estudiando? En general, los modelos mencionados se complementan y no son excluyentes. Los modelos *in vivo* permiten estudiar las condiciones biológicas en las que ocurre un fenómeno y

cuáles son sus consecuencias. Los modelos *in vitro* nos aproximarán a los mecanismos subyacentes y los modelos *in silico* permitirán anticipar la magnitud de las respuestas del sistema en estudio ante variaciones de las variables intervinientes. Si bien es cierto que lo mismo podría hacerse con modelos *in vivo*, es indudable que la velocidad de obtención de la información y el menor gasto justifica enormemente su utilización.

Palabras clave: experimento *in vivo*, experimento *in vitro*, experimento *in silico*.

Summary

A subject of controversy and discussion in biomedical research is the validity of the information obtained from the experiments. Experimental models determine the conclusions and the information obtained. Basically we can divide experimental models: experiments in vivo, in vitro and in silico. An in vivo experiment is that is carried out in an animal species. The in vitro experiments are performed in laboratory devices using tissues, cells or molecules from animal species. Finally, in silico experiments are simulations of in vivo

* Laboratorio de Biología Ósea, Facultad de Ciencias Médicas. Santa Fe 3100. 2000 Rosario. Argentina. Correo electrónico: arigalli@conicet.gob.ar



or *in vitro* experiments, using mathematical models and simulation software. Which one is best? Is a question that the researcher should not ask himself. The question to ask is: Which model is more suitable to answer my question about the natural phenomenon I am studying? In general the models mentioned are complementary and not exclusive. The models allow us to study *in vivo* biological conditions in which a phenomenon occurs and what are the consequences. *In vitro* models approximate us the underlying mechanisms, and *in silico* models allow us to anticipate the magnitude of system's responses to changes in the variables involved. Although the same information could be obtained with *in vivo* models, there is no doubt that less time and low cost is involved in obtaining the information.

Key words: *experiment in vivo, experiment in vitro, experiment in silico.*

El conocimiento científico surge de la aplicación del método científico. Este último se fundamenta en la observación de un fenómeno natural, la formulación de una hipótesis y la verificación de esta a través de experimentos. El experimento es una situación generalmente controlada en la cual se reproduce el fenómeno observado. Si bien experimentalmente intentamos acercarnos a la situación real en la que fue observado dicho fenómeno, la multitud de variables existentes hace que a muchas de ellas no las podamos conocer, o más aún, que ni sospechemos su presencia. En el mejor de los casos, estas variables desconocidas o incontrolables pueden no ser las determinantes del fenómeno, pero en otros casos pueden ser las que condicionen la respuesta de nuestro sistema y las estemos ignorando.

Cada ciencia tiene sus modelos para el estudio de los fenómenos. Así, las ciencias biomédicas se basan en diferentes modelos experimentales para poner a prueba las hipótesis: modelos *in vivo*, *in vitro* e *in silico*.

Los ensayos *in vivo* son aquellos en los cuales hacemos el estudio en las condiciones más próximas al fenómeno observado, por ejemplo un ensayo clínico. Pero muchas veces el modelo *in vivo* no es el mismo donde se observó el fenómeno. Por ejemplo, se observó que en ciertas zonas del planeta, las personas presentaban mayor densidad mineral ósea (DMO) y menor riesgo de fracturas. Las investigaciones condujeron a pensar que era el fluoruro contenido en el agua el responsable, al menos en parte, de la mayor DMO.¹ Se intentó estudiar el proceso utilizando animales de experimentación a los que se les administró fluoruro de sodio en el agua de bebida, en algunos casos con resultados que confirmaron la hipótesis² y en otros que la refutaban.³ La reproducción de la situación real en pacientes administrando fluoruro por vía oral tampoco dio resultados comparables a los observados naturalmente.⁴ Si bien los modelos *in vivo* intentaron reproducir el efecto del fluoruro sobre el esqueleto, carecieron de validez. En primer lugar, la observación fue hecha en seres humanos de una región dada pero en el laboratorio se realizaron ensayos con animales de experimentación, donde el escalado de dosis puede no ser exacto. Además, al administrar fluoruro a pacientes se lo hizo en dosis diarias únicas y a mujeres posmenopáusicas y no como ocurrió en la observación, donde las mujeres habían recibido fluoruro en bajas dosis por largo tiempo y seguramente antes de la menopausia. Aún queda una pregunta que no tiene respuesta: ¿Habría sido el fluoruro el responsable de la mayor DMO? ¿o habría sido la combinación de fluoruro y otras variables?

Como contracara de los estudios *in vivo* se encuentran los estudios *in vitro*, los cuales intentan simular las condiciones naturales en que se realizó la observación o al menos aproximarse a las condiciones aplicadas en los experimentos *in vivo*. Estos experimentos son herramientas adecuadas para el estudio de mecanismos involucrados en los fenóme-

nos observados. Sin embargo, un estudio *in vitro* muestra parcialmente el mecanismo en estudio. Las extrapolaciones que se hacen de un trabajo *in vitro* deben ser bien aclaradas en la discusión y en las conclusiones, a fin de evitar malas interpretaciones.⁵ Volviendo al efecto del fluoruro sobre el esqueleto, se demostró *in vitro* que el fluoruro inhibe una proteína fosfatasa que desfosforila receptores de factores de crecimiento, potenciando de esta manera la acción de dichos factores.⁶ Este conocimiento permite entender cómo actúa el fluoruro a nivel de las células óseas, pero de ninguna manera asegura que lo que ocurre *in vivo* sea lo observado en este tipo de experimentos y menos puede asegurarnos que es lo único que ocurre. Además, por lo general se utilizan concentraciones que se encuentran muy lejos de las halladas en plasma luego de una dosis de fluoruro y se mantienen a lo largo del tiempo, situación que está alejada de la realidad en la cual las células son expuestas solo unos minutos al fluoruro luego de una dosis oral.⁷

Existen opiniones acerca de que los trabajos *in vitro* podrían ser mejores que los *in vivo*; se argumentan mejor control o condiciones éticas, reducción de errores estadísticos y menor costo.⁸ Se propone que debería argumentarse claramente la necesidad de hacer un estudio *in vivo* cuando el *in vitro* ha demostrado el resultado. La misma consideración podría hacerse en contrario y parecería ser más adecuada: debería demostrarse el porqué de no hacer el trabajo *in vivo*.

Es conocido que los resultados hallados en un modelo no son fácilmente extrapolables a otro modelo. Aun dentro de un mismo tipo de modelo, pero cambiando de especie, la compatibilización de resultados no es directa. Dentro de un mismo tipo de modelos, por ejemplo *in vivo*, el escalado es una herramienta importante, pero requiere grandes esfuerzos y verificaciones.⁹ Más difícil es la extrapolación de resultados hallados en modelos *in vitro* a modelos *in vivo*.

Una duda que le surge al investigador es cuál es el mejor modelo para estudiar un fenómeno. La respuesta derivada de la experiencia parece ser sencilla: todos. Cada uno de ellos cumplirá un papel clave en la explicación de un fenómeno natural. La complementación de los modelos utilizados con los adecuados diseños experimentales y las pruebas estadísticas contribuirán a construir una hipótesis correcta respecto del fenómeno observado.

¿Cuál debería ser la secuencia lógica de experimentación? Respuesta difícil de dar. De hecho, la experimentación debe surgir como respuesta a un interrogante. En general, el interrogante es un fenómeno natural que tiene explicación parcial y, en nuestra área de experimentación en particular, podríamos decir algún funcionamiento fisiológico o patológico de algún sistema, aparato u órgano. Esta situación puede provenir de diferentes orígenes, pero básicamente son dos: causas genéticas o causas ambientales.

La primera investigación necesariamente debe ser *in vivo*, observacional, identificando causas de la situación en estudio. El trabajo en esta área es arduo ya que la cantidad de variables involucradas es innumerable. Contrastar resultados con otros grupos en los cuales las variables tengan otros valores daría información adicional de gran valor. Identificadas las posibles variables causantes del fenómeno, lo adecuado sería intentar demostrar que lo mismo ocurre en modelos experimentales *in vivo*, pero recurriendo a modelos animales, controlando mejor las variables y aplicando un escalado adecuado que permita evitar la distorsión de los resultados por mala aplicación de la dosis, el tiempo de tratamiento, la edad, el estado hormonal, etcétera.

Si los resultados *in vivo* con animales permiten reproducir con buena semejanza los resultados observados del fenómeno natural, el estudio del mecanismo podría encararse a través de experimentos *in vitro*, utilizando tejidos, células, componentes subcelulares o



moléculas. Estos experimentos podrían dar la forma en la que se produce el fenómeno y de alguna manera brindar información de cómo hacer manipulable o controlable el fenómeno natural observado.

¿Qué aportan los experimentos *in silico*? La modelización de los fenómenos naturales no es una práctica que se inició en los últimos años. Sin embargo, con el avance de la tecnología, la posibilidad de modelizar los fenómenos naturales se ha hecho cada vez más común, debido a la velocidad a la que se pueden resolver los modelos con la ayuda de las ciencias informáticas. La interrelación de las ciencias biológicas con las ciencias de la computación y la ingeniería han permitido construir y resolver modelos matemáticos que permiten llevar a una computadora un determinado fenómeno. ¿Qué ventajas ofrecen estos modelos? En primer lugar podríamos decir que no tienen desventajas, no producen grandes gastos y permiten progresar intelectualmente sobre el fenómeno, pensando en las variables que podrían influir sobre él. Estos modelos matemáticos computacionales o modelos *in silico* permiten simular situaciones reales, modificando los valores de las variables involucradas en un amplio rango de valores y contrastarlos con los valores reales. De esta manera nos mostrarán comportamientos que quizá llevaría décadas obtener de la observación o de la experimentación. Los modelos *in silico* a nivel biológico podríamos decir que están surgiendo lentamente pero de manera sostenida. El número de publicaciones periódicas en esa área lo avalan.¹⁰ La deficiencia actual de estos modelos radica en el escaso conocimiento necesario que existe a nivel biológico de los fenómenos y la interacción de estos con otros fenómenos. Por ejemplo, sabemos por experimentos *in vitro* que el fluoruro aumenta la proliferación y diferenciación de osteoblastos, pero por experimentos *in vitro* e *in vivo* sabemos que el fluoruro disminuye la secreción de insulina, hormona que también tiene efecto sobre

el hueso pero de manera contraria a lo que hace el fluoruro. Además, el fluoruro no tiene el mismo efecto sobre la secreción de insulina en diferentes animales. Por lo tanto, un modelo *in silico* debería contener ambos fenómenos y la escritura de estos en términos matemáticos tiene limitantes a nivel intelectual, que no son fácilmente salvables.

Los experimentos *in silico* son novedosos, ya que incorporan la computadora y los softwares de simulación, pero no son novedosos en la ciencia. Cuando un médico hace un diagnóstico y prescribe un medicamento, básicamente está haciendo un experimento *in silico*, tomando una decisión sobre la base de un modelo previamente desarrollado y esperando la respuesta que el modelo le predice. El avance de los modelos *in silico* ha sido importante y ya hay quienes plantean el reemplazo de experimentos con animales por experimentos en simuladores. En muchas áreas de la ciencia se ha planteado la duda sobre los modelos *in vivo* o *in vitro*. Por ejemplo, a nivel de la genotoxicidad, se estima que con el enorme número de sustancias con dicha capacidad podría llevar cientos de años llegar a obtener resultados fiables con modelos *in vitro* o *in vivo*. En cambio, el uso de algoritmos adecuados puede conducir a resultados fiables en mucho menos tiempo. La utilización de modelos Q(SAR)¹¹ (*quantitative structure activity relationship*) y Q(SPR) (*quantitative structure properties relationships*) para relacionar la estructura de una sustancia con su actividad¹² o la estructura con sus propiedades es prometedor. Si bien estos modelos tienen deficiencias, la utilización combinada de más de un software dentro de estas metodologías puede aportar resultados más fiables que los experimentos *in vivo* o *in vitro*.^{13,14} Los beneficios de la combinación de modelos son evidentes en innumerables trabajos de la farmacodinamia y farmacocinética.¹⁵ Un avance reciente que merece ser mencionado es un simulador para estudios preclínicos en diabetes, que fue aprobado por la FDA como sus-

tituto de estudios en animales.¹⁶ El simulador usa algoritmos que modelizan el sistema metabólico humano basado en datos de 300 pacientes diabéticos de diferentes edades y tiene 26 parámetros que permiten modelizar estados individuales de cada paciente. Permite introducir variables como ejercicio físico, dieta e inyección de insulina, y estudiar la eficacia de nuevos productos o compararlos con otros existentes.

Los experimentos *in silico* o simuladores permiten avances en diversos campos de la ciencia, la incorporación de simuladores en el entrenamiento de pilotos de aeronaves o en el área biomédica, por ejemplo para el entrenamiento en prácticas quirúrgicas es una muestra más del potencial de estos modelos.¹⁷

A modo de conclusión podríamos decir que el modelo que se va a utilizar para estudiar un fenómeno natural no es ajeno al principio de las 3 Rs¹⁸ que rige en las áreas

básicas de las ciencias biomédicas donde la experimentación con animales es corriente. Las 3 Rs propuestas por este principio: **Reemplazar** modelos *in vivo* cuando sea posible, **Refinar** las técnicas y metodologías de manera de obtener resultados más fiables y **Reducir** el número de animales para trabajos *in vivo* sin duda abren más aún las puertas a los modelos *in silico*. No hay duda de que, con el avance de la informática, la tecnología y la mayor cantidad de científicos en el área de la modelización *in silico*, el progreso de estos modelos los llevará a ocupar un lugar de elección entre los investigadores.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

(Recibido: septiembre 2013.

Aceptado: octubre 2013)

Referencias

1. Bernstein DS, Sadowsky N. Prevalence of osteoporosis in high and low fluoride areas in North Dakota. *JAMA* 1966; 198:499-504.
2. Rigalli A, Ballina JC, Puche RC. Bone mass increase and glucose tolerance in rats chronically treated with sodium fluoride. *Bone and Min* 1992; 16:101-8.
3. Vigorita VJ, Suda MK. The microscopic morphology of fluoride induced bone. *Clin Orthop Relat Res* 1983; 177:274-82.
4. Riggs BL, O'Fallon WM, Lane A, et al. Clinical trial of fluoride therapy in postmenopausal osteoporotic women: extended observations and additional analysis. *J Bone Miner Res* 1994; 9:265-75.
5. Lorian V. Differences between *in vitro* and *in vivo* studies. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32:1600-1.
6. Farley JR, Wergedal JE, Baylink DJ. Fluoride directly stimulates proliferation and alkaline phosphatase activity of bone forming cells. *Science* 1983; 222:330-2.
7. Xu H, Wang CH, Zhao ZT, Zhang WB, Li GS. Role of oxidative stress in osteoblasts exposed to sodium fluoride. *Biol Trace Elem Res* 2008; 123:109-15.
8. Polli JE. *In vitro* studies are sometimes better than conventional human pharmacokinetic *in vivo* studies in assessing bioequivalence of immediate-release solid oral dosage forms. *AAPS J* 2008; 10:289-99.



9. Campetelli G, Lombarte M, Basualdo M, Rigalli A. Scaling the endocrine system from rats to humans. *Computer Aided Chemical Engineering* 2013; 32:145-50.
10. SCImago. (2007). SJR – SCImago Journal & Country Rank. Consulta: septiembre 23, 2013, from <http://www.scimagojr.com>
11. Nantasenamat C, Isarankura-Na-Ayudhya C, Naenna T, Prachayasittikul V. A practical overview of quantitative structure-activity relationship. *Excli J* 2009; 8:74-88.
12. Nantasenamat C, Isarankura-Na-Ayudhya C, Prachayasittikul V. Advances in computational methods to predict the biological activity of compounds. *Expert Opin. Drug Discov* 2010; 5:633-54.
13. Hayashi M. Three Rs in mutation research. From in vivo to in silico evaluation. *AATEX* 2007; 14:9-13 .
14. Mekenyan OG, Petkov PI, Kotov SV, et al. Investigating the relationship between in vitro-in vivo genotoxicity: derivation of mechanistic QSAR models for in vivo liver genotoxicity and in vivo bone marrow micronucleus formation which encompass metabolism. *Chem Res Toxicol* 2012; 20:277-96.
15. Gharaghani S, Khayamian T, Ebrahimi M. Molecular dynamics simulation study and molecular docking descriptors in structure-based QSAR on acetylcholinesterase (AChE) inhibitors. *SAR QSAR Environ Res* 2013; 24:773-94.
16. Kovatchev BP, Breton M, Dalla Man C, Cobelli C. In Silico Preclinical Trials: A Proof of Concept in Closed-Loop Control of Type 1 Diabetes. *J Diabetes Sci Technol* 2009; 3:44-55.
17. Bambakidis NC, Selman WR, Sloan AE. Surgical rehearsal platform: potential uses in microsurgery. *Neurosurgery* 2013; Suppl 1:S122-6.
18. Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique. *London: Methuen* 1959, p. 238.