

Evandro Luís de Oliveira Niero

**EFEITOS DE ÁCIDO CINÂMICO SOBRE
MELANÓCITOS E CÉLULAS DERIVADAS DE
MELANOMA HUMANOS: AVALIAÇÃO DO SEU
POTENCIAL ANTITUMORAL E DE PROTEÇÃO
CONTRA DANOS CELULARES CAUSADOS POR
RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Gláucia Maria Machado-Santelli

São Paulo

2010

RESUMO

NIERO, E. L. O. Efeitos de ácido cinâmico sobre melanócitos e células derivadas de melanoma humanos em cultura: avaliação do seu potencial antitumoral e de proteção contra danos celulares causados por radiação ultravioleta. 2010. Tese (Biologia Celular) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

No Brasil, o câncer de pele corresponde a 25% dos tumores malignos registrados, e apesar de melanomas representarem apenas 4% das neoplasias malignas da pele eles são considerados mais graves por possuírem maiores chances de formar metástases. Uma vez que poucos tratamentos são eficazes contra melanomas metastáticos, os estudos de novos compostos capazes de reverter o fenótipo tumoral ou de diminuir o espalhamento do tumor têm sido intensificados e alguns compostos naturais, como os ácidos fenólicos, vêm merecendo destaque por sua atividade antitumoral e baixa toxicidade. Assim, o presente trabalho traçou como objetivos avaliar a especificidade da citotoxicidade de ácido cinâmico em melanócitos (NGM) e células derivadas de melanoma (HT-144) humanos enfocando alterações no ciclo celular, no processo de morte, na comunicação e mobilidade celulares e formação de aberrações nucleares. Também investigamos o potencial de proteção desta droga contra danos naquelas células causados por radiação ultravioleta. O ácido cinâmico mostrou-se eficiente na inibição do crescimento das culturas de melanoma em relação aos melanócitos de acordo com ensaio de MTT. Essa inibição estava diretamente associada, provavelmente, a danos no DNA que levaram à inibição da síntese de DNA – inclusive na linhagem NGM – como comprovado por ensaios de incorporação de BrdU, à formação de aberrações nucleares como micronucleações, binucleações e multinucleações e posterior indução de apoptose. A maior concentração de ácido cinâmico testada também foi responsável pela indução de formação de brotos nucleares e micronúcleos nas células NGM. Elementos do citoesqueleto foram reorganizados na presença de ácido cinâmico na concentração de 3,2 mM e esta reorganização pode ter sido responsável por afetar o padrão de migração das células tratadas, diminuindo consideravelmente a mobilidade celular em ambas as linhagens estudadas. Apesar de não ter restabelecido a comunicação entre as células de melanoma, o ácido cinâmico foi capaz de aumentar os níveis citoplasmáticos de conexina 43 em células derivadas de hepatocarcinoma, efeito que pode contribuir para a indução de apoptose segundo alguns autores. Esses resultados sugerem um forte potencial citotóxico do composto testado em células da linhagem HT-144 em comparação com os melanócitos utilizados como controles. Porém este composto não foi capaz de proteger nenhuma das duas linhagens dos efeitos da radiação ultravioleta e seu efeito genotóxico em células NGM tratadas com 3,2 mM do composto indica que conclusões sobre seu mecanismo de ação ainda dependem de estudos adicionais.

Palavras-chave: Ácido cinâmico. Melanoma. Ciclo celular. Apoptose. Citoesqueleto. Aberrações nucleares.

ABSTRACT

NIERO, E. L. O. **Cinnamic acid effects on cultured human melanocytes and melanoma derived cells: evaluation of its antitumor potential and protection against cell damage caused by ultraviolet radiation.** 2010. Doctor thesis (Cell Biology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Since metastatic melanoma has no effective treatment and the average survival period is only 6 to 10 months, one way to control the malignancy is its prevention. In many cases, the term “prevention” is used to chemopreventive suppression or reversal of premalignant lesions even when the lesion is not completely eliminated. Several studies have showed that the consumption of vegetables and fruits could decrease the risk of many malignancies or protect against cancers. Phenolic acids, commonly found in plants and their derivatives have been largely studied because their antitumor activities and low cytotoxicity. Thus, the present work aimed to evaluate the specificity of the cinnamic acid (a phenolic acid) cytotoxicity in melanocytes (NGM) and melanoma derived cells (HT-144) just following cell cycle arrest, cell death, cell mobility and communication and formation of nuclear aberration. We have also investigated the potential of this drug in protecting cell damage caused by ultraviolet radiation. Cinnamic acid was very efficient in inhibiting cell growth of melanoma cells compared to melanocytes according to MTT assay. The inhibition was probably associated with DNA damage leading to DNA synthesis inhibition – including NGM lineage – as showed by BrdU incorporation assay, induction of nuclear aberrations (micronucleation, binucleation and multinucleation) and then apoptosis. High concentration of cinnamic acid (3,2 mM) induced formation of nuclear buds and micronuclei in NGM cells. We observed cytoskeleton reorganization with 3,2 mM of cinnamic acid and this reorganization must have been responsible by decreasing cell mobility in both cell lineages. Besides we have not observed communication of the melanoma cells after treatment with cinnamic acid, the drug appears to have increased expression of connexin 43 in hepatocarcinoma cells. This effect could be related to the induction of apoptosis according to some authors. Cinnamic acid did not showed protection effects against ultraviolet radiation. Our results indicate a great cytotoxic potential of cinnamic acid in HT-144 cells compared to NGM. However, its genotoxic effects showed by NGM cells after exposure to 3,2 mM of cinnamic acid indicates that the mechanisms of action of cinnamic acid must be further investigated.

Key words: Cinnamic acid. Melanoma. Cell cycle. Apoptosis. Cytoskeleton. Nuclear aberrations.

1 INTRODUÇÃO

Na epiderme humana, melanócitos e queratinócitos encontram-se associados em uma proporção de aproximadamente 1:36, formando uma unidade funcional denominada unidade melano-epidérmica (FITZPATRICK; BREATHNACH, 1963; JIMBOW *et al.*, 1976). Em condições normais, a homeostase do tecido determina se os melanócitos devem permanecer quiescentes, proliferar ou ativar processo de morte (BISSELL; RADISKY, 2001). Distúrbios desse equilíbrio poderiam desencadear tumorigênese levando à formação de melanoma. A cadeia de eventos que leva à instalação do câncer inclui proliferação descontrolada, transtorno de diferenciação celular, invasão e metástase para órgãos distantes, eventos relacionados, normalmente, a alterações na comunicação e adesão entre as células neoplásicas e suas vizinhas (HANAHAN; WEINBERG, 2000; PARK *et al.*, 2000).

A formação dos cânceres de pele está normalmente associada à exposição à radiação ultravioleta (UV) (ARMSTRONG; KRICKER, 2001; VEIERØD *et al.*, 2010) e foi mostrado que células pigmentadas (com melanina) apresentam comportamento diferente daquelas não pigmentadas após exposição àquela radiação, sendo que a melanina pode tanto diminuir os principais danos causados no DNA pela UV (KOBAYASHI *et al.*, 1993; SMIT *et al.*, 2001) como gerar espécies reativas de oxigênio capazes de danificar o DNA (HILL; HILL, 2000; KOCH; CHEDEKEL, 1986).

Tem sido muito difícil encontrar uma assinatura genética definitiva para os efeitos da radiação ultravioleta na formação de melanoma e outros cânceres de pele, mas mutações em alguns genes como os que codificam p53, p16 e ras, têm sido detectadas (MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2002). A expressão de p16 e de outras proteínas tem sido estudada com função de diagnosticar melanomas malignos e diversos trabalhos mostram a menor expressão de p16 em células de melanoma, principalmente em tumores recorrentes (GEORGE *et al.*, 2010; HILLIARD *et al.*, 2009; KARIM *et al.*, 2009).

No Brasil, o câncer de pele corresponde a 25% dos tumores malignos registrados, e apesar de melanomas representarem apenas 4% das neoplasias

malignas da pele eles são considerados mais graves por possuírem maiores chances de formar metástases (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2010). Apesar de décadas de estudos, melanomas metastáticos não possuem tratamento efetivo e o período de sobrevivência de pacientes com este problema gira em torno de 6 a 10 meses (JEMAL *et al.*, 2006; SOENGAS; LOWE, 2003). Em 2.008, 1.303 pessoas morreram devido à doença e quase 6.000 novos casos são estimados para o ano de 2.010 (INCA, 2010).

Uma maneira de controlar a malignidade tumoral é sua prevenção. Muitas vezes o termo prevenção é utilizado para reversão do fenótipo de lesões pré-malignas (SINGH; LIPPMAN, 1998a; SINGH; LIPPMAN, 1998b) e estudos já demonstraram que o consumo de vegetais e derivados poderia minimizar o fenótipo maligno (BIRT *et al.* 1996; CONNEY *et al.*, 1997; LIU *et al.*, 1995) e possuir efeitos anticâncer *in vitro* e *in vivo* (FERGUSON *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2003; PANWAR *et al.*, 2005).

Dentre as substâncias bioativas naturais mais estudadas estão os compostos fenólicos, metabólitos secundários de plantas capazes de inibir danos no DNA (RICE-EVANS *et al.*, 2000) e proteger células da pele contra danos causados pela radiação UV (SAIJA *et al.*, 2000). Dentre estes compostos estão os ácidos fenólicos como o ácido cinâmico, ácido caféico e ácido ferúlico.

1.1 Ácido cinâmico

O ácido cinâmico, também denominado ácido 3-fenil-2-propenóico (figura 01), consiste em um ácido graxo aromático de ocorrência natural, originado de plantas superiores e encontrado em estoraques, óleos de canela e folhas de coca. A estrutura de sua molécula é normalmente encontrada na forma *trans* (LIU *et al.*, 1995). Esse composto pertence ao grupo das auxinas, hormônios vegetais responsáveis por regular o crescimento e a diferenciação celular, e alguns de seus derivados desempenham um importante papel na defesa da planta contra o ataque de microrganismos e insetos (THIMANN, 1969). O ácido cinâmico também se mostrou eficaz como agente terapêutico antimicrobiano e antifúngico (EKMEKCIOGLU *et al.*, 1998).

Derivados desse composto podem ser encontrados em diversos produtos de origem vegetal como café, maçãs, frutos cítricos, cereais, além de outros (CLIFFORD, 1999). Seus derivados fenólicos incluem o ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico (ácido ferúlico) e o ácido 3,4-dihydroxicinâmico (ácido caféico) (figura 01) (WATTENBERG *et al.*, 1980). Este último tem significativo efeito citotóxico contra várias linhagens de células tumorais (GRUNBERGER *et al.*, 1988; KAMPA *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2003).

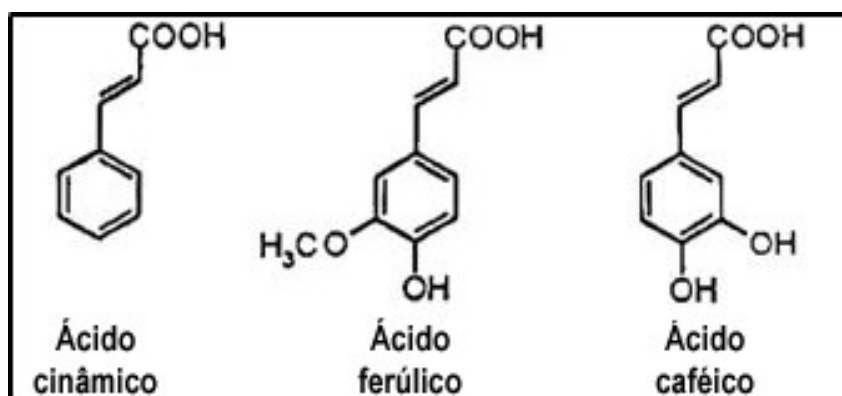


Figura 01: Fórmulas estruturais de alguns compostos fenólicos de interesse para o presente estudo (modificada de Lai e Yamaguchi, 2006)

O ácido cinâmico exerce efeito antiproliferativo devido à inibição da isoprenilação de proteína, que inibe a transdução do sinal mitogênico, mas os mecanismos que resultam em inibição do crescimento tumoral são pouco conhecidos (LIU *et al.*, 1995). Alguns análogos de ácido cinâmico agem como inibidores específicos da proteína tirosinoquinase, resultando em inibição do crescimento celular (SHIRAISHI *et al.*, 1989).

Foi demonstrado que o tratamento de células Caco-2 com o ácido cinâmico a 8,0mM por uma hora diminuiu os níveis de AMPc (EKMEKCIOGLU *et al.*, 1998). Alterações nos níveis do nucleotídeo cíclico já foram implicadas na modulação da diferenciação de outras células de câncer como adenocarcinoma de próstata (BANG, Y. *et al.*, 1994), células HL-60 (BANG, B. *et al.*, 1994) e células de neuroblastoma (PRASAD *et al.*, 1994).

Tomando como modelo três diferentes linhagens de melanoma, Liu, *et al.* (1995), observaram que o ácido cinâmico foi capaz de induzir diferenciação por meio de alterações morfológicas e aumento na produção de melanina em duas delas. De acordo com esses autores, a droga, na concentração de 5,0mM, promoveu marcante redução na capacidade invasiva, que estaria associada com a modulação da expressão de genes implicados na metástase e na imunogenicidade.

1.2 Oncogênese e controle do ciclo celular

A ligação entre oncogênese e proteínas relacionadas ao ciclo celular foi demonstrada em vários tipos de tumores (BUCKLEY *et al.*, 1993; KEYOMARSI; PARDEE, 1993; LAMMIE *et al.*, 1991; MOTOKURA *et al.*, 1991; ROSENBERG *et al.*, 1991), sendo que os dois eventos chave na proliferação das células eucariômicas são a síntese de DNA e a segregação cromossômica. Somam-se a eles a importância dos pontos de checagem existentes ao longo do ciclo celular.

O ponto de checagem em G1 está relacionado com a integridade do DNA e, portanto, com o reparo de lesões antes que ele seja replicado na fase S, envolvendo a ativação do gene TP53 que codifica a proteína p53. Novo ponto de checagem ocorre antes da segregação dos cromossomos na mitose, em G2 (COX; LANE, 1995). Uma pausa na progressão do ciclo neste ponto estaria associada à ativação da proteína Chk1, que acontece em consequência de erros na replicação do DNA (WEINERT, 1998).

TP53 é um dos genes mais comumente mutados em células de câncer. A proteína expressa por este gene funciona como um fator de transcrição (FARMER *et al.*, 1992; FUNK *et al.*, 1992) e sua ativação resulta na transcrição de uma grande variedade de genes que estão envolvidos no metabolismo das células e regulação do ciclo celular como WAF1, um potente inibidor de quinases dependentes de ciclinas (EL DEIRY *et al.*, 1993), e GADD45, responsável por parada no crescimento celular (KASTAN *et al.*, 1992).

Kastan, *et al.* (1991) mostraram que os níveis de p53 aumentam consideravelmente após indução de danos no DNA causados pelos mais diversos

agentes, incluindo UV, radiação gama e compostos químicos, fazendo com que as células tivessem a progressão para fase S do ciclo bloqueada para reparo do DNA.

Surpreendentemente, melanomas apresentam baixa frequência de mutações no gene TP53 (9%) (PETITJEAN *et al.*, 2007) e enquanto a maioria dos tumores inativa as funções da p53 já no nível do gene, melanomas agem preferencialmente no nível de CDKN2A e seu produto p14^{ARF} (HARLAND *et al.*, 2005; RANDERSON-MOOR *et al.*, 2001; RIZOS *et al.*, 2001) (figura 02).

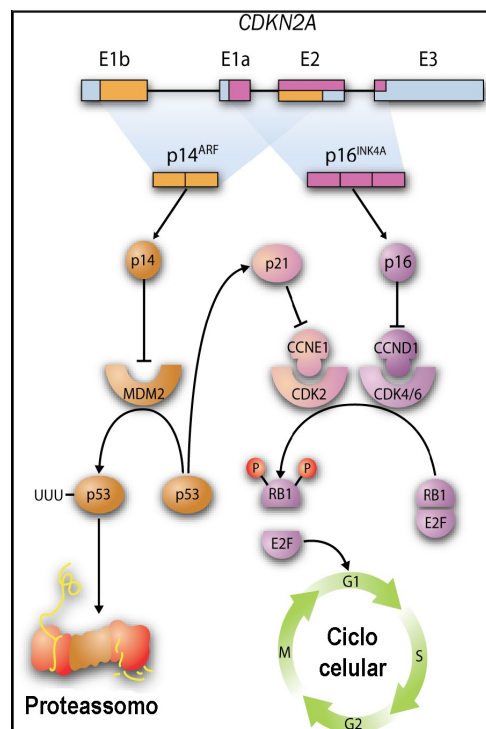


Figura 02: Esquema de sinalização dos produtos de CDKN2A sobre proteínas relacionadas com controle do ciclo celular (modificada de Sekulic, *et al.*, 2008).

Marrot, *et al.* (2005) discutiram a relação entre ativação de TP53 e outros genes com a parada do ciclo celular em pontos específicos após exposição de melanócitos a UV. Estes autores verificaram ativação de diferentes pontos de checagem nestas células associados a diferentes tempos de exposição a UV.

Os pontos de checagem nas fases G1 e G2 do ciclo celular são de grande importância no estudo do mecanismo de ação de novas substâncias que apresentem atividade antimitótica. Além da parada em G1 provocada, por exemplo, por radiação

ionizante via ativação de p53, determinados compostos orgânicos de origem natural demonstraram ter esse mesmo efeito. Por exemplo, a didemina B, isolada a partir da ascídia *Trididemnum solidum* por Rinehart, *et al.* (1981), bloqueia o ciclo em G1-S na linhagem de células B16 (ZI *et al.*, 1998).

Lee, *et al.* (2003) mostraram uma relação direta entre o gene supressor de tumor TP53 e o tratamento de células de glioma com ácido caféico fenetil éster. O tratamento com este ácido fenólico levou as células tumorais a desencadearem processo apoptótico via ativação do TP53.

1.3 Indução de morte celular

A indução de morte celular em tumores é um dos processos responsáveis pela redução de seu tamanho. Diversas técnicas são empregadas, atualmente, para a detecção de morte celular por apoptose graças a características morfológicas peculiares desse processo como, por exemplo, condensação nuclear, reorganização do citoesqueleto e perda da adesão celular (KROMER *et al.* 1995).

A maquinaria intracelular responsável pela apoptose parece ser semelhante em todas as células animais. Esta maquinaria depende de uma família de proteases denominadas caspases. As caspases são sintetizadas na célula como precursores inativos, ou procaspases. Uma vez ativadas, as caspases clivam e então ativam, outras procaspases, resultando em uma cascata de amplificação proteolítica. Algumas caspases ativadas clivam proteínas-chave na célula (ALBERTS *et al.*, 2009).

Um dos eventos típicos do processo de apoptose é a ativação de endonucleases que clivam o DNA nas regiões internucleossomais, originando, eventualmente, oligonucleotídeos regulares que, separados em um gel de agarose, resultam em uma imagem com padrão de bandas de tamanhos que correspondem a múltiplos de aproximadamente 200 pares de bases denominado “ladder” ou escada (FESUS *et al.*, 1991).

Após a descoberta de que, em células de mamíferos, ocorre clivagem regular do DNA em regiões específicas entre os nucleossomos durante o processo de apoptose, a eletroforese de DNA passou a ser muito usada para a identificação desse evento; a

detecção do padrão em escada em gel de agarose vem sendo considerada um parâmetro bioquímico do processo (KERR *et al.*, 1995). No entanto, alguns trabalhos indicam que em alguns sistemas pode não ser observada a clivagem do DNA (COHEN *et al.*, 1992; FALCIERI *et al.*, 1993). Portanto, quando se utiliza a eletroforese de DNA para procurar apoptose em um sistema particular, é prudente que essa técnica seja complementada com estudos morfológicos (KERR *et al.*, 1995).

O processo de apoptose pode ser caracterizado já em sua fase inicial em algumas linhagens celulares. Na busca da produção de um anticorpo monoclonal para a citoqueratina 18, LEERS, *et al.* (1999), verificaram que um dos anticorpos, chamado de M30, reconheceu células epiteliais cujos padrões morfológicos pareciam ser apoptóticos. Essa observação levou-os à identificação de um sítio de clivagem por caspases em citoqueratina 18 e à caracterização de um epítipo que é exposto apenas durante a apoptose.

Em experimentos utilizando citometria de fluxo, Lee, *et al.* (2003), mostraram que o tratamento com ácido caféico foi capaz de aumentar em 24% a frequência de células apoptóticas na linhagem celular C6 de glioma após exposição de 36 horas ao composto na concentração de 50 μ M. Ácido caféico, ácido cinâmico e outros compostos fenólicos possuem grande atividade antioxidante (FOTI *et al.*, 2004; NAKAJIMA *et al.*, 2009; SIDDARAJU; DHARMESH, 2007) e esta atividade está relacionada com a ação antiproliferativa dessas moléculas em linhagens tumorais (BANSKOTA *et al.*, 2002; NG; WU, 2009).

1.4 Apoptose e junções comunicantes

Um fator importante a ser considerado no processo apoptótico é a sua propagação via junções comunicantes. Krutovskikh, *et al.* (2002), mostraram que os sinais de morte celular, em células BC31 de carcinoma de bexiga de rato, são propagados através da comunicação intercelular via junções comunicantes, e que estes sinais podem contribuir para a supressão tumoral. Muitos trabalhos com transfecção de genes que codificam conexinas mostraram aumento na indução de morte celular

apoptótica (FUJIMOTO *et al.*, 2005; MURAMATSU *et al.*, 2002; TANAKA; GROSSMAN, 2004).

Conexinas são proteínas que se associam em número de seis para formarem uma estrutura denominada conéxon ou hemicanal na membrana plasmática de uma célula. Os conéxons de duas células adjacentes se associam para formar um canal que “une” os citoplasmas das duas células (BERTRAM, 2000). A região de comunicação molecular entre duas células, rica em conéxons, é denominada junção comunicante e sua formação é considerada muito importante para a regulação do controle homeostático (TROSKO; RUCH, 2002). Se o processo de tumorigênese envolve perda da homeostase de um tecido, provavelmente a comunicação celular por junções comunicantes estará alterada durante esse processo (YAMAKAGE *et al.*, 1998).

Das pelo menos 21 isoformas de conexinas encontradas em humanos (SOHL; WILLECKE, 2004), a conexina 43 (com peso molecular de 43 KDa) é a mais expressa quando consideramos os diversos tipos celulares (LAIRD, 2006). Pesquisas demonstraram que a transfecção de células tumorais e/ou deficientes na formação de junções comunicantes funcionais com os genes para conexinas, principalmente a conexina 43, aumentaram os níveis de expressão das proteínas nas células, restaurando, ou não, a comunicação entre elas e diminuindo as taxas de proliferação celular (HIRSCHI *et al.*, 1996; IONTA *et al.*, 2009; JOU *et al.*, 1993; MESNIL *et al.*, 1995).

A carcinogênese é um processo de múltiplos estágios dividido em iniciação, promoção e progressão. Acredita-se que a perda de comunicação celular esteja relacionada com este processo, principalmente com o estágio de promoção do tumor (HOTZ-WAGENBLATT; SHALLOWAY, 1993). Alguns autores mostraram que certas substâncias, como polifenóis extraídos de coco, podem proteger células epiteliais de fígado de rato (RLE) contra a inibição de comunicação celular via junções comunicantes causada por H₂O₂ (LEE *et al.*, 2009), diminuindo assim, o efeito carcinogênico desta molécula.

A menor expressão de conexinas também foi associada ao processo de invasão que pode desencadear metástases em tumores. Milde-Langosch, *et al.* (2008) e Schröder, *et al.* (2010) demonstraram que a superexpressão de Fra-2 (um fator de

transcrição envolvido na regulação de invasão e metástase em cânceres de mama) diminuiu a expressão de conexina 43 em células MCF7 e MDA-MB231. No mesmo estudo, Milde-Langosch, *et al.* (2008) também mostraram que esta menor expressão de conexina 43 na linhagem MCF7 aumentou o potencial invasivo e a mobilidade das células.

1.5 Mobilidade celular e invasividade tumoral

A mobilidade de células é um padrão diretamente associado à reorganização do citoesqueleto de actina e dos microtúbulos tanto em condições fisiológicas como patológicas (SMALL *et al.*, 2002). Microtúbulos agem juntamente com microfilamentos para manter a polarização celular durante a migração das células (RODRIGUEZ *et al.*, 2003; SMALL; KAVERINA, 2003). Dois tipos de movimentos têm sido descritos em células tumorais: um mesenquimal, caracterizado por alongamento da célula, e outro amebóide, com arredondamento da célula (WOLF *et al.*, 2003). Acredita-se que o processo de metástase mais eficiente esteja relacionado à formação de células capazes de realizar ambos os movimentos, adaptando sua morfologia e movimento ao microambiente que cerca estas células (SANZ-MORENO *et al.*, 2008).

Sabe-se que a família de proteínas Rho é de fundamental importância para o controle do movimento celular por meio de sua ação na montagem de microfilamentos, contratilidade actomiosina e microtúbulos (RIDLEY, 2001). A expressão dessas proteínas está normalmente alterada em tumores e esta alteração está diretamente relacionada com a progressão da doença (SAHAI; MARSHALL, 2002).

Ballestrem, *et al.* (2000) mostraram o envolvimento da polimerização da actina-F e dos microtúbulos na mobilidade e migração das células de melanoma murino B16, ressaltando o papel das fibras de actina na formação e controle da protrusão lamelar. Também utilizando esta linhagem celular mais as linhagens B16F1 e B16F10, Kurisu, *et al.* (2005) estudaram o papel das proteínas WAVE (*WASP-family verprolin-homologous proteins*) no processo de formação das protrusões celulares durante a invasão *in vitro* e metástase *in vivo*.

Sabendo que Rac1 ativa a polimerização da actina através das proteínas WAVE e do complexo Arp2/3 levando à formação de protrusões de membrana que empurram

esta estrutura para a direção do movimento das células, o grupo de Kuriso silenciou o gene da proteína WAVE2 (entre outros) mostrando seu papel decisivo no controle da polimerização do citoesqueleto de actina de células de melanoma murino e sua relação com a metástase, já que a diminuição de concentração citoplasmática dessa proteína reduziu a capacidade de invasão e metástase das células citadas acima.

Lu, *et al.* (2007) mostraram que é possível diminuir a mobilidade de células de carcinoma de pulmão (A549) com a utilização de extrato de chá verde (composto, em grande parte, por polifenóis). Essa diminuição deu-se por meio de expressão aumentada de anexina I, com consequente aumento de polimerização de actina-F e aumento de adesão. Em outro estudo, Lu, *et al.* (2009) encontraram, nas mesmas condições, aumento na expressão de outras proteínas relacionadas com a polimerização de actina e migração celular como: lamina A/C e anexina II. Outras associações entre compostos naturais e diminuição do processo invasivo de células tumorais foram mostradas por Ho, *et al.* (2007) em que catequinas do chá verde inibiram a produção de metaloproteinases de matriz com consequente inibição de migração e invasão de células OC2 derivadas de câncer de mucosa bucal humana, sem, no entanto, alterar a viabilidade celular.

Outros grupos mostraram que extratos ricos em derivados de ácido cinâmico também foram capazes de diminuir a mobilidade e processo de invasão celulares em concentrações pouco citotóxicas em células MDA-MB 231 derivadas de câncer de mama humana (HOSTANSKA *et al.*, 2007). Desde 1993 Welch, *et al.* estudam a inibição do processo invasão por cinamamídeos em células de melanoma. A variedade morfológica apresentada por células de melanoma metastático em estudos histopatológicos (ROSAI, 2004) torna este tipo celular um bom modelo para análises de movimentação celular.

1.6 Citoesqueleto como alvo de terapias antitumorais

Algumas substâncias interferem no ciclo celular agindo sobre elementos do citoesqueleto como a actina e a tubulina. A exposição de uma célula em divisão a alguns desses agentes produz, por exemplo, o desaparecimento dos fusos mitóticos,

bloqueando a divisão da célula (INOUE, 1981; SALMON *et al.*, 1984). Dado que certos compostos quimioterápicos têm o citoesqueleto como seu alvo específico, é muito importante o estudo da interdependência do citoesqueleto com seu papel anti-neoplásico (ROSENBLUM; SHIVERS, 2000).

Microtúbulos e filamentos de actina estão presentes em todos os tipos de células eucarióticas (ALBERTS *et al.*, 2009) e apresentam papel fundamental no crescimento e divisão celular, motilidade, sinalização e desenvolvimento e manutenção da forma celular (JORDAN; WILSON, 1998). A polimerização de monômeros de actina em filamentos de actina e dos dímeros de tubulina em microtúbulos ocorre de maneira similar, por meio da via de nucleação e alongação, na qual a formação de um núcleo, constituído de um polímero curto, é seguida por alongação de sua extremidade pela adição não-covalente de novas subunidades, sendo esse processo reversível e dinâmico. Esse complexo processo de polimerização utiliza energia originada da hidrólise de nucleotídeos-fosfato (JORDAN; WILSON, 1998).

Os filamentos de actina (também conhecidos como microfilamentos) são polímeros com arranjo helicoidal da proteína actina. As subunidades de actina associam-se em oposição de cabeça e de cauda para compor filamentos com polaridade estrutural evidente (POLLARD; COOPER, 2009). Os microfilamentos se apresentam sob forma de estruturas flexíveis, com diâmetro entre 5 e 9 nm, e podem estar organizados sob a forma de numerosos feixes lineares, de redes bidimensionais e de géis tridimensionais. Os filamentos de actina estão dispersos por toda a célula, mas encontram-se mais concentrados no córtex, logo abaixo da membrana plasmática. (ALBERTS *et al.*, 2009).

Os microfilamentos apresentam-se modificados em células transformadas e essas alterações estão relacionadas com a propriedade das células tumorais de crescer anormalmente, sua habilidade de aderência aos tecidos e sua aumentada capacidade de metástase (ASSOIAN; ZHU, 1997; JANMEY; CHAPONNIER, 1995). Um conhecido agente que apresenta efeito sobre a actina é a citocalasina, um metabólito de fungo capaz de estabilizar os filamentos de actina impedindo sua despolimerização. Devido a esse fato, a citocalasina impede a contração dos anéis de actina na telófase, responsáveis pela separação das células filhas (COOPER, 1987).

Estudos com ácido cinâmico mostraram que esse composto inibe o crescimento colonial do fungo filamentosso *Neurospora crassa* e é capaz de promover alterações no citoesqueleto, como diminuição da actina no ápice das hifas, e alterar a distribuição nuclear, a qual é dependente de proteínas de transporte associadas aos microtúbulos (filamentos de tubulina). Esses efeitos sobre o citoesqueleto atribuem ao ácido cinâmico ação citotóxica em fungos e abrem perspectivas para investigação em outros sistemas celulares (NEVES, 2000).

Os efeitos citotóxicos em células tumorais que causam ativação de TP53 levando à morte celular por apoptose também podem estar relacionados a tratamentos que causem anormalidades genéticas como desorganização de microtúbulos e falha na segregação cromossômica durante a mitose (LANNI; JACKS, 1998; SABLINA *et al.*, 1998).

Os microtúbulos são longos cilindros ocos formados por heterodímeros das proteínas globulares α e β tubulinas. Apresentando um diâmetro de 25 nm, são bem mais rígidos que os filamentos de actina. São longos e retilíneos e caracteristicamente apresentam uma das extremidades ligadas a um único centro organizador (WADE, 2009).

O nucleotídeo que se liga à β -tubulina pode estar tanto sob a forma de GTP quanto de GDP e esta situação é intercambiável. A hidrólise do GTP tem um importante efeito na dinâmica do microtúbulo. Como os microfilamentos, os microtúbulos são estruturas polares que apresentam uma extremidade positiva e outra negativa (WADE, 2009). Essa polaridade é essencial para o funcionamento das proteínas motoras, principais responsáveis pelo tráfego de vesículas entre organelas, bem como, pelo posicionamento dessas organelas no citoplasma (SAKOWICZ *et al.*, 1998; WADE, 2009).

Durante a divisão celular, os microtúbulos possuem papel fundamental no alinhamento dos cromossomos no equador da célula e pela segregação desses cromossomos para pólos opostos da célula (COMPTON, 1998; MAYER *et al.*, 1999). Por isso, os microtúbulos são considerados estruturas muito importantes no ciclo celular, constituindo-se em alvos para o desenvolvimento da quimioterapia do câncer, não somente com o intuito de provocar sua despolimerização, mas também podendo

impedir sua polimerização ou ainda estabilizar a estrutura do microtúbulo (CHEN *et al.*, 1996; RUDNER; MURRAY, 1996).

O primeiro agente antimitótico caracterizado foi a colchicina, alcalóide obtido da planta superior *Colchicum autumnale* e espécies relacionadas. Esse composto permitiu, entre outras coisas, avanços importantes no estudo dos microtúbulos (WEISENBERG *et al.*, 1968). Além da colchicina, alcalóides de vinca, como vincristina, vimblastina e vindesina, favorecem a forma despolimerizada da tubulina, enquanto taxóides promovem a polimerização da tubulina formando microtúbulos estáveis (MANFREDI; HORWITZ, 1984; RINGEL; HORWITZ, 1991).

A dissociação dos microtúbulos dos fusos mitóticos inibe a divisão celular e, eventualmente, leva à morte celular (MANFREDI; HORWITZ, 1984; RINGEL; HORWITZ, 1991). Disfunção da p53 aumenta a probabilidade de aparecimento de células com anormalidades genéticas que continuam proliferando (FUKASAWA *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 1994). A fuga da apoptose pelas células pode levar à formação de células aneuploides ou micronucleadas (DECORDIER *et al.*, 2008).

1.7 Indução de alterações nucleares

Erros durante o ciclo celular podem levar à formação de células aneuploides, células com desvio no conteúdo diplóide de DNA, devido à perda ou ganho de cromossomos ou partes de cromossomos (GANEM *et al.*, 2009). A aneuploidia pode ser um processo dinâmico capaz de levar uma célula à instabilidade genética devido a problemas na maquinaria de replicação do DNA ou de segregação cromossômica após alguns ciclos de divisão (LENGAUER *et al.*, 1997).

A aneuploidia têm sido relacionada a diversos tipos de tumores ao longo dos anos (MACHADO-SANTELLI *et al.*, 1994; DUESBERG *et al.*, 2006; MUKHERJEE *et al.*, 2010). Hede (2005) sugeriu que a aneuploidia poderia servir como evento supressor de tumores, uma vez que o aumento de aberrações no cariótipo poderia desencadear o processo de morte celular programada. O processo de multinucleação também foi associado ao de morte celular (NAKAGAWA, 2006).

A perda ou ganho de um único cromossomo ou de partes de cromossomos podem acarretar alterações nos níveis de expressão de várias proteínas e levar à formação de mutações envolvidas em transformações malignas, além de poderem desencadear erros no processo de segregação cromossômica (FUKASAWA, 2005; LENGAUER *et al.*, 1997).

Análises de alterações nucleares são amplamente utilizadas para o estudo de compostos com potencial citotóxico por refletirem danos à cromatina. Dentre essas alterações encontram-se os micronúcleos, pequenos corpos extra nucleares formados na divisão celular, podendo ser constituídos por cromossomos inteiros ou fragmentados envolvidos por partes do envoltório nuclear (NUSSE *et al.*, 1996; VIAGGI *et al.*, 1987), dependendo dos agentes pelos quais são gerados: aneugênicos ou clastogênicos (HERENS *et al.*, 1995; VANDERKERKEN *et al.*, 1989). A detecção de aberrações cromossômicas tem sido feita pela utilização de teste de micronucleação, uma vez que micronúcleos podem ser originados por fragmentação do DNA ou distúrbios nos fusos mitóticos (FENECH, 2006).

Dessa maneira, testes de micronucleação são utilizados atualmente com diversas finalidades, como, por exemplo, o biomonitoramento de populações expostas a agentes mutagênicos (MAJER *et al.*, 2001), estudo de substâncias com potencial genotóxico (CHUNG *et al.*, 2002; MAFFEI *et al.*, 2002), busca por agentes inibidores da carcinogênese (ROSIN, 1992), e estudos em ecotoxicologia (GAUTHIER *et al.*, 1999).

O emprego de testes de micronúcleos mostrou resultados interessantes sobre a utilização de ácido caféico como inibidor de quebra cromossomal induzida por DMBA (7,12-dimetilbenz[*a*]antraceno) em células de medula óssea de camundongos (ABRAHAM, 1991; RAJ *et al.*, 1983). Outros agentes derivados de ácido cinâmico apresentaram efeitos semelhantes.

Por outro lado, ácido caféico fenetil-éster e outros dois derivados de ácido cinâmico, todos extraídos de própolis, causaram fragmentação de DNA na linhagem celular 26-L5 de colón murino nas concentrações de 1 a 10 µg/mL, induzindo apoptose nas células tumorais (NAGAOKA *et al.*, 2002).

A sincronização do ciclo celular possibilitou a Shimizu, *et al.* (1998; 2000) proporem que o excesso de DNA amplificado poderia ser eliminado de células de tumor

de colo retal humano (COLO 320DM e COLO320HSR) por um mecanismo de brotamento durante a fase S, resultando na formação de micronúcleos. Ao final da fase S, as estruturas resultantes seriam, então, eliminadas do citoplasma celular. Estudos mais recentes mostram que o processo de transcrição gênica pode acontecer no interior do micronúcleo e que essa estrutura pode servir como uma via de eliminação de oncogenes amplificados alterando o fenótipo celular (UTANI *et al.*, 2007).

Uma vez que a diferenciação celular e a eliminação de oncogenes amplificados podem ser aceleradas por certas drogas (SHIMIZU *et al.*, 1994; VON HOFF *et al.*, 1991) seria interessante analisar os efeitos de compostos considerados antitumorais no processo de formação de micronúcleos e possível perda de oncogenes amplificados.

A busca de novos compostos com atividade antibiótica, antiviral, antiinflamatória e inibitória do crescimento celular resultou na descoberta de atividade antiproliferativa do ácido cinâmico e derivados, como cinamaldeído e ésteres do ácido caféico, em células de mamíferos (JIANG; ZHEN, 2000; LIU *et al.*, 1995; NAKAYAMA *et al.*, 1996).

O efeito antioxidante destas moléculas mostrou-se potente contra o processo de mutagênese causado por diversos agentes (ABRAHAM, 1991; RAJ *et al.*, 1983; PANWAR *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2009). No entanto, uma vez que tais compostos naturais foram encontrados como causadores de danos no DNA e/ou morte celular pela indução de formação de espécies reativas de oxigênio (HSU *et al.*, 2009; THAYYULLATHIL *et al.*, 2008), é importante comparar seus efeitos em células tumorais e normais na tentativa de entender a ação de diferentes concentrações do ácido cinâmico nos mecanismos que envolvam ciclo, morte e diferenciação celulares e seus efeitos de proteção contra agentes causadores de danos ao DNA.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De posse do que foi exposto no presente trabalho podemos realizar algumas inferências no que diz respeito aos efeitos de ácido cinâmico sobre as linhagens celulares estudadas:

- O tratamento com ácido cinâmico apresentou efeito antiproliferativo seletivo para as linhagens tumorais HT-144 e M2 de melanomas e A549 de carcinoma de pulmão em comparação com as células NGM.
- A atividade de indução de morte celular do ácido cinâmico ocorre a partir de 24 horas após o início do tratamento, sendo que esta atividade é mais intensa nas células HT-144 em comparação com a linhagem NGM. Esta indução está diretamente associada com a ativação de caspase 9, mas não foi possível estabelecer completa relação com a expressão de p53 fosforilada e de p21.
- A indução de morte celular na linhagem HT-144 parecer ser independente das alterações no citoesqueleto como mostrado pelo ensaio de marcação por M30, sendo que alterações nos microtúbulos podem tanto induzir apoptose como serem consequência desse processo.
- A maior concentração de ácido cinâmico testada causou diminuição na frequência de microfilamentos periféricos e esta alteração deve estar diretamente relacionada com a diminuição na mobilidade das células HT-144.
- As células NGM foram capazes de realizar comunicação celular, o que não aconteceu com as células de melanoma. O ácido cinâmico não foi capaz de restabelecer a comunicação entre células HT-144, mas esta droga parece induzir aumento nos níveis citoplasmáticos de conexina 43 em células HTC de carcinoma de fígado de rato, por isso, os efeitos de ácido cinâmico sobre o

controle da comunicação intercelular via junções comunicantes deveriam ser mais bem investigados.

- A frequência de aberrações nucleares foi muito maior nas linhagens tumorais HT-144 e A549 que na linhagem NGM. Estas alterações poderiam ser responsáveis pela maior indução de morte naquelas linhagens. No entanto, a grande indução de micronúcleações e a formação de brotos nucleares em células NGM após tratamento com 3,2 mM de ácido cinâmico mostram que o efeito genotóxico desta droga deve ser melhor avaliado.
- Não foi possível estabelecer correlação entre a indução de micronúcleos e a expulsão de oncogenes amplificados em células A549, indicando que tais estruturas devem ser formadas por danos diretos no DNA ou interferência no processo de divisão das células.
- A linhagem NGM mostrou-se menos sensível à radiação ultravioleta que a linhagem de melanoma quanto à indução de morte celular. No entanto, a radiação apresentou drástico efeito no citoesqueleto da linhagem NGM, o que poderia levar as células desta linhagem à apoptose ou a um processo de mutagênese.
- O ácido cinâmico não teve efeito de proteção contra alterações celulares induzidas por exposição à radiação ultravioleta, não importando se o tratamento fosse realizado antes ou após a irradiação.
- A linhagem NGM apresentou-se com marcações do cromossomo 9p e do gene que codifica p16 esperadas para melanócitos normais, enquanto HT-144 mostrou amplificação deste cromossomo, porém com menor quantidade de marcação para o gene citado.

REFERÊNCIAS¹

ABRAHAM, S. K. Inhibitory effects of coffee on the genotoxicity of carcinogens in mice. **Mutat. Res.**, v. 262, n. 2, p. 109-114, 1991.

AKASHI, Y. et al. Enhancement of the antitumor activity of ionising radiation by nimotuzumab, a humanised monoclonal antibody to the epidermal growth factor receptor, in non-small-cell lung cancer cells lines of differing epidermal growth factor receptor status. **Br. J. Cancer**, v. 98, n. 4, p. 749-755, 2008.

ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. 5^a ed. New York, USA, Garland Science, 2009.

AMANN, J.; et al. Aberrant Epidermal Growth Factor Receptor signaling and enhanced sensitivity to EGFR inhibitors in lung cancer. **Cancer Res.**, v. 65, n. 1, p. 226-235, 2005.

ARMSTRONG, B. K.; KRICKER, A. The epidemiology of UV induced skin cancer. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 63, p. 8-18, 2001.

ASSOIAN, R. K.; ZHU, X. Cell anchorage and the cytoskeleton as partners in growth factor dependent cell cycle progression. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 9, p. 93-98, 1997.

BAI, Y.; HAYASHI, R.; HATA, T. Kinetic studies of carboxypeptidase Y.II. Effect of substrates product analogs on peptidase and esterase activities. **J. Biochem.**, p. 77-81, 1975.

BALASUBRAMANIAN, K.; SCHROIT, A. J. Aminophospholipid asymmetry: a matter of life and death. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 65, p. 701-734, 2003.

BALLESTREM, C. et al. Actin-dependent lamellipodia formation and microtubule-dependent tail retraction control-directed cell migration. **Mol. Biol. Cell**, v. 11, n. 9, p. 2999-3012, 2000.

BANG, B. E.; ERICSEN, C.; AARBAKKE, J. Effects of cAMP and cGMP elevating agents on HL-60 cell differentiation. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 75, p. 108-112, 1994.

BANG, Y. J. et al. Terminal neuroendocrine differentiation of human prostate carcinoma cells in response to increase intracellular cyclic AMP. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 5330-5334, 1994.

BANSKOTA, A. H. et al. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. **J. Ethnopharmacol.**, v. 80, n. 1, p. 67-73, 2002.

BAR, P. R. Apoptosis: the cell's silent exit. **Life Sci.**, v. 59, p. 369-378, 1996.

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BASTIAN, B. C. Understanding the progression of melanocytic neoplasia using genomic analysis: from fields to cancer. **Oncogene**, v. 22, p. 3081–3086, 2003.

BASTIAN, B. C. et al. Genetic changes in neoplasms arising in congenital melanocytic nevi: differences between nodular proliferations and melanomas. **Am. J. Pathol.**, v. 161, n. 4, p. 1163-1169, 2002.

BASTIAN, B. C. et al. Classifying melanocytic tumors based on DNA copy number changes. **Am. J. Pathol.**, v. 163, p. 1765-1770, 2003.

BATISTA, L. F. Z. et al. Involvement of DNA replication in ultraviolet-induced apoptosis of mammalian cells. **Apoptosis**, v. 11, p. 1139-1148, 2006.

BAUER, J.; BASTIAN, B. C. Distinguishing melanocytic nevi from melanoma by DNA copy number changes: comparative genomic hybridization as a research and diagnostic tool. **Dermatol. Ther.**, v. 19, p. 40-49, 2006.

BERTRAM, J. S. Cellular communication via gap junctions. **Science & Medicine**, v. 1, p. 18-27, 2000.

BHIMANI, R. S. et al. Inhibition of oxidative stress in HeLa cells by chemopreventive agents. **Cancer Res.**, v. 53, p. 4528-4533, 1993.

BIRT, D. F. et al. Diet intervention for modifying cancer risk. **Prog. Clin. Biol. Res.**, v. 395, p. 223-234, 1996.

BISSELL, M. J.; RADISKY, D. Putting tumours in context. **Nat. Rev. Cancer**, v. 1, p. 46-54, 2001.

BOGGIO, R. F. et al. Controle dos distúrbios dérmicos humanos por bloqueadores do canal de cálcio (Verapamil). In: 39º Congresso Brasileiro de Cirurgia Plástica (Anais); Salvador, BA. 2002.

BUCKLEY, M. F. et al. Expression and amplification of cyclin genes in human breast-cancer. **Oncogene**, v. 8, p. 2127-2133, 1993.

BUDIARDJO, I. et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v. 15, p. 269-290, 1999.

CARLSON, J. A. et al. Molecular diagnostics in melanoma. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 52, p.743-775, 2005.

CHANG, S. H. et al. Prognostic biomarkers in uveal melanoma: evidence for a stem cell-like phenotype associated with metastasis. **Melanoma Res.**, v. 18, n. 3, p. 191-200, 2008.

CHEN, N. et al. Cytoqueratin expression in malignant melanoma: potential application of in situ hybridization analysis of mRNA. **Melanoma Res.**, v. 19, n. 2, p. 87-93, 2009.

CHEN, R. H. et al. Association of spindle assembly checkpoint component X MAD2 with an attached kinetochore. **Science**, v. 274, p. 242-246, 1996.

CHEN, Y-K. et al. Effect of caffeic acid phenethyl ester, an antioxidant from propolis, on inducing apoptosis in human leukemic HL-60 cells. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 49, p. 5615-5619, 2001.

CHUNG, H. W.; KANG, S. J.; KIM, S. Y. A combination of the micronucleus assay and a FISH technique for evaluation of the genotoxicity of 1,2,4-benzenetriol. **Mutat. Res.**, v. 516, n. 1-2, p. 49-56, 2002.

CIMA, F.; BALLARIN, L. Tributyltin induces cytoskeletal alterations in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri* phagocytes via interaction with calmodulin. **Aquatic Toxicol.**, v. 48, p. 419-429, 2000.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden. **J. Sci. Food Agric.**, v. 79, p. 362-372, 1999.

COHEN, G. M. et al. Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. **Biochem. J.**, v. 286, p. 331-334, 1992.

COMPTON, D. A. Focusing on spindle poles. **J. Cell Sci.**, v. 111, p. 1477-1481, 1998.

CONNERY, A.H. et al. Some perspectives on dietary inhibition of carcinogenesis: studies with curcumin and tea. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 216, p. 234-245, 1997.

COOPER, J. A. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. **J. Cell Biol.**, v. 105, n. 4, p. 1473-1478, 1987.

CORFE, B. M.; DIVE, C.; GARROD, D. R. Changes in intercellular junctions during apoptosis precede nuclear condensation or phosphatidylserine exposure on the cell surface. **Cell Death Diff.**, v. 7, p. 234-235, 2000.

COTTER, T.G. et al. Microfilament-disrupting agents prevent the formation of apoptotic bodies in tumor cells undergoing apoptosis. **Cancer Res.**, v. 52, p. 997-1005, 1992.

COX, L.S.; LANE, D.P. Tumor suppressors, kinases and clamps: how p53 regulates the cell cycle in response to DNA damage. **Bioessays**, v. 17, p. 501-508, 1995.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; WEISS, R. B. Coral reefs, forests and thermal vents: the worldwide exploration of nature for novel antitumor agents. **Semin. Oncol.**, v. 24, n. 2, p. 156-163, 1997.

DBOUK, H. A. et al. Connexins: a myriad of functions extending beyond assembly of gap junction channels. **Cell Commun. Signal.**, v. 7, n. 4, 2009.

DECORDIER, I.; CUNDARI, E.; KIRSCH-VOLDERS, M. Survival of aneuploid, micronucleated and/or polyploid cells: Crosstalk between ploidy control and apoptosis. **Mutat. Res.**, v. 651, p. 30-39, 2008.

DIAS, V. M. **Micronúcleos em células tumorais: biologia e implicações para a tumorigênese**. 152 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

DOONG, H. et al. Calcium antagonists alter cell shape and induce procollagenase synthesis in keloid and normal human dermal fibroblasts. **J. Burn Care Rehabil.** v. 17, n. 6, part 1, p. 497-514, 1996.

DUESBERG, P.; LI, R.; FABARIUS, A.; HEHLMANN, R. Aneuploidy and cancer: from correlation to causation. **Contrib. Microbiol.**, v. 13, p. 16-44, 2006.

EKMEKCIOGLU, C.; FEYERTAG, J.; MARKTL, W. Cinnamic acid inhibits proliferation and modulates brush border membrane enzyme activities in Caco-2 cells. **Cancer Lett.** v. 128, p. 137-144, 1998.

EL DEIRY, W. S. et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. **Cell**, v. 75, p. 817-825, 1993.

FADOK, V. A. et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. **J. Immunol.**, v. 148, p. 2207-2216, 1992.

FALCIERI, E. et al. The protein kinase inhibitor staurosporine induces morphological changes typical of apoptosis in MOLT-4 cells without concomitant DNA fragmentation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 193, p. 19-25, 1993.

FARMER, G. E. et al. Wild-type p53 activates transcription in vitro. **Nature**, v. 358, p. 83-86, 1992.

FENECH, M. Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology, **Toxicology**, v. 181-182, p. 411-416, 2002b.

FENECH, M. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer, **Drug Discov. Today**, v. 7, n. 22, p.1128-1137, 2002a.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutat. Res.**, v. 600, n. 1-2, p. 58-66, 2006.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutat. Res.**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FERGUSON, L. R.; PHILPOTT, M.; KARUNASINGHE, N. Dietary cancer and prevention using antimutagens. **Toxicology**, v. 198, p. 147-159, 2004.

FESUS, L.; THOMÁZY, V.; FALUS, L. Induction and activation of tissue transliterations durin programmed cell death. **FEBS Lett.**, v. 224, p. 104-08, 1991.

FITZPATRICK, T. B.; BREATHNACH, A. S. The Epidermal Melanin Unit System. **Dermatol. Wochenschr.**, v. 147, p. 481-489, 1963.

FOTI, M. C.; DAQUINO, C.; GERACI, C. Electron-Transfer reaction of Cinnamic Acids and their methyl esters with the DPPH(*) radical in alcoholic solutions. **J. Org. Chem.**, v. 69, p. 2309-2314, 2004.

FRIEDL, P. Prespecification and plasticity: Shifting mechanisms of cell migration. **Curr Opin Cell Biol.**, v. 16, p. 14-23, 2004.

FUJIKI, H. et al. Cancer inhibition by green tea. **Mutat. Res.**, v. 402, p. 307–310, 1998.

FUJIMOTO, E. et al. Cytotoxic effect of the Her-2/Her-1 inhibitor PKI-166 on renal cancer cells expressing the connexin 32 gene. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 97, n. 2, p. 294-298, 2005.

FUKASAWA, K. et al. Genomic instability and apoptosis are frequent in p53 deficient young mice. **Oncogene**, v. 15, n. 11, p. 1295-1302, 1997.

FUKASAWA, K. Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. **Cancer Lett.**, v. 230, n. 1, p. 6-19, 2005.

FUNK, W.D. et al. A transcriptionally active DNA binding site for human p53 protein complexes. **Mol. Cell Biol.**, v. 12, p. 2866-2871, 1992.

GANEM, N. J.; GODINHO, S. A.; PELLMAN, D. A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. **Nature**, v. 460, n. 7252, p. 278-282, 2009.

GARBISA, S. et al. Tumor gelatinases and invasion inhibited by the green tea flavanol epigallocatechin-3-gallate. **Cancer**, v. 91, p. 822–832, 2001.

GAUTHIER, J.M. et al. Biomarkers of DNA damage in marine mammals. **Mutat. Res.**, v. 444, p. 427-439, 1999.

GEORGE, E.; POLISSAR, N. L.; WICK, M. Immunohistochemical evaluation of p16INK4A, E-cadherin, and cyclin D1 expression in melanoma and Spitz tumors. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 133, n. 3, p. 370-379, 2010.

GRUNBERGER, D. et al. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. **Esperientia**, v. 44, p. 230-232, 1988.

GUNARATNAM, M.; GRANT, M. H. Damage of F-actin and cell death induced by chromium VI and nickel in primary monolayer culture of rat hepatocytes. **Toxicol In Vitro**, v. 18, p. 245-253, 2004.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

HARLAND, M. et al. Intronic sequence variants of the CDKN2A gene in melanoma pedigrees. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 43, n. 2, p. 128-136, 2005.

HEDE, K. Which came first? Studies clarify role of aneuploidy in cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 97, n. 2, p. 87-89, 2005.

HERENS, C. et al. Nuclear lesions during rat hepatocarcinogenesis. II. Measuring the micronuclei during initiation, promotion and progression of rat hepatocarcinogenesis induced with diethylnitrosamine. **Mutat. Res.**, v. 329, n. 2, p. 161-171, 1995.

HILL, H. Z.; HILL, G. J. UVA, pheomelanin and the carcinogenesis of melanoma. **Pigment Cell Res.**, v. 13, p. 140-144, 2000.

HILLIARD, N. J.; KRAHL, D.; SELLHEYER, K. p16 expression differentiates between desmoplastic Spitz nevus and desmoplastic melanoma. **J. Cutan. Pathol.**, v. 36, n. 7, p. 753-759, 2009.

HIRSCHI, K. K. et al. Gap junction genes Cx26 and Cx43 individually suppress the cancer phenotype of human mammary carcinoma cells and restore differentiation potential. **Cell Growth Differ.**, v. 7, n. 7, p. 861-870, 1996.

HO, Y-C. et al. Epigallocatechin-3-gallate inhibits the invasion of human oral cancer cells and decreases the productions of matrix metalloproteinases and urokinase-plasminogen activator. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 36, p. 588-593, 2007.

HOSTANSKA, K. et al. Inhibitory effect of an isopropanolic extract of black cohosh on the invasiveness of MDA-mB 231 human breast cancer cells. **In Vivo**, v. 21, n. 2, p. 349-355, 2007.

HOTZ-WAGENBLATT, A.; SHALLOWAY, D. Gap junctional communication and neoplastic transformation. **Crit. Rev. Oncog.**, v. 4, p. 541-558, 1993.

HSU, Y. L. et al. 6-Dehydrogingerdione, an active constituent of dietary ginger, induces cell cycle arrest and apoptosis through reactive oxygen species/c-Jun N-terminal kinase pathways in human breast cancer cells. **Mol. Nutr. Food Res.**, 2010. In press.

INOUE, S. Cell division and the mitotic spindle. **J. Cell Biol.**, v. 91, p. 131s-47s, 1981.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Definições de tipos de câncer. [página na Internet]. Rio de Janeiro: INCA. Disponível em:

<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/de_finicao> Acesso em 23 mar. 2010.

IONTA, M. et al. Exogenous Cx43 expression decrease cell proliferation rate in rat hepatocarcinoma cells independently of functional gap junction. **Cancer Cell Int.**, v. 9, n. 22, 2009.

JAISWAL, A. K. et al. Caffeic acid phenethyl ester stimulates human antioxidant response element-mediated expression of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene. **Cancer Res.**, v. 57, p. 440-446, 1997.

JANMEY, P. A.; CHAPONNIER, C. Medical aspects of the actin cytoskeleton. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 7, n. 1, p. 111-117, 1995.

JEMAL, A. et al. Cancer statistics, 2006. **CA Cancer J. Clin.**, v. 56, n. 2, p. 106-130, 2006.

JIANG, X.; ZHEN, Y. Cinnamamide, na antitumor agent with low cytotoxicity acting on matrix metalloproteinase. **Anticancer Drugs**, v. 11, n. 1, p. 49-54, 2000.

JIMBOW, K. et al. Some aspects of melanin biology: 1950-1975. **J. Invest. Dermatol.**, v. 67, n. 1, p. 72-89, 1976.

JOBIN, F.; TREMBLAY, F.; MORISSETTE, M. Platelet reactions and immune processes. III. Inhibition of platelet aggregation by chymotrypsin substrates and inhibitors. **Thromb. Diath. Haemorrh.**, v. 23, p. 110, 1970.

JORDAN, M. A.; WILSON, L. The use of drugs to study the role of microtubules assembly dynamics in living cells. **Methods Enzymol.**, v. 298, p. 252-276, 1998.

JOU, Y. S. et al. Restoration of gap-junctional intercellular communication in a communication-deficient rat liver cell mutant by transfection with connexin 43 cDNA. **Mol. Carcinog.**, v. 8, n. 4, p. 234-244, 1993.

KAMPA, M. et al. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. **Breast Cancer Res.**, v. 6, n. 2, p. R63-74, 2004.

KANG, N. J. et al. Inhibition of gap junctional intercellular communication by the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate in normal rat liver epithelial cells. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, n. 21, p. 10422-10427, 2008.

KARIM, R. Z. et al. Reduced p16 and increased cyclin D1 and pRb expression are correlated with progression in cutaneous melanocytic tumors. **Int. J. Surg. Pathol.**, v. 17, n. 5, p. 361-367, 2009.

KASTAN, M. B. et al. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. **Cancer Res.**, v. 51, p. 6304-6311, 1991.

KASTAN, M. B. et al. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in Ataxia-Telangiectasia. **Cell**, v. 71, p. 587-597, 1992.

KERR, J. F. R. et al. Anatomical methods in cell death. **Methods Cell Biol.**, v. 46, p. 1-27, 1995.

KEYOMARSI, K.; PARDEE, A. P. Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast-cancer cells. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, v. 90, p. 1112-1116, 1993.

KIM, J. et al. Protective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on UVA and UVB-induced skin damage. **Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.**, v. 14, p. 11-19, 2001.

KIM, M. H. et al. Regulation of urokinase plasminogen activator by epigallocatechin-3-gallate in human fibrosarcoma cells. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 487, p. 1-6, 2004.

KINGHORN, A. D.; CHIN, Y. W.; SWANSON, S. M. Discovery of natural product anticancer agents from biodiverse organisms. **Curr. Opin. Drug Discov. Devel.**, v. 12, n. 2, p.189-196, 2009.

KOBAYASHI, J. et al. Cystodytins A, B and C, novel tetracyclic aromatic alkaloids with a potent antineoplastic activity from the Okinawa tunicate *Cystodytes dellechiaiei*. **J. Org. Chem.**, v. 53, p. 1800-1804, 1988.

KOBAYASHI, N. et al. Melanin reduces ultraviolet-induced DNA damage formation and killing rate in cultured human melanoma cells. **J. Investig. Dermatol.**, v. 101, p. 685-689, 1993.

KOCH, W.; CHEDEKEL, M. Photoinitiated DNA damage by melanogenic intermediates *in vitro*. **Photochem. Photobiol.**, v. 44, p. 703-710, 1986.

KOO, H. et al. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 5, p. 1302-1309, 2002.

KROMER, G. et al. The biochemistry of programmed cell death. **FASEB J.**, v. 9, p. 1277-1287, 1995.

KRUTOVSKIKH, V. A.; PICCOLI, C.; YAMASAKI, H. Gap junction intercellular communication propagates cell death in cancerous cells. **Oncogene**, v. 21, n. 13, p. 1989-1999, 2002.

KURISU, S. et al. Rac-WAVE2 signaling is involved in the invasive and metastatic phenotypes of murine melanoma cells. **Oncogene**, v. 24, n. 8, p. 1309-1319, 2005.

LAIRD, D. W. Life cycle of connexins in health and disease. **Biochem. J.**, v. 394, p. 527-543, 2006.

LAMMIE, G.A. et al. D11s287, a putative oncogene on chromosome-11Q13, is amplified and expressed in squamous-cell and mammary carcinomas and linked to bcl-1. **Oncogene**, v. 6, p. 439-444, 1991.

LANNI, J. S.; JACKS, T. Characterization of the p53-dependent post mitotic checkpoint following spindle disruption. **Mol. Cell Biol.**, v. 18, n. 2, p. 1055-1064, 1998.

LAY, Y. L.; YAMAGUCHI, M. Phytocomponent p-hydroxycinnamic acid stimulates bone formation and inhibits bone resorption in rat femoral tissues in vitro. **Mol. Cell Biochem.**, v. 292, n. 1-2, p. 45-52, 2006.

LE HEGARAT, L. et al. Marine toxin okadaic acid induces aneuploidy in CHO-K1 cells in presence of rat liver postmitochondrial fraction, revealed by cytokinesis-block micronucleus assay coupled to FISH. **Environ. Toxicol.** v. 19, n. 2, p. 123-128, 2004.

LEE, D. E. et al. Cocoa polyphenols attenuate hydrogen peroxide-induced inhibition of gap-junction intercellular communication by blocking phosphorylation of connexin 43 via the MEK/ERK signaling pathway. **J. Nutr. Biochem.**, 2009. In press.

LEE, J. M. et al. Susceptibility to radiation-carcinogenesis and accumulation of chromosomal breakage in p53 deficient mice. **Oncogene**, v. 9, n. 12, p. 3731-3736, 1994.

LEE, Y-J. et al. Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cells. **Biochem. Pharmacol.**, v. 66, p. 2281-2289, 2003.

LEE, Y-J. et al. Preferential cytotoxicity of caffeic acid phenethyl ester analogues on oral cancer cells. **Cancer Lett.**, v. 153, p. 51-56, 2000.

LEERS, M. P. G. et al. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. **J. Pathol.**, v. 187, p. 567-572, 1999.

LENGAUER, C.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Genetic instability in colorectal cancers. **Nature**. v. 386, n. 6625, p. 623-627, 1997.

LI, P. et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. **Cell**, v. 91, p. 479-489, 1997.

LIANG, Y. C. et al. Suppression of extracellular signals and cell proliferation through EGF receptor binding by (-)-epigallocatechin gallate in human A431 epidermoid carcinoma cells. **J. Cell. Biochem.** v. 67, p. 55-65, 1997..

LIU, L. et al. Cinnamic acid: a natural product with potential use in cancer intervention. **Int. J. Cancer.**, v. 62, n. 3, p. 345-350, 1995.

LOTFI, C. F. P.; MACHADO-SANTELLI, G. M. Comparative analysis of colchicine induced micronuclei in different cell types in vitro. **Mutat. Res.**, v. 5805, p. 1-7, 1995.

LU, Q-Y. et al. Green tea induces annexin-I expression in human lung adenocarcinoma A549 cells: Involvement of annexin-I in actin remodeling. **Lab. Invest.**, v. 87, p. 456–465, 2007.

LU, Q-Y. et al. Effects of green tea extract on lung cancer A549 cells: Proteomic identification of proteins associated with cell migration. **Proteomics**, v. 9, p. 757–767, 2009.

MACHADO-SANTELLI G. M., MORI L., PEREIRA C. A. Prediction of relapse in patients with breast cancer by DNA cytometry. **Anal. Cell. Pathol.**, v. 7, n. 4, p. 321-334, 1994.

MAEDA-YAMAMOTO, M. et al. Effects of tea polyphenol on the invasion and matrix metalloproteinases activities of human fibrosarcoma HT1080 cells. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 2350–2354, 1999.

MAFFEI, F. et al. Biomarkers to assess the genetic damage induced by alcohol abuse in human lymphocytes. **Mutat. Res.**, v. 514, p. 49-58, 2002.

MAJER, B. J. et al. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. **Mutat. Res.**, v. 489, n. 2-3, p. 147-172, 2001.

MANELLI-OLIVEIRA, R.; MACHADO-SANTELLI, G. M. Cytoskeletal and nuclear alterations in human lung tumor cells: a confocal microscope study. **Histochem. Cell Biol.**, v. 115, p. 403-411, 2001.

MANFREDI, J. J.; HORWITZ, S. B. Taxol: an antimetabolic agent with a new mechanism of action. **Pharmacol Ther.**, v. 25, p. 83-125, 1984.

MARROT, L.; MEUNIER, J-R. Skin DNA photodamage and its biological consequences. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 58, p. S139-S148, 2008.

MARTIN, S. J. et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. **J. Exp. Med.**, v. 182, p. 1545–1556, 1995.

MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY, H. N: Molecular mechanisms of photocarcinogenesis. **Front. Biosci.**, v. 7, p. d765–d783, 2002.

MAYER, T. U. et al. Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in phenotype-based screen. **Science**, v. 286, p. 971-974, 1999.

MCCONNELL, O. J.; LONGLEY, R. E.; KOEHN, F. E. The discovery of marine natural products with therapeutic potential. **Biotechnology**, v. 26, p. 109-173, 1994.

MESNIL, M.; KRUTOVSKIKH, V.; PICCOLI, C. Negative growth control of HeLa cells by connexin genes: connexin species specificity. **Cancer Res.**, v. 55, p. 629-639, 1995.

MILDE-LANGOSCH, K. et al. Role of Fra-2 in breast cancer: influence on tumor cell invasion and motility. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 107, p. 337-347, 2008.

MILLER, V. EGFR mutations and EGFR tyrosine kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. **Semin. Oncol. Nurs.**, v. 24, n. 1, p. 27-33, 2008.

MILLS, J. C.; STONE, N. L.; PITTMAN, R. N. Extranuclear apoptosis: the role of the cytoplasm in the execution phase. **J. Cell Biol.**, v. 146, p. 703-6, 1999.

MOTOKURA, T. et al. A novel cyclin encoded by a bcl-1-linked candidate oncogene. **Nature**, v. 350, p. 512-515, 1991.

MUKHERJEE, S. et al. Sequential loss of cell cycle checkpoint control contributes to malignant transformation of murine embryonic fibroblasts induced by 20-methylcholanthrene. **J. Cell Physiol.**, 2010. In press.

MUKHOPADHYAY, T. et al. Reduced telomeric signals and increased telomeric associations in human lung cancer cell lines undergoing p53-mediated apoptosis. **Oncogene**, v. 17, n. 7, p. 901-906, 1998.

MURAMATSU, A. et al. Influence of transfection with connexin 26 gene on malignant potencial of human hepatoma cells. **Carcinogenesis**, v. 23, p. 351-358, 2002.

NAGAOKA, T. et al. Selective antiproliferative activity of caffeic acid phenethyl ester analogues on highly liver-metastatic murine colon 26-L5 carcinoma cell line. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 10, p. 3351-3359, 2002.

NAKAGAWA, E. K. **Estudo do significado biológico da multinucleação induzida por vincristina em células em cultura**. 165 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

NAKAJIMA, Y. et al. Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. **BMC Complement Altern. Med.**, v. 9, n. 4, 2009.

NAKAYAMA, T. et al. Inhibitory effects of caffeic acid ethyl ester on H₂O₂-induced cytotoxicity and DNA single-strand breaks in Chinese hamster V79 cell. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v. 60, n. 2, p. 316-318, 1996.

NEVES, F. M. **Efeitos de compostos benzênicos sobre o crescimento apical e a morfologia de *Neurospora crassa***. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências

Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.

NG, L-T.; WU, S-J. Antiproliferative activity of *Cinnamomum cassia* constituents and effects of pifithrin-alpha on their apoptotic signaling pathways in Hep G2 cells. **Evid Based Complement Alternat. Med.**, 2009. In press.

NIERO, E. L. O. **Ação do ácido cinâmico sobre células tumorais humanas em cultura.** 94 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

NUSSE, M. et al. Analysis of the DNA content distribution of micronuclei using flow sorting and fluorescent in situ hybridization with a centromeric DNA probe. **Mutagenesis**, v. 11, n. 4, p. 405-413, 1996.

OKABE, T. et al. Differential constitutive activation of the Epidermal Growth Factor Receptor in non-small cell lung cancer cells bearing EGFR gene mutation and amplification. **Cancer Res.**, v. 67, n. 5, p. 2046-2053, 2007.

OPDYKE, D. L. J. Monographs on fragrance raw materials. **Food Cosmet. Toxicol.**, v. 13, p. 683-923, 1975.

PANWAR, M. et al. Evaluation of chemopreventive action and antimutagenic effect of the standardized Panax Ginseng Extract, EFLA400, in Swiss Albino Mice. **Phytother. Res.**, v. 19, p. 65-71, 2005.

PARK, C. C.; BISSELL, M. J.; BARCELLOS-HOFF, M. H. The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. **Mol. Med. Today.**, v. 6, p. 324-329, 2000.

PETITJEAN, A. et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. **Hum. Mutat.**, v. 28, n. 6, p. 622-629, 2007.

PLACZEK, M. et al. Ultraviolet B-induced DNA damage in human epidermis is modified by the antioxidants ascorbic acid and D-alpha-tocopherol. **J. Invest. Dermatol.**, v. 124, p. 304-307, 2005.

POLLARD, T. D.; COOPER, J. A. Actin, a central player in cell shape and movement. **Science**, v. 326, n. 1208, 2009.

PRASAD, K. N. et al. Modification of the expression of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-induced differentiated functions in neuroblastoma cells by beta-carotene and D-alpha-tocopheryl succinate. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 13, p. 298-303, 1994.

RAJ, A. S. et al. Caffeic acid as an inhibitor of DMBA-induced chromosomal breakage in mice assessed by bone-marrow micronucleus test. **Mutat. Res.**, v. 124, n. 3-4, p. 247-253, 1983.

RAMANAN, P. N.; RAO, M. N. Antimicrobial activity of cinnamic acid derivatives. **Ind. J. Exp. Biol.**, v. 25, p. 42-43, 1987.

RANDERSON-MOOR, J. A. et al. A germline deletion of p14(ARF) but not CDKN2A in a melanoma-neural system tumour syndrome family. **Hum. Mol. Genet.**, v. 10, n. 1, p. 55-62, 2001.

RAVINDRAN, J.; PRASAD, S.; AGGARWAL, B. B. Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively? **AAPS J.**, v. 11, n. 3, p. 495-510, 2009.

RICE-EVANS, C. et al. Bioavailability of flavonoids and potential bioactive forms in vivo. **Drug Metabol. Drug Interact.**, v. 17, p. 1-4, 2000.

RIDLEY, A. J. Rho GTPases and cell migration. **J. Cell Sci.**, v. 114, p. 2713-2722, 2001.

RINEHART, K. L. et al. Didemnins: antiviral and antitumor depsipeptides from a Caribbean tunicate. **Science**, v. 212, p. 934-935, 1981.

RINGEL, I.; HORWITZ, S. B. Studies with RP 569 (Taxotere): a semisynthetic analogue of Taxol. **Nat. Cancer Inst.**, v. 83, p. 288-291, 1991.

RIZOS, H. et al. Mutations in the INK4a/ARF melanoma susceptibility locus functionally impair p14ARF. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 44, p. 41424-41434, 2001.

RODRIGUEZ, O. C. et al. Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. **Nat. Cell Biol.**, v. 5, n. 7, p. 599-609, 2003.

ROSAI, J. **Rosai and Ackerman's Surgical Pathology**. 9^a ed. Edinburgh, Mosby, p. 166-167, 2004.

ROSENBERG, C. L. et al. prd1, a candidate bcl-1 oncogene mapping and expression in centrocytic lymphoma. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**. v. 88, p. 9638-9642, 1991.

ROSENBLUM, M. D.; SHIVERS, R. R. 'Rings' of F-actin form around the nucleus in cultured human MCF7 adenocarcinoma cells upon exposure to both taxol and taxotere. **Comp. Biochem. Physiol. C.**, v. 125, p. 121-131, 2000.

ROSIN, M. P. The use of micronucleus test on exfoliated cells to identify anti-clastogenic action in humans: a biological marker for the efficacy of chemopreventive agents. **Mutat. Res.**, v. 267, p. 265-276, 1992.

RUDNER, A. D.; MURRAY, A. W. The spindle assembly checkpoint. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 8, p. 773-780, 1996.

SABLINA, A. A. et al. Activation of p53-mediated cell cycle checkpoint in response to micronuclei formation. **J. Cell Sci.**, v. 111, n. 7, p. 977-984, 1998.

SAHAI, E.; MARSHALL, C. J. RHO-GTPases and cancer. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 2, p.133-142, 2002.

SAIJA, A. et al. In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. **Int. J. Pharm.**, v. 199, p. 39-47, 2000.

SAKOWICZ, R. et al. A marine natural product inhibitor of kinesin motors. **Science**, v. 280, n. 5361, p. 292-295, 1998.

SALMON, E. D.; MCKEEL, M.; HAYS, T. Rapid rate of tubulin dissociation from microtubules em the mitotic spindle *in vivo* measured by blocking polymerization with colchicines. **J. Cell Biol.**, v. 99, p. 1066-1075, 1984.

SANZ-MORENO, V. et al. Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. **Cell**, v. 135, p. 510-523, 2008.

SCHOCH, G. A. et al. Engineering of a water-soluble plant cytochrome P450, CYP73A1, and NMR-based orientation of natural and alternate substrates in the active site. **Plant Physiol.**, 133, n. 3, p. 1198-1208, 2003.

SCHRÖDER, C. et al. The transcription factor Fra-2 promotes mammary tumour progression by changing the adhesive properties of breast cancer cells. **Eur. J. Cancer.**, 2010. In press.

SEKULIC, A. et al. Malignant melanoma in the 21st Century: the emerging molecular landscape. **Mayo Clin. Proc.**, v. 83, n. 7, p. 825-846, 2008.

SHE, Q. B.; CHEN, N. Y.; DONG, Z. ERKs and p38 kinase phosphorylate p53 protein at serine 15 in response to UV radiation. **J. Biol. Chem.**, vol. 275, p. 20444-20449, 2000.

SHIMIZU, N. et al. Loss of amplified *cmyc* genes in the spontaneously differentiated HL-60 cells. **Cancer Res.**, v. 54, n. 13, p. 3561-3567, 1994.

SHIMIZU, N.; ITOH, N.; UTIYAMA, H.; WAHL, G. M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. **J. Cell Biol.**, v. 140, n.6, p. 1307-1320, 1998.

SHIMIZU, N.; SHIMURA, T.; TANAKA, T. Selective elimination of acentric double minuts from cancer cells through the extrusion of micronuclei. **Mutat. Res.**, v. 448, p. 81-90, 2000.

SHIRAISHI, T. et al. Specific inhibitors of tyrosine-specific protein kinases: properties of 4-hydroxycinnamide derivatives *in vitro*. **Cancer Res.**, v. 49, p. 2374-2378, 1989.

SIDDARAJU, M. N.; DHARMESH, S. M. Inhibition of gastric H⁺K⁺-ATPase and Helicobacter pylori growth by phenolic antioxidants of *Zingiber officinale*. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 5, p. 324-332, 2007.

SINGH, D. K.; LIPPMAN, S. M. Cancer chemoprevention. Part 1: retinoids and carotenoids and other classic antioxidants. **Oncology**, v. 12, p. 1643-1659, 1998a.

SINGH, D. K.; LIPPMAN, S. M. Cancer chemoprevention. Part 2: hormones, nonclassic antioxidant natural agents, NSAIDs, and other agents. **Oncology**, v. 12, p. 1787-800, 1998b.

SJE, Q. B. et al. Resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis is mediated by extracellular-signal-regulated protein kinase and p38 kinase. **Cancer Res.**, v. 61, p. 1604-1610, 2001.

SMALL, J. V. et al. The lamellipodium: where motility begins. **Trends Cell Biol.**, v. 12, p. 112-120, 2002.

SMALL, J. V.; KAVERINA, I. Microtubules meet substrate adhesions to arrange cell polarity. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 15, n. 1, p. 40-47, 2003.

SMIT, N. P. M. et al. Melanin offers protection against induction of cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts by UVB in cultured human melanocytes. **Photochem Photobiol.**, v. 74, p. 424-430, 2001.

SOENGAS, M. S.; LOWE, S. W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. **Oncogene**, v. 22, n. 20, p. 3138-3151, 2003.

SOHL, G.; WILLECKE, K. Gap junctions and the connexin protein family. **Cardiovasc. Res.**, v. 62, n. 2, p. 228-232, 2004.

SOLEAS, G. J. et al. Do wine polyphenols modulate p53 gene expression in human cancer cell lines? **Clin. Biochem.**, v. 34, p. 415-420, 2001.

TAIT, J. F. Imaging of apoptosis. **J. Nucl. Med.**, v. 49, n. 10, p. 1573-1576, 2008.

TANAKA, M.; GROSSMAN, H. B. Connexin 26 induces growth suppression, apoptosis and increased efficacy of doxorubicin in prostate cancer cells. **Oncol. Rep.**, v. 11, n. 2, p. 537-541, 2004.

TAWATA, S. et al. Synthesis and antifungal activity of cinnamic acid esters. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 60, p. 909-910, 1996.

THAYYULLATHIL, F. et al. Rapid reactive oxygen species (ROS) generation induced by curcumin leads to caspase-dependent and -independent apoptosis in L929 cells. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 45, p. 1403-1412, 2008.

THIMANN, K. V. The Auxins. IN: WILKINS, M. B. Physiology of plant growth and development. **McGraw-Hill**, London, p. 2-45, 1969.

TOLBERT, P. E.; SHY, C. M.; ALLEN, J. W. Micronuclei and others nuclear anomalies in buccal smears: methods development. **Mutat. Res.**, v. 271, p. 69-77, 1992.

TROSKO, J. E.; RUCH, R. J. Cell-cell communication in carcinogenesis. **Front. Biosci.**, v. 15, n. 3, p. 208-236, 1998.

UTANI, K.; KAWAMOTO, J.; SHIMIZU, N. Micronuclei bearing acentric extrachromosomal chromatin are transcriptionally competent and may perturb the cancer cell phenotype. **Mol. Cancer Res.**, v. 5, n. 7, p. 695-704, 2007

VANDERKERKEN, K. et al. The mouse bone marrow micronucleus assay can be used to distinguish aneugens from clastogens. **Mutagenesis**, v. 4, p. 6-11, 1989.

VARELLA-GARCIA, M. Stratification of non-small-cell lung cancer patients for therapy with epidermal growth factor receptor inhibitors: The EGFR fluorescence in situ hybridization assay. **Diagn. Pathol.**, v.1, p. 19, 2006

VAZ-DE-LIMA, B. B.; IONTA, M.; MACHADO-SANTELLI, G. M. Changes in cell morphology affect the quantification of intercellular communication. **Micron**, v. 39, p. 631-634, 2008.

VEIERØD, M. B. et al. Sun and solarium exposure and melanoma risk: effects of age, pigmentary characteristics, and nevi. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 19, n. 1, p. 111-120, 2010.

VIAGGI, S.; BOANTTI, S.; ABBONDANDOLO, A. New evidence for the presence of chromosomes in micronuclei of human and Chinese hamster cells. **Mutagenesis**, v. 2, n. 5, p. 367-370, 1987.

VILLA, P. G. et al. Calpain inhibitors, but not caspase inhibitors, prevent actin proteolysis and DNA fragmentation during apoptosis. **J. Cell Sci.**, v. 111, p. 713-722, 1998.

VON HOFF, D. D., et al. Hydroxyurea accelerates loss of extrachromosomally amplified genes from tumor cells. **Cancer Res.**, v. 51, n. 23, p. 6273-6279, 1991.

WADE, R. H. On and around microtubules: an overview. **Mol. Biotechnol.**, v. 43, p. 177-191, 2009.

WANG, T. H. et al. Microtubule-interfering agents activate c-Jun N-terminal Kinase/stress-activated protein kinase through both Ras and apoptosis signal-regulating kinase pathways. **J. Cell Biol.**, v. 273, n. 9, p. 4928-4936, 1998.

WATSON, J. L. et al. Curcumin induces apoptosis in HCT-116 human colon cancer cells in a p21-independent manner. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 84, n. 3, p. 230-233, 2008.

WATTENBERG, L. W.; COCCIA, J. B.; LAM, L. K. T. Inhibitory effects of phenolic compounds on benzo(a)pyrene-induced neoplasia. **Cancer Res.**, v. 40, p. 2820-2823, 1980.

WEINERT, T. DNA damage and checkpoint pathways molecular anatomy and interactions with repair. **Cell**, v. 94, p. 555-558, 1998.

WEISENBERG, R. C.; BORISY, G. G.; TAYLOR, E. W. The colchicines-binding protein of mammalian brain and its relation to microtubules. **Biochemistry**, v. 7, n. 12, p. 4466-4479, 1968.

WELSH, D. R. et al. U-77,863: a novel cinnamide isolated from *Streptomyces griseoluteus* that inhibits cancer invasion and metastasis. **Clin. Exp. Metastasis.**, v. 11, n. 2, p. 201-212, 1993.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, p. 3-19, 2003.

WINK, M. Plant secondary metabolism: diversity, function and its evolution. **Natural Products Comm.**, v. 3, p. 1205-1216, 2008.

WOLF, K. et al. Compensation mechanism in tumor cell migration: Mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. **J. Cell Biol.**, v. 160, p. 267-277, 2003.

WYCKOFF, J. B. et al. ROCK- and myosin-dependent matrix deformation enables protease-independent tumor-cell invasion in vivo. **Curr. Biol.**, v. 16, p. 1515-1523, 2006.

XIAO, L.; MATSUBAYASHI, K.; MIWA, N. Inhibitory effect of the water-soluble polymer-wrapped derivative of fullerene on UVA-induced melanogenesis via downregulation of tyrosinase expression in human melanocytes and skin tissues. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 299, p. 245-257, 2007.

YAMAKAGE, K. et al. Growth control of 3T3 fibroblast cell lines established from connexin 43-deficient mice. **Mol Carcinog.**, v. 23, p. 121-128, 1998.

YUNIS, J. J.; SORENG, A. L.; BOWE, A. E. Fragile sites are targets of diverse mutagens and carcinogens. **Oncogene**, v. 1, p. 59-69, 1987.

ZHANG, Q. et al. Differences in apoptosis and cell cycle distribution between Human Melanoma cell lines UACC903 and UACC903(+6), before and after UV irradiation. **Int. J. Biol. Sci.**, vol. 3, n. 6, p. 342-348, 2007.

ZHU, J. et al. Better survival with EGFR exon 19 than exon 21 mutations in gefitinib-treated in non-small-cell lung cancer patients is due to differential inhibition of downstream signals. **Cancer Lett.**, v. 265, n. 2, p. 307-317, 2008.

ZI, X. L. et al. A flavonoid antioxidant, silymarin, inhibits activation of erbB1 signaling and induces cyclin-dependent kinase inhibitors, G1 arrest, and anticarcinogenic effects in human prostate carcinoma DU145 cells. **Cancer Res.**, v. 58, n. 9, p. 1920-1929, 1998.