

Estudos *In Vitro*

Dado que as condições de laboratório são mais fáceis de configurar para estudos *in vitro*, e porque sistemas biológicos aparentemente mais simples e mais estáveis podem ser estudados com esta abordagem, há uma literatura extremamente volumosa sobre as interações biológicas da RF, a qual não pretendemos revisar em detalhe aqui. Análises exaustivas foram publicadas recentemente por outros autores, e referimos o leitor às mesmas (ver especialmente D'Inzeo, 2009; Marino, 2008a e 2008b; ICNIRP, 2009).

Os estudos *in vitro* tentam responder à questão fundamental que está na raiz de todos os bioefeitos potenciais da RF: se estes efeitos não puderem ser demonstrados clara e indubitavelmente ao nível de moléculas ou em preparações de células isoladas, não há nenhuma razão para continuar a pesquisa científica por estes efeitos em outros níveis de complexidade nos organismos vivos.

D'Inzeo (2009) propôs um modelo hierárquica, ou em camadas, para a interpretação dos resultados de acordo com estes níveis de complexidade, no qual afirma que

“os modelos de interação que visam a avaliação das possíveis consequências para a saúde tem que levar em conta a complexa organização típica dos sistemas vivos. Todos os sistemas biológicos devem ser considerados, do ponto de vista lógico, como uma estratificação dos níveis de complexidade, a partir do nível microscópico de átomos e moléculas, até o nível macro de todo o organismo, passando por estruturas subcelulares, células, tecidos, órgãos e sistemas. (...). Devido à complexa estrutura dos sistemas biológicos, para que campos elétricos ou magnéticos iniciem ou promovam efeitos adversos para a saúde de um organismo, eles devem provocar efeitos por meio de uma série de etapas, através de diferentes níveis de complexidade biológica, desde o nível molecular até o celular, os dos órgãos e dos organismos”.

Estes níveis são:

1. Das pequenas moléculas e íons inorgânicos em nível atômico e físico- químico
2. Das grandes moléculas orgânicas, como proteínas e ácidos nucleicos
3. Da membrana celular, incluindo receptores, canais, portões e mecanismos de transporte iônico ativo
4. Das funções metabólicas e vias bioquímicas no citoplasma e organelas celulares
5. Dos agregados de células, como os tecidos, as redes de células excitáveis, redes imunes, etc.

Além disso, mesmo que se comprove a existência de efeitos a um certo nível, isso não significa automaticamente que eles sejam importantes ou influenciem os outros níveis de complexidade acima deles. De acordo com D'Inzeo, “(embora) a funcionalidade de cada

nível esteja relacionada a de todos os níveis mais baixos, não é completamente determinado por eles, ou seja, cada nível superior mostra as chamadas propriedades emergentes."

De um ponto de vista didático, possíveis bioefeitos de campos de RF em nível molecular foram classificados em dois tipos principais:

1) **efeitos térmicos**, devidos ao fenômeno de aquecimento dielétrico que é típico de radiações não-ionizantes (RNI), tais como micro-ondas. A energia das RNIs não é suficientemente alta para interagir com os orbitais exteriores dos átomos e portanto, para quebrar ligações moleculares, de modo que o calor induzido por agitação de moléculas polares existentes no meio contribui para o aumento de temperatura como o seu único efeito plausível.

Foi descoberto que esse efeito térmico pode ocorrer até mesmo em níveis muito reduzidos de energia eletromagnética, uma vez que a maioria das células tem um mecanismo interno complexo de resposta ao calor, incluindo cascatas moleculares, proteínas de choque térmico, etc. Sabe-se que a exposição a temperaturas muito elevadas durante um tempo suficiente pode resultar na desnaturação de algumas moléculas, como proteínas (isto explica a cocção de alimentos nos fornos de micro-ondas, em níveis de energia de RNI extremamente altas). Para aquecimentos pequenos, no entanto (que pode ocorrer quando as células são expostas a um baixo nível de RF), apenas os efeitos indiretos acima mencionados são plausíveis e eles são suficientemente bem documentados.

2) **efeitos não-térmicos** foram teoricamente propostos como sendo outros possíveis mecanismos de interação não devidos a um aumento direto ou indireto da temperatura local. Um grande número destes modelos têm sido proposto e experimentalmente estudado em preparações *in vitro*. Vários autores têm afirmado que eles poderiam ser demonstrados, mas este é ainda um debate aberto na comunidade científica, uma vez que muitos estudos têm sido incapazes de demonstrar que eles existem. Em muitos casos, tem sido alegado que esses efeitos são causados por reações normais de células vivas ao aquecimento. Como mostrado abaixo, de todos os efeitos não térmicos que foram relatados como ocorrendo em células, tais como alterações nos níveis de enzimas, nenhum foi demonstrado com tendo qualquer consequência para a saúde do organismo, aparentemente porque o mesmo compensa-os facilmente através de seus mecanismos homeostáticos normais.

Assim, em relação à exposição à RF de baixo nível, o debate é centrado em:

1. se os efeitos não-térmicos realmente existem em um determinado nível de organização;
2. se eles são de magnitude suficiente e
3. se eles interagem com outros níveis de complexidade acima deles, de modo a desempenhar um papel na fisiopatologia de organismos intactos.

Como veremos adiante, a resposta científica tem sido majoritariamente negativa para todas as três questões.

Recentemente, mais de 100 artigos em 15 revistas diferentes sobre mecanismos de ação moleculares e celulares foram revistos por D'Inzeo (2009), permitindo a classificação de

efeitos térmicos não putativos em quatro grupos de modelos:

1. mecanismos de ressonância molecular;
2. acoplamento com sistemas não lineares;
3. efeitos devido à ação direta de campos elétricos e magnéticos;
4. mecanismos de cooperação devido às interações entre os diversos componentes da membrana celular.

Todos esses mecanismos já foram documentados experimentalmente, por vezes em baixos níveis de potência de baixa densidade de exposição, mas os autores e os revisores divergem quanto ao mecanismo mais plausível para a interação não-térmica das RNIs com a matéria. D'Inzeo conclui que "*no entanto, esses resultados são pouco extensíveis para níveis mais elevados de complexidade biológica e, assim, possíveis efeitos perigosos para a saúde humana*".

Outras análises recentes, por Swicord & Balzano (2009) e pela ICNIRP (2009), examinaram em pormenor as atuais evidências na literatura que suportam mecanismos de interação de RF com matéria viva, tanto em nível celular quanto no organismo. O leitor deve se referir a estas duas análises abrangentes para uma cobertura mais detalhada a respeito. A seguir resumimos alguns dos achados mais significativos.

Estudos de Oncogênese em Nível Molecular e Celular

Como os efeitos de CEM relacionados à causação do câncer (oncogênese) são considerados particularmente importantes, o impacto potencial dos efeitos sobre a oncogênese celular e subcelular tem recebido grande atenção por parte das pesquisas internacionais e, conseqüentemente, uma vasta literatura tem sido produzida neste campo. Marino (2009) analisou a literatura sobre estes aspectos antes de 2000 e de 2000 a 2007. A revisão classificou os trabalhos publicados de acordo com uma escala de quatro pontos (incluindo Provas Suficientes, Evidência Limitada, Evidência Inadequada, e Indícios de Falta de Efeito), a fim de descrever o grau de incerteza para os efeitos revistos. A escala foi adaptada a partir de uma desenvolvida pela Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (Repacholi e Cardis 1997).

A oncogênese em níveis celulares e subcelulares é extremamente complexa e ainda em estudo. O câncer é, de fato, uma denominação genérica para, provavelmente, centenas de doenças diferentes, com causas diferentes e diferentes histórias naturais. No entanto, um denominador comum é a instabilidade genética, causada por uma cadeia cumulativa de alterações nos mecanismos de reparo de DNA intracelular, a ativação de genes de inibição de tumores ou a expressão de oncogenes, a apoptose de células defeituosas, a reprodução, crescimento e mecanismos de sobrevivência das células, etc.

Eventualmente, tais variações acumuladas na maquinaria genética das células levam a uma linha celular que herda as mudanças e os ganhos de vantagem reprodutiva sobre as células normais e não morrem mais, levando ao crescimento do tecido neoplásico (**tumorigênese**).

Os estudos *in vitro* podem ser classificados em algumas áreas de investigação e experimentação: genotoxicidade, expressão de oncogenes, proliferação e diferenciação celular, e apoptose.

Genotoxicidade: é o nome dado à propriedade de agentes externos, tais como radiações eletromagnéticas, de danificar diretamente o DNA. Danos ao DNA podem ser avaliados experimentalmente pelo chamado teste do cometa, que identifica se ocorreram danos e rupturas de fita única das moléculas de DNA dentro do núcleo (teste do cometa neutro) ou se ocorreram rupturas de dupla fita (teste do cometa alcalino). O primeiro indica danos reparáveis, enquanto os últimos são não reparáveis, portanto bem mais perigosos para alterações irreversíveis do material genético. Outra classe comum de experimentos é testar se a RF de baixo nível é capaz de potencializar a genotoxicidade induzida por outro agente genotóxico conhecido, ou em linhagens celulares anormais (cancerígenas). Outra maneira de testar a genotoxicidade é investigar o aparecimento de micronúcleos e aneuploidia (número anormal de cromossomos), que são relacionados a alterações no DNA. Vários experimentos em genotoxicidade de RF de baixo nível que foram publicados antes de 2000 tinham demonstrado alguns efeitos (geralmente muito fracos ou difíceis de interpretar, devido a técnicas inadequadas, controles impróprios, etc.). A maioria dos experimentos realizados, no entanto, não mostrou nenhum efeito genotóxico, ou não conseguiu reproduzir ou confirmar estudos previamente positivos (em alguns casos pelos mesmos autores, sob exatamente as mesmas condições (Marino, 2008a).

A recente revisão, por esses autores, das 83 publicações em artigos que pesquisaram a genotoxicidade das RNI até 2009, revelou que 69% deles não conseguiram comprovar qualquer efeito, 20% indicaram a presença de efeitos, e os demais 11% eram inconclusivos. Uma avaliação genérica seguindo a classificação de evidência usada pela IARC (Agência Internacional em Pesquisa sobre o Câncer) chegou à conclusão que havia até então evidências inadequadas para interações de RF de baixo nível com potencial genotóxico, assim como para a potencialização de outras mutações. Portanto, como a oncogênese depende estritamente da sua ocorrência no nível celular, não há um mecanismo plausível para explicar a causação de câncer em níveis de RF abaixo dos níveis internacionais de segurança.

Outro parâmetro para carcinogenicidade em células é a transformação de células saudáveis em neoplásicas. Isso pode ser investigado por meio de efeitos diretos (chamados de **iniciação**) ou se a RF aumenta a transformação neoplásica causada por outros agentes conhecidos (chamados de **promoção** ou **copromoção**). A maioria absoluta de experimentos relatados até agora foi incapaz de detectar transformações neoplásicas causadas por sinais de micro-ondas usados em comunicação móvel; deste modo os revisores concluem que há uma falta de evidência desses efeitos.

Genes causadores de câncer e expressão proteica:

O teste mais moderno e tecnicamente superior para avaliar quantitativamente o potencial de carcinogenicidade devida à exposição à RF de baixo nível consiste no uso de técnicas de alto desempenho de transferência de dados para investigação simultânea das expressões de milhares de genes e do aparecimento das várias proteínas relacionadas ao câncer (genômica e proteômica). Elas surgiram apenas depois de 2000, quando foram desenvolvidas técnicas para testar simultaneamente até 10.000 genes, usando o chamado arranjo de microsondas (*micro-arrays*). Entre os genes de importância para o câncer estão os pro-oncogenes que fazem parte do nosso genoma, como *c-fos*, *c-jun* e *c-myc*, e proteínas como a *p53*, relacionada à supressão de câncer. Quando um gene é encontrado por ter sua expressão aumentada (*up regulation*, em inglês), significa que sua expressão ocorre a uma taxa maior que a normal (ou seja, sintetiza mais do que o normal a proteína a ele relacionada); se a expressão é diminuída (*down-regulated*), é o contrário.

Um efeito danoso pode ser obtido tanto em expressões aumentadas quanto diminuídas, mas os resultados são ainda de difícil interpretação.

Os resultados observados até agora têm sido muito heterogêneos: alguns experimentos usando testes de expressão genética em larga escala encontraram completa ausência de efeitos da exposição RF de baixo nível, ao passo que outros encontraram expressão aumentada (*up-regulated*) e retardo diminuído em uma proporção significativa dos genes. Por exemplo, Zhao R. *et al.* (2007) investigaram os efeitos sobre a expressão gênica da exposição intermitente de uma cultura de neurônios de ratos à RF com um SAR de 2 W/kg. Entre 1.200 genes candidatos, foram encontrados 24 genes com expressão aumentada e 10 com expressão diminuída. Vários outros trabalhos identificaram que os genes com expressão aumentada eram em sua maioria os relacionados com o grupo de proteínas denominadas caspases, envolvidas na apoptose (um tipo de morte celular de células com defeitos), enquanto que os genes de expressão diminuída eram relacionados às funcionalidades dos ciclos celulares.

Dados de validação estão faltando na maioria desses estudos positivos, assim, sua significância é difícil de ser interpretada. Em contraste com esses estudos, outros têm falhado em fornecer evidências de mudanças significativas na expressão gênica usando tecnologias de microarranjos. Por exemplo, Gurisik *et al* (2006) encontraram mudanças em somente 6 dos 8.400 genes testados, e mesmo assim esses eram fracamente inibidos. Achar um grande número de genes ou proteínas alteradas, sem um padrão consistente, em geral nos permite concluir que se trata de efeitos não específicos, mais provavelmente devidos ao choque térmico, embora os experimentadores muitas vezes tenham alegado que controlaram estritamente as variações de temperatura. A alteração de proteínas do grupo denominado hsp (em inglês, *heat shock proteins*) em muitos dos estudos positivos fornece evidências que esse poderia realmente ser o caso, particularmente porque elas são alteradas quanto não há irradiação RF presente, mas a temperatura média da cultura é aumentada. Mais ainda, a significância patológica de tal expressão gênica é desconhecida e é difícil de interpretar. Em geral, os revisores desses trabalhos têm concluído que a evidência é limitada ou há uma falta de evidência consistente para causação de câncer relacionada com genes e com a expressão proteica, da exposição à RF de baixo nível.

Proliferação de células e diferenciação: essas são duas importantes características das linhas de células neoplásicas: um aumento na proliferação celular, levando ao crescimento do tumor, e um decréscimo na diferenciação (desdiferenciação) das células neoplásicas, aumentando sua resistência à quimio- e radioterapia, o potencial de proliferação metastática e o grau de malignidade do tumor. A maioria das linhagens de células comuns investigadas são tiradas de tecidos humanos normais ou fibroblastos normais de ratos (células do tecido conjuntivo), bem como algumas linhagens de células neoplásicas, como as linfoblásticas e as células tiradas de neuroblastomas. De novo, o que se observa é que há uma larga variabilidade de resultados entre os diferentes trabalhos que são difíceis de interpretar, uma vez que os métodos e condições usadas pelos mesmos não podem ser adequadamente identificados ou comparados, incluindo o controle muito importante de exposição à RF, através da medida acurada do nível da densidade de potência, e o controle de variação do controle de temperatura. Os revisores (Marino, 2009) concluem que *“há uma evidência inadequada global para efeitos positivos de RF de baixo nível nesses parâmetros”*.

Apoptose: é a morte celular programada, ou seja, uma cadeia muito específica e

complexa de eventos celulares intrínsecos e extrínsecos que induzem defeitos nas células e as levam ao “suicídio”. O conteúdo da ruptura da célula é digerido por células do sistema imunológico, como os macrófagos. Uma família de enzimas (as caspases) é envolvida nesse processo, então elas podem ser avaliadas em ensaios experimentais, fornecendo uma evidência indireta do nível de apoptose em uma determinada preparação. Existem muitos trabalhos que investigaram a apoptose em células normais e cancerígenas (neoplásicas) em várias linhagens derivadas de tumores, resultantes à exposição à RF de alto e baixo nível. Uma potencial indução de apoptose em células normais é considerada danosa, mas é considerada benéfica quando ocorre em nível maior em células tumorais (essa poderia ser a explicação, por exemplo, para a eficácia de alguns tipos de irradiação ionizante instrumentada, como raios X e gama, sobre o crescimento de um tumor na oncoterapia, uma vez que um dos principais defeitos observados em câncer é a produção de células que são incapazes de apoptose, ou seja, a formação de uma linhagem de células “eternas”). Uma vez mais, o resultado geral da avaliação dos trabalhos publicados nessa linha de investigação é que não há evidência que a exposição à RF de baixa frequência possa induzir apoptose em células normais, e que a RF aja como agente pró-apoptótico em células tumorais, bem como uma evidência inadequada que a exposição à RF de baixa frequência possa interagir com agentes pro-apoptóticos conhecidos em preparações *in vitro*.

Conclusões dos estudos *in vitro*

A evidência científica atual a respeito dos prováveis mecanismos moleculares e celulares da RF foi revista e avaliada criticamente por diversos grupos e instituições nacionais e internacionais. Até agora, as conclusões mais recentes parecem ser unânimes. Por exemplo:

Sweden SSI (2008) Pesquisa recente sobre CEM e Riscos a Saúde – Quinto Relatório Anual do SSI: Grupo Especializado em Campos Eletromagnéticos, 2007 (Edição Revisada de 15 Abril de 2008)

<http://www.stralsakerhetsmyndigheten.se/Global/Publikationer/Rapport/Stralskydd/2008/ssi-rapp-2008-12.pdf>

A maioria desses estudos não demonstrou efeitos da exposição ao RF nos resultados estudados, incluindo também tentativas de replicar os efeitos genotóxicos observados no programa europeu REFLEX. (...) Seis estudos recentes em carcinogenicidade, alguns com taxas de exposição mais elevadas do que usadas anteriormente, retrata consistentemente a falta de efeito carcinogênico, e dois estudos em genotoxicidade retratam que o micronúcleo ou a quebra do da fita de DNA não aumentam após a exposição à RF.

ICNIRP (2009): “Exposição a Campos Eletromagnéticos de Alta Frequência, Efeitos Biológicos e Consequências a Saúde (100 kHz – 300 GHz)”

<http://www.icnirp.de/documents/RFReview.pdf>

*O mecanismo pelo qual a exposição à RF aquece o tecido biológico é bem entendido, e o mais marcante e consistente efeito da exposição à RF é a elevação da temperatura, que pode causar um certo número de alterações fisiológicas e patológicas em seres humanos e em animais de laboratório. A temperatura aumentada é responsável também pela confusão potencial em estudos *in vitro* e pode ser responsável por alguns efeitos positivos relatados.*

Pesquisas na América Latina

Muito poucos estudos *in vitro* sobre os bioefeitos da RF têm sido realizados na América Latina. Trabalhos de Heinrich e colaboradores (2006, comunicação preliminar da base de dados WHO-EMF) na Universidade Estadual de Campinas, no Brasil, estudaram os efeitos da radiação de micro-ondas emitida por telefones celulares sobre os cromossomos de linfócitos humanos *in vitro*. A técnica de obtenção do cariótipo espectral foi usada para esse propósito. Os pesquisadores concluíram que nenhum dano aos cromossomos pode ser observado nos níveis de radiação compatíveis com os padrões da ICNIRP ou inferiores a eles, pelo menos para aparelhos que operam em 800 MHz segundo os padrões AMPS e CDMA. Em níveis que excedem 10 W/kg foi observado algum dano cromossomal, indicando uma dependência dose-efeito quanto ao aumento da acrocentricidade dos cromossomos e alterações em seu comprimento.

Conclusões

Como veredicto final da avaliação da literatura a respeito das funções celulares relacionadas à oncogênese após a exposição à RF de baixa intensidade, em geral concluímos que as evidências existente até o momento de uma relação causa-efeito são inadequadas ou que há uma falta de consistência nas evidências válidas. Existe uma confusão e controvérsia nessa área de pesquisa, porque muitas vezes as pesquisas que obtiveram efeitos positivos não puderam ser validadas ou reproduzidas por outros pesquisadores. Em particular, os efeitos de curta duração sobre os ciclos celulares e sua regulação, a expressão gênica e a síntese de proteínas, os danos ao material genético (DNA) e a transformação e diferenciação celulares relacionadas à oncogênese celular, não podem ser traduzidos automaticamente como sendo causadores do câncer. Por exemplo, a maioria das culturas celulares usadas nesses experimentos, como as células do sistema hematopoiético, são altamente suscetíveis a muitos agentes físicos externos. Até mesmo pequenas mudanças de temperaturas as afetam, mas isso provavelmente acontece quando elas são irradiadas externamente ao corpo, uma vez que isso remove a forte proteção natural dada pelo organismo à irradiação pelos mecanismos homeostáticos. Deste modo, a relevância desses resultados para a saúde humana pode ser contestada.

Na seção seguinte discutiremos os estudos relacionados ao câncer em organismo intactos (*in vivo*).