

PAOLA VENDRAMINI FERREIRA ROSA

CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA TUMORIGÊNESE CUTÂNEA INDUZIDA QUIMICAMENTE EM CAMUNDONGOS SELVAGENS E DEFICIENTES PARA COMPONENTES DA RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador(a): Dra. Jacqueline de Fátima Jacysyn

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2013

RESUMO

Vendramini PFR. Caracterização da resposta inflamatória na tumorigênese cutânea induzida quimicamente em camundongos selvagens e deficientes para componentes da resposta imune adaptativa. [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

No Brasil, o câncer de pele não-melanoma é o mais frequente e corresponde a 25% de todos os tumores malignos registrados no país. O câncer representa desequilíbrio na homeostase do organismo e os mecanismos de defesa para controlar as células tumorais envolvem respostas do sistema imune inato e adaptativo, sendo que a primeira reação do organismo é a inflamação. Os eventos que impedem ou inibem o surgimento de células tumorais compreendem desde a resposta primária mediada por células e fatores solúveis até a produção de células citotóxicas e anticorpos. Utilizando um modelo de tumorigênese na pele de camundongos induzida quimicamente, o objetivo deste estudo foi caracterizar a resposta inflamatória em linhagens de camundongos C57BL/6, CD4KO, CD8KO, RAG e NUDE. Para isso utilizamos camundongos dos grupos: C57BL/6, CD4KO, CD8KO, RAG e NUDE, que foram tratados com o carcinógeno DMBA e o agente de promoção tumoral TPA. Os animais foram acompanhados e avaliados por 100 dias, após este período a pele tratada foi retirada e processada para análise de secreção de citocinas pró- e anti-inflamatórias, migração celular e enzima mieloperoxidase (MPO). Não houve diferenças na multiplicidade e incidência de tumores entre os grupos de camundongos avaliados. No entanto, as citocinas pró e anti-inflamatórias foram maiores nos animais CD4KO quando comparados aos outros grupos de animais. A MPO mostrou-se aumentada nos animais CD4KO quando comparados aos outros grupos de animais. Após análise dos resultados com o protocolo de 100 dias, selecionamos as linhagens C57BL/6 WT, CD4KO e NUDE que foram avaliadas 48 horas após tratamento com DMBA. Os animais da linhagem CD4KO apresentaram maior número de neutrófilos e citocinas pró-inflamatórias quando comparados aos grupos C57BL/6 WT e NUDE, enquanto que as citocinas anti-inflamatórias não mostraram diferenças nos 3 grupos tratados. Na análise por citometria de fluxo os linfócitos TCD8 foram vistos em maior porcentagem no linfonodo inguinal dos animais CD4KO quando comparados aos animais WT. Estes resultados sugerem que os linfócitos TCD4 participam do controle da inflamação induzida pelo tratamento com DMBA e TPA, a qual persiste durante o protocolo de tumorigênese nos animais C57BL/6 CD4KO.

Palavras-chave: Pele. Câncer. Camundongos. DMBA/TPA. Citocinas. Resposta inflamatória.

ABSTRACT

Vendramini PFR. Characterization of the inflammatory response in chemically induced skin tumorigenesis in wild mice and deficient for components of the adaptive immune response. [Masters thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

In Brazil non-melanoma skin cancer is the most common cancer and accounts for 25% of all malignant tumors reported in the country. Cancer represents imbalance in homeostasis and defense mechanisms to control the tumor cells involving the innate and adaptive immune responses, and the first reaction of the body is inflammation. The events that prevent or inhibit the appearance of tumor cells from primary response comprises cell-mediated and humoral factors to the production of cytotoxic cells and antibodies. Using a model of skin tumorigenesis chemically-induced in mice, the aim of this study was to characterize the inflammatory response in the following strains: C57BL/6 WT, CD4KO, CD8KO, RAG and NUDE mice. For this purpose, we treated the aforementioned strains with the carcinogen DMBA as well as with TPA tumor promoting agent. The animals were followed for 100 days before being subjected to evaluation. The treated skin of these mice was removed and processed for analysis of pro- and anti-inflammatory signals, cell migration and enzyme myeloperoxidase (MPO). We found no differences in tumor incidence and multiplicity between the groups of mice evaluated. However, the pro- and anti-inflammatory cytokines in CD4KO mice were higher than the other groups of animals. The MPO was increased in CD4KO animals when compared to other groups of mice. After analyzing the results of our 100 days protocol, we selected the C57BL/6 WT, CD4KO and NUDE strains that were assessed 48 hours after treatment with DMBA. The CD4KO mice showed higher numbers of neutrophils and pro-inflammatory cytokine than the C57BL/6 WT and NUDE mice, while anti-inflammatory cytokines showed no differences in the three treated groups. The analysis by flow cytometry showed an increase of CD8⁺ T lymphocytes in inguinal lymph node of CD4KO compared to the WT animals. These results suggest that CD4⁺ T lymphocytes participate in the control of inflammation induced by treatment with DMBA and TPA. This DMBA and TPA-dependent inflammation persists throughout the tumorigenesis protocol in C57BL/6 CD4KO mice.

Keywords: Skin. Cancer. Mice. DMBA/TPA. Cytokines. Inflammatory response.

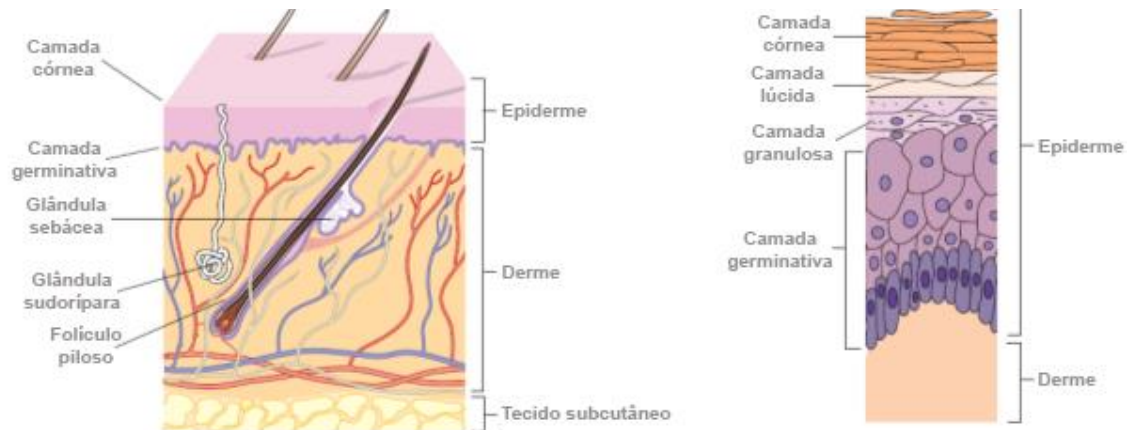
1 INTRODUÇÃO

1.1 Tumorigênese de Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano e engloba aproximadamente 16% do peso corporal de um adulto, tem funções como proteção, termorregulação, percepção sensorial e síntese de vitamina D. Ela é dividida em duas camadas principais: a epiderme, de origem ectodérmica e a derme, de origem mesodérmica (McLafferty et al., 2012).

A epiderme é composta por quatro tipos principais de células, os queratinócitos que são cerca de 90% das células totais dessa região, os melanócitos, células produtoras de melaninas, as células de Langerhans, envolvidas na resposta imune e, por fim, as células de Merkel, responsáveis pela sensação de tato. A epiderme é dividida em cinco camadas: a camada germinativa ou basal, a camada espinhosa, a granulosa, a lúcida e a camada córnea. A camada basal, a mais profunda, é composta por queratinócitos, melanócitos e células de Merkel. A camada espinhosa, formada por células desde poliédricas a pavimentosas, possui também as células de Langerhans, ou células dendríticas do sistema imune especializadas. A camada granulosa é composta por 3 a 5 camadas de queratinócitos que assumem a forma pavimentosa e apresentam grânulos citoplasmáticos basófilos. A camada lúcida está localizada em áreas onde a pele é espessa, como palmas das mãos e solas dos pés, situa-se entre a camada granulosa e a camada córnea e fornece algum grau de impermeabilização para a pele. E por fim, a camada córnea, a mais superficial, a qual contém queratina que ajuda a proteger a pele de fatores externos como o calor e agentes químicos (McLafferty et al., 2012; Proksch et al., 2008). A **Figura 1** ilustra as principais camadas de epiderme e estruturas da derme.

Figura 1 – Principais camadas da epiderme e estruturas da derme.



Adaptada de (McLafferty et al., 2012).

A outra camada da pele conhecida como derme, composta por tecido conjuntivo, é responsável por fornecer nutrientes e sustentação para epiderme, nessa camada está localizado os vasos linfáticos, as terminações nervosas, os folículos pilosos e as glândulas sudoríparas. A derme é composta de duas camadas: a reticular e a papilar. A camada reticular contém os nervos e os vasos capilares que alimentam a epiderme. A camada papilar é composta de tecido conjuntivo que possui colágeno e fibras elásticas, os quais conferem a derme capacidade de esticar e contrair (McLafferty et al., 2012; Proksch et al., 2008).

A pele exerce a função de barreira física, sendo um dos componentes da imunidade inata mais evidente contra invasão de patógenos estranhos ao organismo, agressões físicas e químicas, controle no balanço de sais e água (Proksch et al., 2008). Alguns fatores físicos e químicos como radiação ultravioleta (UV), radiação ionizante, hidrocarbonetos policíclicos e arsênio podem gerar danos no DNA, como por exemplo, no gene p53, das células epiteliais e levar ao desenvolvimento tumoral, o que compromete a homeostase e funções da pele (Campbell et al., 1993; McGuire et al., 2009). O câncer de pele não melanoma é a forma mais comum de malignidade em humanos e representa cerca de 95% de todos as neoplasias cutâneas (Rubin et al., 2005). Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) revelam que as formas mais comuns de câncer de pele não melanoma no Brasil incluem o carcinoma basocelular (BCC), abrange 70% dos

casos, e o carcinoma de células escamosas (SCC), cerca de 25% dos casos relatados. Outras formas como dermatofibrosarcoma protuberante, carcinoma celular de Merckel e neoplasias adnexais são encontrados com menor frequência.

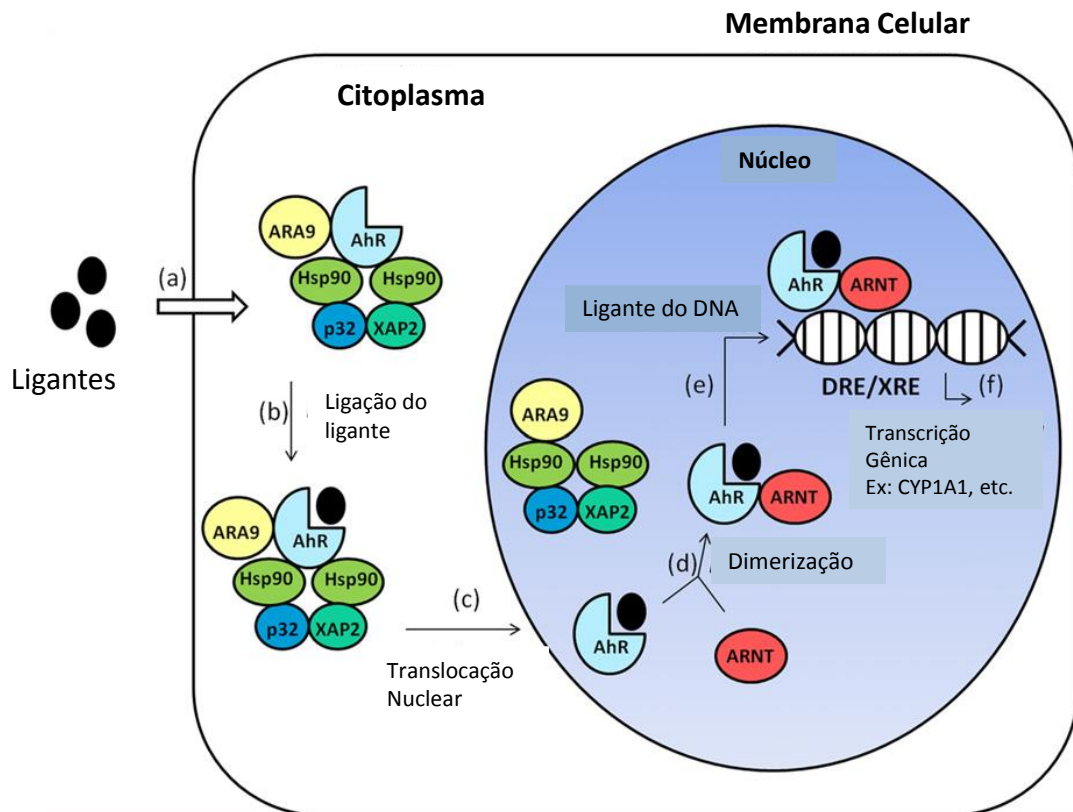
O carcinoma basocelular se caracteriza por ser a neoplasia dos queratinócitos que residem na camada basal da epiderme (Youseff et al., 2010). Radiação UV, hidrocarbonetos poliaromáticos, pigmentação da pele, e síndromes genéticas, como por exemplo, o xeroderma pigmentoso são fatores que predispoem o desenvolvimento do BCC que pode ser classificado em quatro tipos principais: nodular, superficial, pigmentar e morfofórmico. As lesões desse câncer de pele são caracterizadas por uma úlcera central com bordas bem definidas, muitas vezes com vasos sanguíneos visíveis na lesão ou borda adjacente a ela, com raros casos de metástases relatados. Uma característica comum aos casos de BCC é o aumento da via de sinalização intracelular Hedgehog (Hh), essa via é responsável por regular o crescimento celular e diferenciação durante a embriogênese, além de ser crucial no desenvolvimento das células humanas onde se encontram os folículos pilares (Dubas, Ingraffea 2013; McGuire et al., 2009; Paladini et al., 2005; Von Domarus, Stevens, 1984).

O segundo tipo de câncer de pele não melanoma comum, e também mais agressivo quando comparado ao BCC, é o carcinoma celular escamoso (McGuire et al., 2009). Esse câncer em grande parte ocorre devido à radiação UV responsável por causar dano no DNA e inativar o gene p53. Esse gene que codifica a proteína p53, conhecida como guardião do genoma, tem a função de parar o ciclo celular no sítio de dano do DNA e levar a apoptose da célula caso o dano seja irreparável. Assim, a mutação ou inativação da p53 permite a negligência do reparo levando ao dano do DNA e resistência a apoptose o que, nesse caso, caracteriza o desenvolvimento tumoral (Campbell et al., 1993; Jiang et al., 1999). O SCC tem por característica as pápulas ou papilomas em forma de verrugas, o que pode o levar a ser confundido com verrugas normais. Outros fatores, como o papiloma vírus (HPV) e carcinogênese química, também podem levar ao desenvolvimento do SCC (Dubas, Ingraffea, 2013; Liu, Colegio, 2013).

A carcinogênese química na pele é um tipo de câncer não melanoma e o seu desenvolvimento, descrito em modelos murinos, é um processo que envolve os

estágios conhecidos como iniciação, promoção e progressão do tumor. O processo de iniciação do tumor consiste no tratamento dos camundongos com doses de xenobióticos, compostos químicos estranhos a um organismo, como o hidrocarboneto poliaromático dimetilbenzenoantraceno (DMBA) (DiGiovanni, 1992). Esse agente químico é responsável por mutações no gene *HRas*, resultando na indução da carcinogênese, além de ser passível de causar mutações em outros dois genes, *KRas* ou *NRas*, que podem cooperar, simultaneamente, com o mutante *HRas* para promover o desenvolvimento das mutações (To et al., 2013). O DMBA não é um composto ativo e precisa ser metabolizado e convertido em diól epóxido, sua conformação ativa. Para isso, esse composto com capacidade cancerígena precisa se ligar ao receptor Hidrocarboneto de arila (AhR), levando-o a mudança conformacional e expondo sua sequência nuclear. Esse receptor é normalmente encontrado no citoplasma e auxiliado por proteínas chaperonas como Hsp90 (do inglês *heat shock protein*), proteína p23, XAP-2 (do inglês *X-associated protein 2*) e ARA-9 (do inglês *AhR associated protein 9*), as quais ajudam a manter a estrutura conformacional do AhR enquanto ainda não há o ligante, evitando sua translocação para o núcleo. Uma vez que o ligante, nesse caso o DMBA, se liga ao AhR há a migração desse complexo AhR-chaperonas-DMBA para o núcleo. Assim que esse complexo atravessa a membrana nuclear a proteína translocadora do AhR (ARNT) dissocia as proteínas chaperonas do AhR, e o heterodímero AhR-ARNT se liga a regiões específicas do DNA conhecidas como elemento de resposta a xenobióticos (XREs). Estas regiões estão localizadas na região promotora de genes alvos que vão levar a transcrição de enzimas do citocromo P450, como Cyp1a1 e Cyp1b1, os quais são responsáveis por causar a biotransformação (Denison, Nagy, 2003; Hao, Whitelaw, 2013; Yusuf et al., 2007). A **Figura 2** ilustra a via de sinalização do receptor AhR, conforme descrito anteriormente.

Figura 2 - Via de sinalização do receptor AhR.



(a) O ligante passa através da membrana plasmática para o citoplasma celular. (b) O ligante se liga ao complexo AhR no citoplasma. (c) O complexo AhR mais ligante é translocado para dentro do núcleo. (d) O ligante juntamente com o AhR se dissocia do complexo de proteínas chaperonas e se dimeriza com ARNT. (e) O complexo AhR- ligante -ARNT se liga a regiões específicas DRE/XRE o que leva a transcrição de genes alvos. Adaptada de (Busbee et al., 2013)

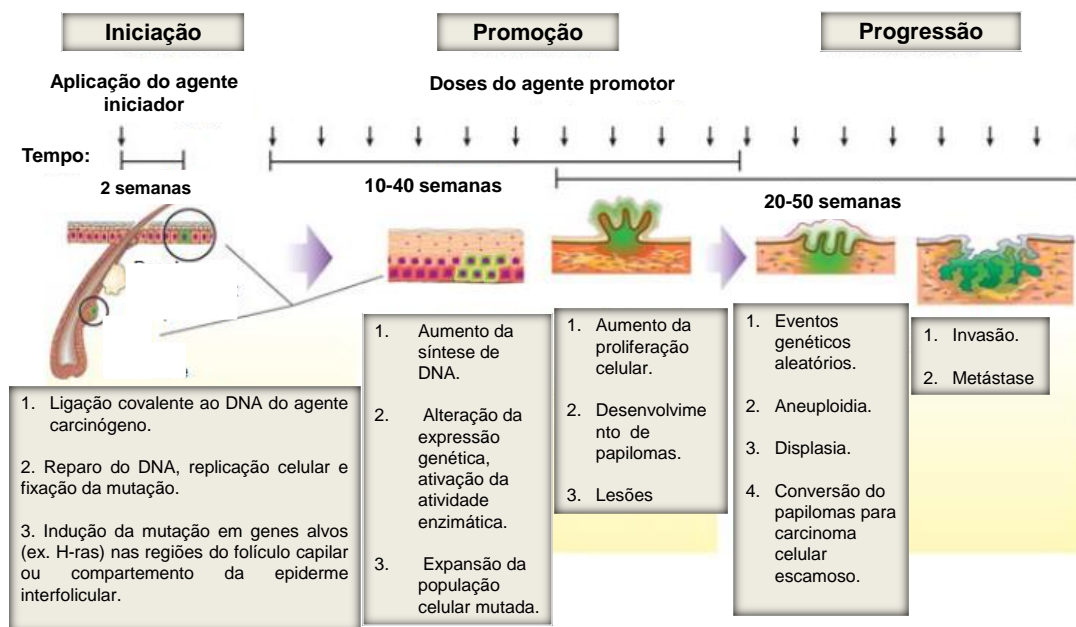
Outro fator importante no processo de iniciação da tumorigênese é a atividade da enzima hidrocarboneto hidroxilase, a qual é responsável por metabolizar os hidrocarbonetos poli aromáticos (PAHs). Estudos em camundongos mostraram que a atividade dessa enzima é controlada por 2 alelos no locus do receptor AhR. Animais que são homozigotos para o alelo b, como os camundongos AIRmin e C57BL/6, metabolizam PAHs com eficiência, o que facilita o desenvolvimento da tumorigênese cutânea. Já os animais homozigotos para o alelo d, como camundongos DBA/2 e AIRmax, possuem baixa afinidade de ligação entre o receptor AhR e o hidrocarboneto poliaromático, por isso podem ser resistentes ao desenvolvimento da tumorigênese cutânea quando comparados aos animais que

possuem o alelo b (De Souza et al., 2009; Poland et al., 1994; Thomas et al., 2002; Yusuf et al., 2007).

O processo de iniciação do tumor é um evento irreversível e nesse estágio ainda não há o aparecimento de tumores visíveis, o aparecimento de papilomas pode ser auxiliado pela aplicação de doses repetidas do TPA, agente promotor (DiGiovanni, 1992). Desse modo no estágio seguinte, conhecido por promoção e progressão, os camundongos são tratados continuamente com Tetradecano forbolacetato (TPA), o qual é responsável pela expansão clonal das células mutadas gerando então a multiplicação do número de papilomas (Kemp, 2005). O TPA mimetiza o diacilglicerol o qual é responsável por ativar a proteína quinase C, que consequentemente fosforila aminoácidos alvos, como serinas e treoninas. Desse modo o TPA funciona como segundo mensageiro, atuando na transcrição de genes responsáveis pela promoção do tumor (Mueller, 2006; Ohno, Nishizuka, 2002).

A **Figura 3** mostra as fases do desenvolvimento da carcinogênese química, conforme descrito anteriormente.

Figura 3 – Estágios do modelo de carcinogênese cutânea realizada em camundongos.



Adaptada de (Abel et al., 2009).

1.2 Resposta Imune na Tumorigênese de Pele

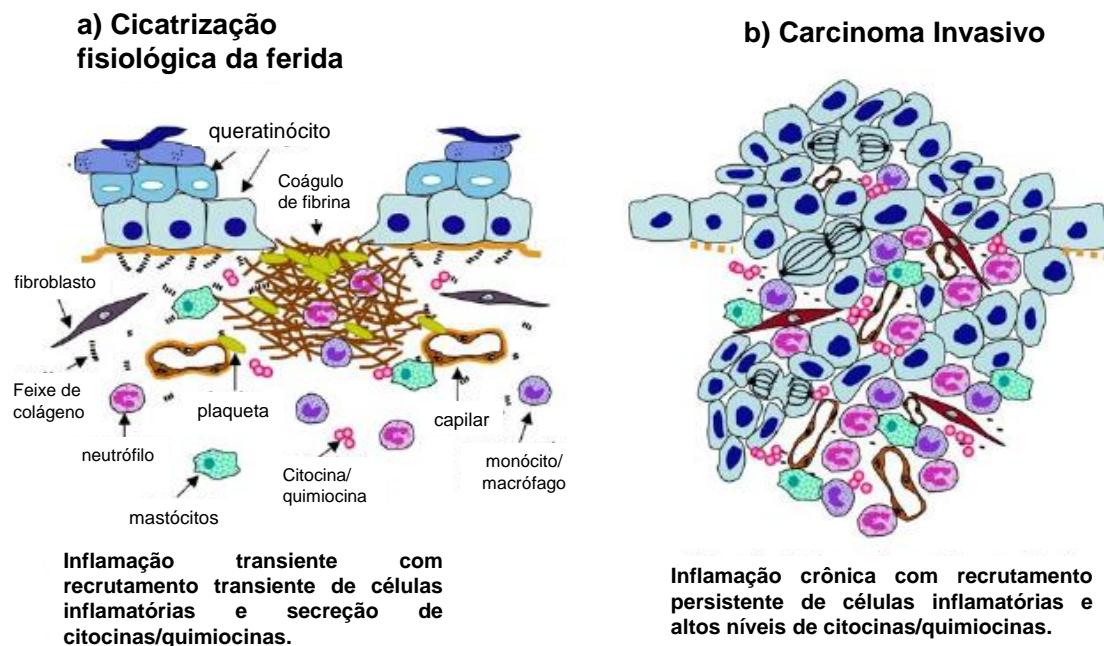
São inúmeros os mecanismos de defesa para controlar as células tumorais, desde uma resposta primária mediada por células e fatores solúveis até a produção de anticorpos e células citotóxicas contra antígenos tumorais. A resposta imune inata e adaptativa interage para manter a homeostase do organismo e, para que isso ocorra, a primeira reação do organismo frente a um desequilíbrio é a inflamação.

A resposta inflamatória é um evento fisiológico do organismo às agressões de agentes lesivos biológicos, químicos ou físicos que ultrapassam a barreira epitelial/endotelial e suas estruturas especializadas. Caracterizada por fenômenos vasculares e celulares nos tecidos comprometidos, tem como função principal recompor o tecido lesado e manter a homeostase. O processo inflamatório envolve a ativação de células da imunidade inata através de seus receptores de superfície e posterior secreção de fatores solúveis, como citocinas, que promovem alterações morfológicas e bioquímicas, entre os quais, três delas se destacam: dilatação dos capilares, vênulas e arteríolas; exsudação de líquidos e proteínas plasmáticas e; migração dos leucócitos, por exemplo, neutrófilos, eosinófilos e basófilos, intravasculares para o foco inflamatório (Videm, Strand, 2004).

Na inflamação, o recrutamento de leucócitos ao local da lesão, ativa o processo de remoção dos restos celulares, elimina agentes agressores impedindo o crescimento de microrganismos patogênicos, iniciando a reparação tecidual. Além de facilitar a locomoção, os fatores quimiotáticos encontrados em grandes concentrações induzem a ativação destes leucócitos, resultando no estabelecimento da homeostase. O mecanismo pelo qual os leucócitos migram através do endotélio penetrando nos tecidos é chamado de quimiotaxia e, a locomoção dessas células é orientada de acordo com o gradiente de concentração formado a partir do foco injuriado pela presença de substâncias endógenas e exógenas (Devreotes, Zigmond, 1988; Videm, Strand, 2004). Das substâncias endógenas que atuam como fatores quimiotáticos são de fundamental importância os componentes do sistema complemento, em particular C5a, os metabólitos do ácido araquidônico originados via lipoxigenase e as citocinas da família das quimiocinas (Miller, Krangel, 1992).

O objetivo da inflamação aguda e crônica é reestabelecer a homeostase, e a diferença entre elas baseia-se no tempo que a resposta imune requer para isto. Desse modo, a inflamação aguda retorna ao equilíbrio e homeostase, ao contrário da inflamação crônica, que também se relaciona com patógenos persistentes de difícil erradicação. A **Figura 4** mostra a inflamação aguda e o processo de inflamação crônica patológico.

Figura 4 – Inflamação Aguda e Crônica



a) Durante a cicatrização da ferida ou lesão tecidual o processo de reparação é imediatamente iniciado pela formação de um coágulo de fibrina contendo matriz extracelular (ECM), proteínas extracelulares e plaquetas. A degranulação de plaquetas fornece a primeira "onda" de fatores de crescimento, como as citocinas e quimiocinas que recrutam células inflamatórias tais como mastócitos e neutrófilos. Monócitos / macrófagos são vistos em maiores quantidades quando o número de neutrófilos está declinando. Em seguida, estas células orquestram a resposta inflamatória do tecido, que é essencial para a indução de angiogênese e a cicatrização da ferida. Após a re-epitelização, a resposta inflamatória do tecido é diminuída, resultando em menores níveis de citocinas inflamatórias e redução no número de células do sistema imune inato na pele. (b) No tecido tumoral a reação inflamatória é "crônica", com recrutamento persistente de diferentes tipos de células inflamatórias para dentro do estroma do tumor, com de citocinas inflamatórias e quimiocinas, A secreção de proteases, de fatores angiogênicos e o infiltrado inflamatório contribui criticamente para aumento da angiogênese, invasão tumoral e metástase. Adaptada de: (Mueller, 2006)

Portanto, a inflamação crônica é aquela mantida por longos períodos de tempo, e pode ocasionar patologias cardiovasculares, neurológicas, pulmonares e neoplásicas (Aggarwal et al., 2006; Balkwill, Coussens, 2004). O câncer relacionado com a inflamação crônica facilita o potencial replicativo ilimitado da célula, independência de fatores de crescimento, resistência à inibição do crescimento celular, escape da morte celular programada, aumento da angiogênese e metástase (Hanahan, Weinberg, 2011). Análise de tumores pré-malignos e crescimento de carcinomas em adultos revelam que há a produção de inúmeros leucócitos e de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β (Balkwill, Mantovani, 2001).

O TNF- α pode induzir o foco de morte celular tumoral, e pode ainda estimular resposta antitumoral, além de estar comumente presente no estado de inflamação crônica e suas associações com o carcinoma (Philip et al., 2004; Smyth et al., 2004). Essa citocina pode influenciar células da derme e epiderme nos estágios iniciais do desenvolvimento tumoral, e a produção persistente de TNF- α , principalmente por queratinócitos, é importante para os estágios iniciais da promoção tumoral feita pela administração do agente promotor TPA, pois ativa fatores de transcrição como NF- κ B o que leva a proliferação ou crescimento clonal das células mutadas inicialmente (Fujiki, Suganuma, 2011; Moore et al., 1999).

A Interleucina-6 (IL-6) é um potente mediador pró-angiogênico presente no micro-ambiente inflamatório da maioria dos tumores sólidos, essa citocina tem um amplo espectro de atividades biológicas dentre elas à regulação da inflamação, proliferação celular, imunomodulação, hematopoiese e tumorigênese (Guo et al., 2012; Jones et al., 2011). IL-6 exerce atividade pró-angiogênica predominantemente através da via de sinalização STAT-3, a qual leva a transcrição de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), e também induz proliferação e migração de células endoteliais (Fan et al., 2008; Holzinger et al., 1993; Niu et al., 2002).

A citocina pró-inflamatória IL-1 β , assim como a citocina TNF- α , é considerada citocina de “alarme”, visto que não é normalmente expressa a não ser quando é sintetizada por macrófagos após o início do processo inflamatório. IL-1 β e TNF- α ativam células estromais e potencializam a migração de leucócitos aumentando a resposta inflamatória (Apte, Voronov, 2002), desse modo em altas doses se torna

agressiva desencadeando aumento da angiogênese, invasão e supressão da resposta imune (Song et al., 2003; Song et al., 2005).

As citocinas IL-6, TNF- α e IL-1 β , descritas acima, e a proteína inflamatória de macrófagos (MIP-1) são capazes de recrutar macrófagos, células importantes da imunidade inata, para o local do sítio inflamatório, quando a quantidade de neutrófilos começa a decrescer (Coussens, Werb, 2002; DiPietro, 1995). Os macrófagos associados ao tumor (TAM) podem polarizar para dois tipos diferentes de células, M1 ou M2. Os macrófagos M1 estão presentes quando há um aumento no perfil de citocinas Th1 como, por exemplo, IFN- γ , ou ainda podem estar presentes quando há componentes microbianos como lipopolissacarídeos (LPS). Esse perfil Th1 tem como papel clássico a defesa contra microorganismos ou células tumorais e produzem eficientemente moléculas efetoras como intermediários de reativos de oxigênio e nitrogênio e citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β (Sica, Mantovani, 2012). Ao contrário dos macrófagos M1 os macrófagos M2 se polarizam na presença de citocinas como IL-4 e IL-13. Essas citocinas inibem a ativação clássica da resposta Th1 e levam a resposta, conhecida como alternativa, para macrófagos M2 (Gordon, Taylor, 2005). Esses macrófagos M2 possuem características como alta produção de IL-10, baixa produção de IL-12 e fraca capacidade de apresentação de antígeno (Noel et al., 2004), além de suprimirem a resposta Th1, participarem na resolução da inflamação, na proteção contra parasitas, promoverem a cicatrização de feridas, angiogênese e reparo tecidual (Biswas, Mantovani, 2010). A maioria dos estudos indica que o perfil dos macrófagos associados ao tumor é o perfil M2.

Os mecanismos que impedem ou inibem o surgimento de células tumorais é constituído de eventos que incluem, desde a resposta primária mediada por células e fatores solúveis até a produção de células citotóxicas e anticorpos, numa interação entre as respostas imune inata e adaptativa. Desse modo, as duas células que têm papel fundamental na resposta imune antitumoral pelo mecanismo de citotoxicidade celular são as células natural killer (NK), pertencente à resposta imune inata, e os linfócitos T citotóxicos (CTLs), que fazem parte da resposta imune adquirida. Ambas as células possuem um progenitor linfóide comum, e durante um quadro de infecção ou na presença de um antígeno tumoral, por exemplo, tornam-se ativadas através

de receptores antígenos-específicos e por citocinas pró-inflamatórias como IL- 12 e IFN- γ (Sun et al., 2010).

Células NK são capazes de matar células-alvo, independentemente de qualquer ativação anterior. Estas características funcionais têm sugerido desde o tempo de sua identificação um papel para as células NK no controle do crescimento tumoral e da metástase *in vivo*. Com a estimulação de citocinas, as células NK se tornam células assassinas que proliferam, produzem citocinas, e regulam positivamente moléculas efetoras, tais como moléculas de adesão, NKp44, perforina, granzimas, ligante de FAS (FASL) e TRAIL. Portanto, isso leva a um aumento da adesão celular e a liberação de grânulos, bem como o aumento da apoptose das células-alvo, que envolve a adesão celular e é mediada pelos membros da família do TNF presente na superfície, que podem ser FASL, TNF- α e TRAIL, os quais interagem com receptores específicos na superfície da célula-alvo (Johnsen et al., 1999; Medvedve et al., 1997; Mirandola et al., 2004; Zamai et al., 1998).

As células NK reconhecem e destroem células infectadas ou neoplásicas, mas em geral não causam dano as células normais. Essa capacidade de reconhecer células danificadas e transformadas de estruturas próprias saudáveis depende da expressão tanto de receptores de inibição (por exemplo, os KIRs) quanto da expressão de receptores de ativação (por exemplo, CD16 e NKG2D). Os receptores de inibição das células NK reconhecem moléculas MHC classe I (responsáveis por ativar os linfócitos TCD8), as quais são geralmente expressas na maioria das células saudáveis do corpo, e não são expressas em células cancerosas. Em geral os receptores de ativação das células NK reconhecem estruturas que estão presentes tanto em células alvos susceptíveis quanto em células normais, mas a influência das vias de inibição domina quando o MHC classe I é reconhecido (Abbas et al., 2008; Karre et al., 1986; Long, 1999).

A segunda classe de células efetoras responsáveis pela resposta anti-tumoral são os linfócitos T citotóxicos. Essas células podem atuar de duas formas, através dos ligantes da superfamília do Fator de Necrose Tumoral (TNF) ou pela secreção de grânulos como granzimas e perforinas, em que esses linfócitos se aproximam da célula alvo e liberam granzimas para o citosol da célula, levando-a a morte por

apoptose. Apesar de serem células principais na defesa contra o tumor estudos tem mostrado que em hospedeiros com tumores, os linfócitos CTLs específicos tumorais não são eficientes. A chave para a teoria de que esses linfócitos CTLs se encontram prejudicados está na ausência dos linfócitos TCD4+ auxiliares. Sem os linfócitos TCD4+ auxiliares os CTLs são insuficientes para dirigir uma resposta efetiva contra o tumor, pois quando esses linfócitos não estão presentes não há produção de anticorpos e nem expansão das células CTLs específicas contra o tumor (Marzo et al., 2000; Mitchison, 1971). Além do que, os linfócitos TCD4+ auxiliares são necessários para geração e manutenção das células T citotóxicas de memória (Bourgeois, Tanchot, 2003).

Como já descrito anteriormente, os tumores sólidos expressam MHC-I, mas não complexo de histocompatibilidade principal II (MHC-II), por isso acredita-se que os linfócitos T citotóxicos sejam as células efetoras principais no combate ao tumor. Entretanto, estudos recentes tem mostrado que células TCD4+ reativas contra o tumor podem desenvolver atividade citotóxica e mediar rejeição tumoral via MHC-classe II restrito ao reconhecimento do antígeno tumoral, sugerindo que as células TCD4+ podem ser efetoras na resposta tumoral (Quezada et al., 2010). O efeito anti-tumoral das células TCD4+ se dá através da atividade das citocinas IFN- γ e TNF- α , essas duas citocinas produzidas pelas células TCD4+ possuem efeito citotóxicos sobre as células tumorais (Corthay et al., 2005; Fransen et al., 1986; Qin, Blankenstein, 2000). O IFN- γ pode regular positivamente moléculas de MHC e aumentar o número de complexos (MHCII -peptídeo) das mesmas, assim como pode alterar a maquinaria de processamento antigênico resultando em maior apresentação de antígenos e maior número de lise celular (Dighe et al., 1994). O TNF- α age juntamente com o IFN- γ causando dormência nas células tumorais prevenindo assim o mecanismo de escape do tumor, assim na ausência dessas duas citocinas pode haver uma maior progressão tumoral e transformação maligna. A ação combinada dessas duas citocinas pode ainda induzir células dendríticas (DCs) a produzirem quimiocinas anti-angiogênicas, como CXCL10 e CXCL9, na tentativa de impedir o crescimento tumoral (Coughlin et al., 1998; Muller-Hermelink et al., 2008).

E por fim, os linfócitos B também têm sido vistos como células efetoras na resposta tumoral. Os linfócitos B são células centrais da imunidade humoral e tem como funções principais a produção de anticorpos, apresentação de antígenos, e secreção de citocinas pró-inflamatórias. No contexto tumoral, essas células têm a capacidade de alterar os níveis de citocinas locais e circulantes e inibirem os linfócitos T influenciando a imunidade antitumoral. Em modelos de camundongos com câncer colorretal a depleção parcial das células B resultou em significativa redução do tumor (Barbera-Guillem et al., 2000). Os linfócitos B são capazes de produzirem citocinas imunossupressoras. Dentre elas foi relatada a produção de IL-10 e TGF- β (fator de crescimento transformador) o que levaria os linfócitos T a um estado de anergia (D'Amico et al., 2004; Knoechel et al., 2005). A citocina IL-10 é descrita principalmente pela sua função imunossupressora, por inibir as células apresentadoras de antígenos (APC), MHC e moléculas co-estimuladoras da família B7, por diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, e reduzir a diferenciação e maturação de células dendríticas (Moore et al., 2001; O'Garra, Murphy, 2009; Vicari, Trinchieri, 2004). No entanto, recentemente a IL-10 foi destacada por inibir a produção de citocinas inflamatórias, dificultar o desenvolvimento de células T reguladoras (Treg) e células supressoras mielóides derivadas (MDSC) no ambiente tumoral, o que retardaria o desenvolvimento, crescimento e metástase do tumor (Tanikawa et al., 2012).

A citocina TGF- β , assim como a IL-10, tem sua função principal como imunossupressora. Essa citocina tem capacidade de suprimir as atividades anti-tumorais das células T, células NK, neutrófilos, monócitos e macrófagos que são importantes por regularem a promoção tumoral (Li et al., 2006; Wrzesinski et al., 2007). No estágio inicial da carcinogênese o TGF- β pode suprimir a resposta inflamatória necessária para a promoção tumoral. E, produzido cronicamente, no período de progressão da carcinogênese, pode levar a invasão e metástase por promover transição epitélio-mesenquimal (EMT) nas células epiteliais, além de inibir a proliferação celular (Glick, 2004; Heldin et al., 2009; Mordasky Markell et al., 2010; Siegel, Massague, 2003). Por fim, a citocina TGF- β pode ativar o fator de transcrição SMAD-3 e induzir a produção de colagenase por fibroblastos os quais são capazes de elaborar matriz extracelular (Chen et al., 1999).

A literatura mostra que células da imunidade inata e da imunidade adaptativa, bem como citocinas e quimiocinas, participam da resposta ao tumor. Com base nestas informações este trabalho tem o objetivo de caracterizar e avaliar o papel das células da resposta imune adaptativa em resposta à tumorigênese induzida por agentes químicos.

6 CONCLUSÕES

- Analisando a multiplicidade e incidência tumoral pudemos mostrar que os animais C57BL/6 e A/J são mais resistentes a indução tumoral pelo protocolo de DMBA e TPA que os animais AIRmin;
- Analisando o protocolo de tumorigênese cutânea nos animais C57BL/6 Nude, C57BL/6 Rag, C57BL/6 CD8KO não apresentaram diferenças em relação aos animais C57BL/6 selvagens.
- Os animais CD4 Knockouts apresentaram inflamação contínua aos 100 dias e não desenvolveram nenhum papiloma. Apresentaram aumento da MPO, sugerindo infiltração de neutrófilos e aumento da produção de IL1- β , IL-6, TNF- α , TGF- β e IL10.
- Avaliando os tempos iniciais 48H após aplicação do DMBA, os animais Knockout para CD4 apresentaram aumento da MPO, IL1- β , IL-6, TNF- α , não havendo diferenças na secreção das citocinas IL-10 e TGF- β . Neste protocolo os animais C57BL/6 Nude tiveram respostas semelhantes aos animais C57BL/6 selvagens.

REFERÊNCIAS*

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

Abel EL, Angel JM, Kiguchi K, DiGiovanni J. Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: fundamentals and applications. *Nature Protocols*. 2009;4(9):1350-62.

Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochemical Pharmacology*. 2006;72(11):1605-21.

Akhurst RJ, Fee F, Balmain A. Localized production of TGF-beta mRNA in tumour promoter-stimulated mouse epidermis. *Nature*. 1988;331(6154):363-5.

Anderson C, Hehr A, Robbins R, Hasan R, Athar M, Mukhtar H, et al. Metabolic requirements for induction of contact hypersensitivity to immunotoxic polyaromatic hydrocarbons. *J Immunol*. 1995;155(7):3530-7.

Anderson GM, Nakada MT, DeWitte M. Tumor necrosis factor-alpha in the pathogenesis and treatment of cancer. *Current Opinion in Pharmacology*. 2004;4(4):314-20.

Apte RN, Krelin Y, Song X, Dotan S, Recih E, Elkabets M, et al. Effects of micro-environment- and malignant cell-derived interleukin-1 in carcinogenesis, tumour invasiveness and tumour-host interactions. *Eur J Cancer*. 2006;42(6):751-9.

Apte RN, Voronov E. Interleukin-1--a major pleiotropic cytokine in tumor-host interactions. *Seminars in Cancer Biology*. 2002;12(4):277-90.

Ashman LK, Murray AW, Cook MG, Kotlarski I. Two-stage skin carcinogenesis in sensitive and resistant mouse strains. *Carcinogenesis*. 1982;3(1):99-102.

Balkwill F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2002;13(2):135-41.

Balkwill F, Coussens LM. Cancer: an inflammatory link. *Nature*. 2004;431(7007):405-6.

Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001;357(9255):539-45.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Barbera-Guillem E, Nelson MB, Barr B, Nyhus JK, May KF, Jr., Feng L, et al. B lymphocyte pathology in human colorectal cancer. Experimental and clinical therapeutic effects of partial B cell depletion. *Cancer Immunology, Immunotherapy*: CII. 2000;48(10):541-9.

Biozzi G, Ribeiro OG, Saran A, Araujo ML, Maria DA, De Franco M, et al. Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. *Carcinogenesis*. 1998;19(2):337-46.

Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology*. 2010;11(10):889-96.

Bourgeois C, Tanchot C. Mini-review CD4 T cells are required for CD8 T cell memory generation. *European Journal of Immunology*. 2003;33(12):3225-31.

Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *The Journal of Investigative Dermatology*. 1982;78(3):206-9.

Brigati C, Noonan DM, Albini A, Benelli R. Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes? *Clinical & Experimental Metastasis*. 2002;19(3):247-58.

Busbee PB, Rouse M, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Use of natural AhR ligands as potential therapeutic modalities against inflammatory disorders. *Nutrition Reviews*. 2013;71(6):353-69.

Campbell C, Quinn AG, Ro YS, Angus B, Rees JL. p53 mutations are common and early events that precede tumor invasion in squamous cell neoplasia of the skin. *The Journal of Investigative Dermatology*. 1993;100(6):746-8.

Chen SJ, Yuan W, Mori Y, Levenson A, Trojanowska M, Varga J. Stimulation of type I collagen transcription in human skin fibroblasts by TGF-beta: involvement of Smad 3. *The Journal of Investigative Dermatology*. 1999;112(1):49-57.

Chen Z, Malhotra PS, Thomas GR, Ondrey FG, Duffey DC, Smith CW, et al. Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 1999;5(6):1369-79.

Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 2009;30(7):1073-81.

Conze D, Weiss L, Regen PS, Bhushan A, Weaver D, Johnson P, et al. Autocrine production of interleukin 6 causes multidrug resistance in breast cancer cells. *Cancer Research*. 2001;61(24):8851-8.

Corthay A, Skovseth DK, Lundin KU, Rosjo E, Omholt H, Hofgaard PO, et al. Primary antitumor immune response mediated by CD4+ T cells. *Immunity*. 2005;22(3):371-83.

Coughlin CM, Salhany KE, Gee MS, LaTemple DC, Kotenko S, Ma X, et al. Tumor cell responses to IFN γ affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis. *Immunity*. 1998;9(1):25-34.

Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860-7.

D'Amico G, Vulcano M, Bugarin C, Bianchi G, Pirovano G, Bonamino M, et al. CD40 activation of BCP-ALL cells generates IL-10-producing, IL-12-defective APCs that induce allogeneic T-cell anergy. *Blood*. 2004;104(3):744-51.

De Souza VR, Cabrera WK, Galvan A, Ribeiro OG, De Franco M, Vorraro F, et al. Aryl hydrocarbon receptor polymorphism modulates DMBA-induced inflammation and carcinogenesis in phenotypically selected mice. *International Journal of Cancer Journal International du Cancer*. 2009;124(6):1478-82.

Denison MS, Nagy SR. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2003;43:309-34.

Devreotes PN, Zigmond SH. Chemotaxis in eukaryotic cells: a focus on leukocytes and Dictyostelium. *Annual Review of cell Biology*. 1988;4:649-86.

Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN γ receptors. *Immunity*. 1994;1(6):447-56.

DiGiovanni J. Multistage carcinogenesis in mouse skin. *Pharmacology & Therapeutics*. 1992;54(1):63-128.

DiPietro LA. Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. *Shock*. 1995;4(4):233-40.

Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2004;4(1):11-22. Epub 2004/01/07.

Dubas LE, Ingraffea A. Nonmelanoma skin cancer. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*. 2013;21(1):43-53.

Elaraj DM, Weinreich DM, Varghese S, Puhlmann M, Hewitt SM, Carroll NM, et al. The role of interleukin 1 in growth and metastasis of human cancer xenografts. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(4):1088-96.

Enk AH, Katz SI. Identification and induction of keratinocyte-derived IL-10. *J Immunol*. 1992;149(1):92-5.

Fan Y, Ye J, Shen F, Zhu Y, Yeghiazarians Y, Zhu W, et al. Interleukin-6 stimulates circulating blood-derived endothelial progenitor cell angiogenesis in vitro. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2008;28(1):90-8.

Fransen L, Van der Heyden J, Ruyschaert R, Fiers W. Recombinant tumor necrosis factor: its effect and its synergism with interferon-gamma on a variety of normal and transformed human cell lines. *European Journal of Cancer & Clinical Oncology*. 1986;22(4):419-26.

Fujiki H, Suganuma M. Tumor promoters--microcystin-LR, nodularin and TNF-alpha and human cancer development. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2011;11(1):4-18.

Gemma A, Takenaka K, Hosoya Y, Matuda K, Seike M, Kurimoto F, et al. Altered expression of several genes in highly metastatic subpopulations of a human pulmonary adenocarcinoma cell line. *Eur J Cancer*. 2001;37(12):1554-61.

Glick AB. TGFbeta1, back to the future: revisiting its role as a transforming growth factor. *Cancer Biology & Therapy*. 2004;3(3):276-83.

Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology*. 2005;5(12):953-64.

Guo Y, Xu F, Lu T, Duan Z, Zhang Z. Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 2012;38(7):904-10.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.

Hao N, Whitelaw ML. The emerging roles of AhR in physiology and immunity. *Biochemical Pharmacology*. 2013;86(5):561-70.

Heldin CH, Landstrom M, Moustakas A. Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. *Current Opinion in Cell Biology*. 2009;21(2):166-76.

Holzinger C, Weissinger E, Zuckermann A, Imhof M, Kink F, Schollhammer A, et al. Effects of interleukin-1, -2, -4, -6, interferon-gamma and granulocyte/macrophage colony stimulating factor on human vascular endothelial cells. *Immunology Letters*. 1993;35(2):109-17.

Ibanez OM, Stiffel C, Ribeiro OG, Cabrera WK, Massa S, de Franco M, et al. Genetics of nonspecific immunity: I. Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. *European Journal of Immunology*. 1992;22(10):2555-63.

Jiang W, Ananthaswamy HN, Muller HK, Kripke ML. p53 protects against skin cancer induction by UV-B radiation. *Oncogene*. 1999;18(29):4247-53.

Johnsen AC, Haux J, Steinkjer B, Nonstad U, Egeberg K, Sundan A, et al. Regulation of APO-2 ligand/trail expression in NK cells-involvement in NK cell-mediated cytotoxicity. *Cytokine*. 1999;11(9):664-72.

Jones SA, Scheller J, Rose-John S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *The Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(9):3375-83.

Jung HC, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E, et al. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *The Journal of Clinical Investigation*. 1995;95(1):55-65.

Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*. 1986;319(6055):675-8.

Kemp CJ. Multistep skin cancer in mice as a model to study the evolution of cancer cells. *Seminars in Cancer Biology*. 2005;15(6):460-73.

Knoechel B, Lohr J, Kahn E, Abbas AK. The link between lymphocyte deficiency and autoimmunity: roles of endogenous T and B lymphocytes in tolerance. *J Immunol*. 2005;175(1):21-6.

Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annual Review of Immunology*. 1998;16:137-61.

Lewis AM, Varghese S, Xu H, Alexander HR. Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. *Journal of Translational Medicine*. 2006;4:48.

Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annual Review of Immunology*. 2006;24:99-146.

Lin ZQ, Kondo T, Ishida Y, Takayasu T, Mukaida N. Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. *Journal of Leukocyte Biology*. 2003;73(6):713-21.

Liu LS, Colegio OR. Molecularly targeted therapies for nonmelanoma skin cancers. *International Journal of Dermatology*. 2013;52(6):654-65.

Long EO. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annual Review of Immunology*. 1999;17:875-904.

Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):436-44.

Marzo AL, Kinnear BF, Lake RA, Frelinger JJ, Collins EJ, Robinson BW, et al. Tumor-specific CD4+ T cells have a major "post-licensing" role in CTL mediated anti-tumor immunity. *J Immunol*. 2000;165(11):6047-55.

McGuire JF, Ge NN, Dyson S. Nonmelanoma skin cancer of the head and neck I: histopathology and clinical behavior. *American Journal of Otolaryngology*. 2009;30(2):121-33.

McLafferty E, Hendry C, Alistair F. The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. *Nurs Stand*. 2012;27(3):35-42.

Medvedev AE, Johnsen AC, Haux J, Steinkjer B, Egeberg K, Lynch DH, et al. Regulation of Fas and Fas-ligand expression in NK cells by cytokines and the involvement of Fas-ligand in NK/LAK cell-mediated cytotoxicity. *Cytokine*. 1997;9(6):394-404.

Miller MD, Krangel MS. Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Critical Reviews in Immunology*. 1992;12(1-2):17-46.

Mirandola P, Ponti C, Gobbi G, Sponzilli I, Vaccarezza M, Cocco L, et al. Activated human NK and CD8+ T cells express both TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors but are resistant to TRAIL-mediated cytotoxicity. *Blood*. 2004;104(8):2418-24.

Mitchison NA. The carrier effect in the secondary response to hapten-protein conjugates. II. Cellular cooperation. *European Journal of Immunology*. 1971;1(1):18-27.

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology*. 2001;19:683-765.

Moore RJ, Owens DM, Stamp G, Arnott C, Burke F, East N, et al. Mice deficient in tumor necrosis factor- α are resistant to skin carcinogenesis. *Nature Medicine*. 1999;5(7):828-31.

Mordasky Markell L, Perez-Lorenzo R, Masiuk KE, Kennett MJ, Glick AB. Use of a TGF β type I receptor inhibitor in mouse skin carcinogenesis reveals a dual role for TGF β signaling in tumor promotion and progression. *Carcinogenesis*. 2010;31(12):2127-35.

Mueller MM. Inflammation in epithelial skin tumours: old stories and new ideas. *Eur J Cancer*. 2006;42(6):735-44.

Mukaida N, Sasakki S-I, Popivanova BK. Tumor Necrosis Factor (TNF) and Chemokines in Colitis-Associated Cancer. *Cancers*. 2011;3:2811-26.

Muller-Hermelink N, Braumuller H, Pichler B, Wieder T, Mailhammer R, Schaak K, et al. TNFR1 signaling and IFN- γ signaling determine whether T cells induce tumor dormancy or promote multistage carcinogenesis. *Cancer Cell*. 2008;13(6):507-18.

Mumm JB, Emmerich J, Zhang X, Chan I, Wu L, Mauze S, et al. IL-10 elicits IFN γ -dependent tumor immune surveillance. *Cancer Cell*. 2011;20(6):781-96.

Murphy JE, Morales RE, Scott J, Kupper TS. IL-1 α , innate immunity, and skin carcinogenesis: the effect of constitutive expression of IL-1 α in epidermis on chemical carcinogenesis. *J Immunol*. 2003;170(11):5697-703.

Naito M, Naito Y, DiGiovanni J. Comparison of the histological changes in the skin of DBA/2 and C57BL/6 mice following exposure to various promoting agents. *Carcinogenesis*. 1987;8(12):1807-15.

Niu G, Wright KL, Huang M, Song L, Haura E, Turkson J, et al. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene*. 2002;21(13):2000-8.

Noel W, Raes G, Hassanzadeh Ghassabeh G, De Baetselier P, Beschin A. Alternatively activated macrophages during parasite infections. *Trends in Parasitology*. 2004;20(3):126-33.

O'Garra A, Murphy KM. From IL-10 to IL-12: how pathogens and their products stimulate APCs to induce T(H)1 development. *Nature Immunology*. 2009;10(9):929-32.

Ohno S, Nishizuka Y. Protein kinase C isotypes and their specific functions: prologue. *Journal of Biochemistry*. 2002;132(4):509-11.

Paladini RD, Saleh J, Qian C, Xu GX, Rubin LL. Modulation of hair growth with small molecule agonists of the hedgehog signaling pathway. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2005;125(4):638-46.

Perez-Lorenzo R, Markell LM, Hogan KA, Yuspa SH, Glick AB. Transforming growth factor beta1 enhances tumor promotion in mouse skin carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2010;31(6):1116-23.

Philip M, Rowley DA, Schreiber H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Seminars in Cancer Biology*. 2004;14(6):433-9.

Poland A, Palen D, Glover E. Analysis of the four alleles of the murine aryl hydrocarbon receptor. *Molecular Pharmacology*. 1994;46(5):915-21.

Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Experimental Dermatology*. 2008;17(12):1063-72.

Qin Z, Blankenstein T. CD4+ T cell--mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity*. 2000;12(6):677-86.

Quezada SA, Simpson TR, Peggs KS, Merghoub T, Vider J, Fan X, et al. Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *The Journal of Experimental Medicine*. 2010;207(3):637-50.

Reibman J, Meixler S, Lee TC, Gold LI, Cronstein BN, Haines KA, et al. Transforming growth factor beta 1, a potent chemoattractant for human neutrophils, bypasses classic signal-transduction pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(15):6805-9.

Rubin AI, Chen EH, Ratner D. Basal-cell carcinoma. *The New England Journal of Medicine*. 2005;353(21):2262-9.

Schetter AJ, Heegaard NH, Harris CC. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis*. 2010;31(1):37-49.

Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill LA, et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2007;21(2):325-32.

Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of Clinical Investigation*. 2012;122(3):787-95.

Siegel PM, Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2003;3(11):807-21.

Slaga TJ. SENCAR mouse skin tumorigenesis model versus other strains and stocks of mice. *Environmental Health Perspectives*. 1986;68:27-32.

Smyth MJ, Cretney E, Kershaw MH, Hayakawa Y. Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunological Reviews*. 2004;202:275-93.

Song X, Krelin Y, Dvorkin T, Bjorkdahl O, Segal S, Dinarello CA, et al. CD11b+/Gr-1+ immature myeloid cells mediate suppression of T cells in mice bearing tumors of IL-1beta-secreting cells. *J Immunol*. 2005;175(12):8200-8.

Song X, Voronov E, Dvorkin T, Fima E, Cagnano E, Benharroch D, et al. Differential effects of IL-1 alpha and IL-1 beta on tumorigenicity patterns and invasiveness. *J Immunol*. 2003;171(12):6448-56.

Sorensen O, Borregaard N. Methods for quantitation of human neutrophil proteins, a survey. *Journal of Immunological Methods*. 1999;232(1-2):179-90.

Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. Immune memory redefined: characterizing the longevity of natural killer cells. *Immunological Reviews*. 2010;236:83-94.

Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, Sakatani T, Fujikura T. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Analytical Biochemistry*. 1983;132(2):345-52.

Szlosarek P, Charles KA, Balkwill FR. Tumour necrosis factor-alpha as a tumour promoter. *Eur J Cancer*. 2006;42(6):745-50.

Tanikawa T, Wilke CM, Kryczek I, Chen GY, Kao J, Nunez G, et al. Interleukin-10 ablation promotes tumor development, growth, and metastasis. *Cancer Research*. 2012;72(2):420-9.

Thomas RS, Penn SG, Holden K, Bradfield CA, Rank DR. Sequence variation and phylogenetic history of the mouse *Ahr* gene. *Pharmacogenetics*. 2002;12(2):151-63.

To MD, Rosario RD, Westcott PM, Banta KL, Balmain A. Interactions between wild-type and mutant *Ras* genes in lung and skin carcinogenesis. *Oncogene*. 2013;32(34):4028-33.

Trinchieri G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *The Journal of Experimental Medicine*. 2007;204(2):239-43.

Vasunia KB, Miller ML, Andringa S, Baxter CS. Induction of interleukin-6 in the epidermis of mice in response to tumor-promoting agents. *Carcinogenesis*. 1994;15(8):1723-7.

Vicari AP, Trinchieri G. Interleukin-10 in viral diseases and cancer: exiting the labyrinth? *Immunological Reviews*. 2004;202:223-36.

Videm V, Strand E. Changes in neutrophil surface-receptor expression after stimulation with FMLP, endotoxin, interleukin-8 and activated complement compared to degranulation. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2004;59(1):25-33.

von Domarus H, Stevens PJ. Metastatic basal cell carcinoma. Report of five cases and review of 170 cases in the literature. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1984;10(6):1043-60.

Wrzesinski SH, Wan YY, Flavell RA. Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(18 Pt 1):5262-70.

Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *The Journal of Clinical Investigation*. 1998;101(2):311-20.

Yoshida S, Ono M, Shono T, Izumi H, Ishibashi T, Suzuki H, et al. Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Molecular and Cellular Biology*. 1997;17(7):4015-23.

Younes A, Aggarwall BB. Clinical implications of the tumor necrosis factor family in benign and malignant hematologic disorders. *Cancer*. 2003;98(3):458-67.

Youssef KK, Van Keymeulen A, Lapouge G, Beck B, Michaux C, Achouri Y, et al. Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma. *Nature Cell Biology*. 2010;12(3):299-305.

Yusuf N, Nasti TH, Katiyar SK, Jacobs MK, Seibert MD, Ginsburg AC, et al. Antagonistic roles of CD4+ and CD8+ T-cells in 7,12- dimethylbenz(a)anthracene cutaneous carcinogenesis. *Cancer Research*. 2008;68(10):3924-30.

Yusuf N, Timares L, Seibert MD, Xu H, Elmets CA. Acquired and innate immunity to polyaromatic hydrocarbons. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2007;224(3):308-12.

Zamai L, Ahmad M, Bennett IM, Azzoni L, Alnemri ES, Perussia B. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 1998;188(12):2375-80.