



ARTIGO ORIGINAL

Vacina contra HPV mediada por METTL3 aumenta o efeito da imunoterapia com anti-PD-1 para atenuar o desenvolvimento de carcinoma espinocelular cutâneo^{☆☆}

Yingjie Zhang ^{a,b}, Yiru Wang ^c, Shuping Guo ^a e Hongzhou Cui ^{a,b,*}

^a Departamento de Dermatologia, First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, China

^b The First Clinical Medical College, Shanxi Medical University, Taiyuan, China

^c Departamento de Dermatologia, Taiyuan Maternity and Child Health Care Hospital, Taiyuan, China

Recebido em 16 de março de 2023; aceito em 2 de maio de 2023

PALAVRAS-CHAVE

Carcinoma de células escamosas;
Linfócitos T CD8⁺;
Vacinas contra papilomavírus

Resumo

Fundamentos: O carcinoma espinocelular cutâneo (CECC) se desenvolve a partir dos queratinócitos por meio da desregulação da autorrenovação e diferenciação celular. Estudos recentes mostraram que o tamanho e o número de CECCs diminuem gradualmente ou até desaparecem após a vacinação contra o HPV. Entretanto, o papel da vacina contra o HPV no mecanismo do CECC é pouco compreendido.

Objetivo: O objetivo deste estudo é investigar o efeito e mecanismo da vacina contra o HPV no CECC.

Métodos: Imunofluorescência foi utilizada para estudar as células imunológicas que infiltram o tecido tumoral de pacientes com CECC. Os efeitos da vacina contra HPV em células e tecidos de CECC foram estudados por cultura celular, PCR em tempo real, *western blot*, ensaio de citotoxicidade, ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA), *m6A blotting*, ensaio CCK-8, quantificação de metilação de ácido ribonucleico m6A e transplante de tumor.

Resultados: A vacina contra o HPV aumentou o efeito tóxico das células T CD8⁺ nas células do CECC e promoveu a produção de múltiplas citocinas pelas células T CD8⁺. Além disso, as vacinas contra o HPV podem aumentar a sensibilidade do tumor à terapia anti-PD-1, regulando negativamente METTL3 no tecido tumoral, com a combinação da vacina contra o HPV e dos anticorpos monoclonais PD-1 produzindo maior infiltração de células imunes em comparação com o bloqueio de PD-1 isoladamente.

DOI referente ao artigo:

<https://doi.org/10.1016/j.abd.2023.05.006>

[☆] Como citar este artigo: Zhang Y, Wang Y, Guo S, Cui H. METTL3-mediated HPV vaccine enhances the effect of anti PD-1 immunotherapy to alleviate the development of cutaneous squamous cell carcinoma. *An Bras Dermatol.* 2024;99:210–22.

^{☆☆} Trabalho realizado no First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, China.

* Autor para correspondência.

E-mail: menjuncai@163.com (H. Cui).

Limitações do estudo: É importante observar as limitações deste estudo, incluindo o pequeno tamanho da amostra, a construção do modelo em camundongo e a escolha da vacina contra HPV e do anticorpo monoclonal PD-1, o que pode limitar a generalização dos achados para uma população mais ampla.

Conclusões: Espera-se que esta pesquisa contribua para uma compreensão mais profunda do papel da vacina contra o HPV no tratamento do CECC. Espera-se que a vacina contra o HPV se torne uma abordagem importante para atenuar o desenvolvimento do CECC.

© 2023 Publicado por Elsevier España, S.L.U. em nome de Sociedade Brasileira de Dermatologia. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introdução

O carcinoma espinocelular cutâneo (CECC) é um tumor maligno epitelial originado em queratinócitos, ficando sua incidência atrás apenas do carcinoma basocelular entre os cânceres de pele não melanoma.^{1,2} A patogênese do CECC ainda é discutível, mas há evidências crescentes de que o papilomavírus humano (HPV), especialmente HPV16 ou HPV18, esteja envolvido na patogênese de alguns carcinomas espinocelulares.^{3,4} As infecções por HPV de baixo risco estão implicadas cerca de 5% de todos os casos de câncer no mundo, e as infecções por HPV de alto risco têm maior duração do que as infecções por HPV de baixo risco.⁵ De acordo com uma metanálise, o risco de CECC em indivíduos imunocompetentes aumenta 42% em decorrência da infecção por HPV.⁶

Atualmente, os principais métodos de tratamento para CECC são cirurgia e quimioterapia.⁷ Quando a cirurgia é arriscada ou impossível, ainda é um desafio encontrar tratamento seguro e eficaz. Em 2017-2018, três casos publicados no *JAMA Dermatology* mostraram diminuição gradual no tamanho e número de CECCs ou mesmo seu desaparecimento após a vacinação contra o HPV,^{8,9} sugerindo que a vacina contra o HPV desempenhe papel inibitório no desenvolvimento do CECC. Embora a utilidade preventiva da vacina contra o HPV seja bem compreendida, seu mecanismo de ação no tratamento de doenças malignas cutâneas não é claro.

Nos últimos anos, tem-se acreditado que a imunoterapia tumoral se tornará uma nova abordagem no campo da terapia tumoral.¹⁰ As células T CD8⁺ são as células reguladoras mais importantes na imunidade adquirida contra tumores, realizando a mediação da imunidade antitumoral e destruindo diretamente as células cancerígenas; portanto, a ativação das células T CD8⁺ pode ser a chave para a imunoterapia no CECC. Estudos demonstraram que o ligante de morte programada 1 (PD-1, do inglês *programmed death ligand-1*) é altamente expresso em células T CD8⁺ no CECC, e o bloqueio de PD-1 com anticorpo monoclonal é um método eficaz.^{11,12} Os inibidores de PD-1 podem bloquear a ligação de PD-1 e PD-L1, resultando na transdução de sinais imunossupressores na via PD-1/PD-L1 e, consequentemente restaurando e promovendo a função imunológica das células T CD8⁺,^{10,13} fazendo com que desempenhem poderoso papel antitumoral. Foi relatado que a vacina da proteína de fusão HPV16 L2E7E6 chamada antígeno tecidual

– neoplasia intraepitelial cervical e o bloqueador de PD-1 têm efeitos sinérgicos para melhor controle dos tumores TC-1.^{5,14,15}

A epigenética tornou-se tema importante na pesquisa científica.² A N6-metiladenosina (m6A) é uma modificação reversível de metilação no sexto átomo N da adenina,^{16,17} que demonstrou desempenhar papel importante em muitos processos biológicos, como adipogênese, linha germinativa de espermatozoides, tumores e outras doenças.¹⁸⁻²⁰ No entanto, até o momento, houve poucos estudos sobre como as modificações de m6A afetam a progressão do CECC. Embora m6A tenha sido o foco de muitos estudos nos últimos anos, uma compreensão abrangente de m6A ainda não foi alcançada, e os mecanismos subjacentes à modificação de m6A no câncer devem ser melhor investigados. Estudos recentes mostraram que a modificação de m6A está intimamente relacionada à remodelação do microambiente imunológico do tumor, o que pode influenciar seu desenvolvimento.²¹

Neste estudo, foi levantada a hipótese de que a vacina contra o HPV e a injeção anti-PD-1 poderiam aumentar significativamente o número de células T CD8⁺ que infiltram o tecido tumoral em camundongos com CECC, provocando resposta imune significativa em sinergia com o bloqueio de PD-1. Assim obteríamos informações sobre o impacto potencial da vacinação contra o HPV em neoplasias malignas associadas ao HPV atualmente pouco estudadas. A ideia de que a vacina contra o HPV aumente o efeito anti-PD-1 via METTL3 para o tratamento do CECC também foi proposta por meio de amostras antropológicas, experimentos citológicos e experimentos com animais. Os presentes achados revelam mecanismo de metilação de mRNA anteriormente não reconhecido em CECC sensibilizado ao bloqueio de PD-1, proporcionando assim potencial caminho terapêutico para essa neoplasia maligna.

Materiais e métodos

Amostras de tecidos

Para a coleta de amostras de CECC de pacientes foi obtida a aprovação do Comitê de Ética do First Hospital of Shanxi Medical University. O tecido de CECC foi coletado de dez pacientes após a cirurgia, e os detalhes cirúrgicos desses pacientes são mostrados na [tabela 1](#). O patologista confirmou o diagnóstico na amostra.

Tabela 1 Detalhes de estudos em humanos

Número	Idade	Vacina contra HPV	Local	Diâmetro (cm)	Procedimento
1	56	N	Áreas anogenitais	2,3	Mohs
2	34	N	Cabeça	1,4	Excisão padrão
3	45	S	Cabeça	1,6	Excisão padrão
4	36	N	Cabeça	0,8	Excisão padrão
5	65	S	Pescoço	1,4	Excisão padrão
6	46	N	Cabeça	1,5	Excisão padrão
7	48	S	Vermelhão dos lábios	1,8	Excisão padrão
8	39	N	Cabeça	3,2	Mohs
9	47	S	Áreas pré-tibiais	1,7	Excisão padrão
10	51	S	Cabeça	1,2	Excisão padrão

Imunofluorescência

Cortes histológicos de tecido tumoral emblocado em parafina foram secos a 90 °C durante 4 horas, desparafinizados em xileno e depois reidratados em soluções graduadas de etanol. Os cortes histológicos resfriados foram imersos em solução de peróxido de hidrogênio a 0,3% durante 15 minutos para bloquear a atividade da peroxidase endógena, enxaguados com PBS durante 5 minutos e bloqueadas com solução de BSA a 3% à temperatura ambiente durante 30 minutos. Após lavagem com PBS, os cortes foram incubados com anticorpos (Abcam, Cambridge, MA, EUA) por 1 hora em tampão de bloqueio BSA a 1%, seguido de incubação por 1,5 hora com anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluro 549 (Thermal Fischer) e DAPI. A reação de imunofluorescência foi avaliada através de microscópio confocal Zeiss LSM510 equipado com objetiva de imersão de 63×.

Cultura de células

Células A431 (células de CECC humano) e SCC7 (células de CECC de camundongo) foram obtidas do Cell Bank of Shanghai Institute of Cell Biology (Xangai, China). Essas células foram mantidas em meio de cultura DMEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), que é suplementado com 10% de FBS e 1% de penicilina-estreptomomicina. As células foram cultivadas em incubadora umidificada a 37 °C com 5% de CO₂ (Sanyo Osaka, Japão).

Preparação de células T CD8⁺

Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de doadores de sangue foram isoladas utilizando o método de gradiente de Ficoll, e as células T CD8⁺ foram isoladas de 1,25 × 10⁷ CMSP utilizando o *kit* Easy Sep Human CD8⁺ T Cell Isolation.

PCR em tempo real

A extração do RNA total foi realizada utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e a transcrição reversa utilizando o *kit* cDNA Synthesis (Takara, Japão). A quantidade e a densidade do RNA foram verificadas por espectrofotômetro. O QRT-PCR foi realizado utilizando o *kit* SYBR Green Master MIX (Takara, Japão), de acordo com as

instruções do fabricante. Os ensaios foram realizados em triplicata e a expressão gênica relativa foi determinada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

METTL3 *forward*: 5'- CATCCGTCTTGCCATCTCTAC-3'

METTL3 *reverse*: 5'- GACCTCGCTTTACTCAATCA-3'

METTL14 *forward*: 5'- GCATCACTGCGAATGAGAAATG-3'

METTL14 *reverse*: 5'- CAGAACCGCACCAGAGAAATA-3'

RMB15 *forward*: 5'- GCCCAACTCAAGATCACTCA-3'

RMB15 *reverse*: 5'- AGCCAGGAGAATGCCATAAC-3'

WTAP *forward*: 5'- AATGGTAGACCCAGCAATCAA-3'

WTAP *reverse*: 5'- CGTAACTTCCAGGCACTCA-3'

VIRMA *forward*: 5'- GAGGCGGATCCTTTGAGTTT-3'

VIRMA *reverse*: 5'- AACGACCTGAGAGAGGGATAG-3'

FTO *forward*: 5'- AGAGCGGGAAGCTAAGAAAC-3'

FTO *reverse*: 5'- GCCACTGCTGATAGAATCAT-3'

ALKBH5 *forward*: 5'- GTGGGTATGCTGCTGATGAA-3'

ALKBH5 *reverse*: 5'- TCGCGGTGCATTAATCTTG-3'

Western blot

Para extrair proteínas totais, os lisados celulares foram obtidos utilizando tampão RIPA (Beyotime, Xangai, China) suplementado com fosfatase e inibidores de protease (Yeasten, Xangai, China). Um total de 15 μL de proteína foi injetado em um gel Bis-Tris SDS/PAGE e transferido para membranas de PVDF. Após bloqueio com BSA a 5%, as membranas foram incubadas com anticorpo primário durante a noite a 4 °C. As membranas foram então expostas ao anticorpo secundário durante 60 minutos. As tiras foram incubadas com *kit* ECL e analisadas por sistema de imagem. A análise densitométrica foi realizada com o *software* Adobe Photoshop CS6.

Ensaio citolítico

Células T CD8⁺ purificadas foram obtidas por seleção negativa. As células de CECC foram adicionadas a células T CD8⁺ purificadas na proporção de 1:10-50 e cultivadas em placas de 48 poços (Costar 3548, Cambridge, MA) em meio RPMI 1640. IL-2 (50 unidades/mL, Chiron, Emeryville, CA) foi adicionado a cada poço começando no 1° dia e a cada 2 a 3 dias depois disso. As células de CECC foram colhidas no dia 7 e analisadas em relação à atividade lítica em triplicata utilizando o ensaio CCK-8.

Ensaio imunoabsorvente ligado a enzima

O ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de citocinas foi realizado com kits (Boster Bio, Wuhan, China).

Ensaio CCK-8

Um total de 10^3 células foi inoculado em cada poço das placas de 96 poços. Em cada intervalo (24, 48, 72 e 96 horas), $10 \mu\text{L}$ de solução CCK-8 (Yeasen, Shanghai, China) foram adicionados aos poços em sextuplicata. Os poços foram incubados durante 3 horas, e a absorbância de cada poço foi determinada a 450 nm.

Ensaio in vivo

Todos os experimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do First Hospital, Shanxi Medical University. Camundongos C57BL/6 com 8 semanas de idade foram mantidos de acordo com as diretrizes dos 3Rs (reduzir, reutilizar e reciclar). Um total de 1×10^7 células SCC7 ressuspensas em $100 \mu\text{L}$ de PBS foi inoculado por via subcutânea no flanco esquerdo dos camundongos. Quando o volume do tumor atingiu $50\text{-}100 \text{ mm}^3$, foi injetado anticorpo anti-PD-1 ($200 \mu\text{g}/\text{camundongo}$) isolado ou combinado com vacina contra HPV ($0,25 \mu\text{L}/\text{camundongo}$). Após a detecção do tumor, seu tamanho foi medido com paquímetro a cada cinco dias, e o volume do tumor foi calculado como volume (cm^3) = $C \times L^2 \times 0,5$, com C e L representando os diâmetros maior e menor, respectivamente.

Quantificação da metilação de RNA m6A

O kit de ensaio de metilação de RNA m6A (Abcam, ab185912) foi utilizado para avaliar o conteúdo de m6A no RNA total.

Dot blot

Os poli (A) + RNAs (400 ng) foram diluídos duas vezes e colocados em membrana de náilon (GE Healthcare, EUA). Resumidamente, as membranas foram então submetidas a reação cruzada com UV, bloqueadas, incubadas com anticorpo m6A e conjugado anti-IgG de coelho com peroxidase de rábano, e finalmente detectadas com um kit de substrato de 3,3'-diaminobenzidina peroxidase. Os mesmos 400 ng de poli(A)+ RNAs foram colocados na membrana, corados com azul de metileno $0,02\%$ em acetato de sódio $0,3\text{M}$ por 2 horas e lavados com água livre de ribonuclease por 5 horas.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SPSS versão 19.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, EUA) ou GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, EUA), como descrito anteriormente. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão (DP). Para comparações, foram realizados o teste *t* de Student e o teste ANOVA unidirecional

pelo teste de diferença mínima significativa, como apropriado. Valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

Vacina contra o HPV aumenta a infiltração de células imunes em tecidos de CECC em humanos

Foram selecionados cinco amostras de tecido tumoral de pacientes com CECC vacinados contra HPV e outras cinco não vacinados contra HPV, a fim de determinar o efeito da vacina contra HPV nas células imunes em tecidos humanos de CECC, e foi analisada a infiltração de CD8, CD4, NK, DC e macrófagos em tumores de CECC por imunofluorescência. Houve diferença estatística significativa entre os dois grupos nos cinco tipos de células imune. A expressão de CD8, CD4, CD69, CD11c e CD163 nos tumores humanos no grupo vacinado estava significativamente aumentada (fig. 1).

Vacina contra o HPV aumenta a capacidade de destruição das células T CD8+

Para investigar o efeito da vacina contra o HPV na atividade das células T CD8+, foi realizada cocultura de células T CD8+ com células A431 nas proporções 10:1, 25:1 e 50:1 e adicionados $2 \mu\text{g}$ ou $10 \mu\text{g}$ da vacina bivalente contra o HPV Cervarix (GSK, $0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$). As células T CD8+ mostraram maior atividade citotóxica após a adição da vacina contra o HPV; entretanto, as diferenças na atividade indutora de morte celular da vacina contra o HPV em diferentes concentrações nas células A431 não foram estatisticamente significantes em determinada razão potência-alvo (fig. 2A). Para explorar o efeito da vacina contra HPV na produção de citocinas no sistema de cocultura, foram examinados IFN- γ , TNF- α , TGF- β , IL-17, IL-12 e IL-33 no sobrenadante. A secreção de IFN- γ , TNF- α , TGF- β e IL-17 aumentou significativamente após a adição de $2 \mu\text{g}$ de vacina contra o HPV, enquanto a produção de IFN- γ , TNF- α , TGF- β e IL-33 aumentou após a adição de $10 \mu\text{g}$ de vacina contra HPV (fig. 2B).

Vacina contra o HPV combinada com tratamento com anticorpos monoclonais anti-PD-1 inibe o desenvolvimento de tumores em camundongos in vivo

Para analisar melhor o efeito da vacina contra o HPV no CECC em modelo animal, foi levantada a hipótese de que a adição da vacina contra o HPV aumentaria a imunogenicidade e os efeitos antitumorais do tratamento com PD-1 em camundongos. Para testar essa hipótese, dez camundongos com CECC foram divididos em dois grupos de cinco camundongos cada e foi injetado PD-1 Abs (10377-M94, SinoBiological) ou PD-1Abs + vacina contra o HPV. Não foi criado um grupo sem tratamento que refletisse o efeito terapêutico do PD-1 no CECC, porque em outros estudos concluiu-se que o anticorpo monoclonal PD-1 tem efeito inibitório significativo no CECC.²²⁻²⁵ Para monitorar a resposta antitumoral, o volume do tumor foi medido a cada cinco dias e os camundongos foram submetidos a eutanásia no 30º dia; o tecido tumoral

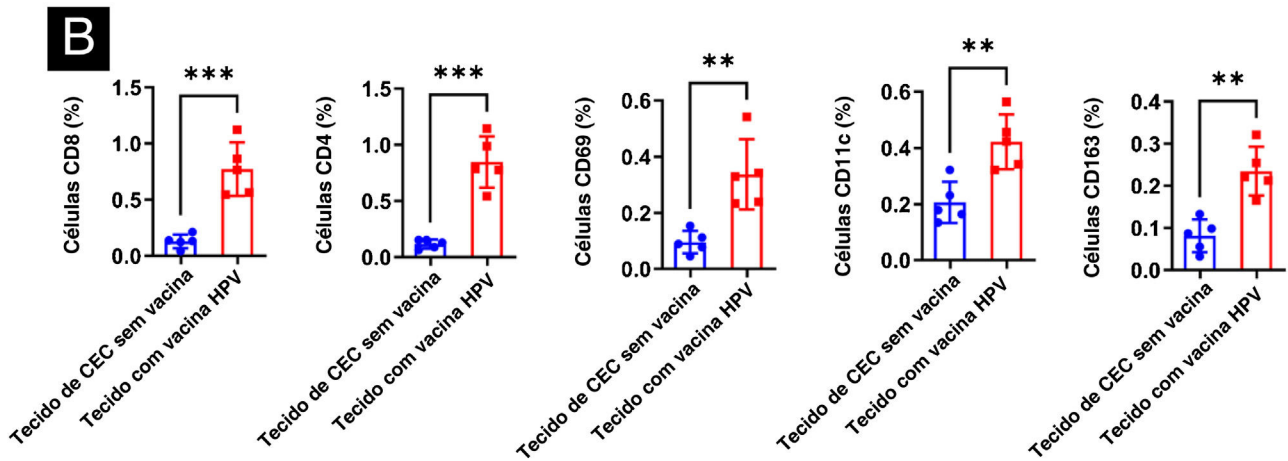
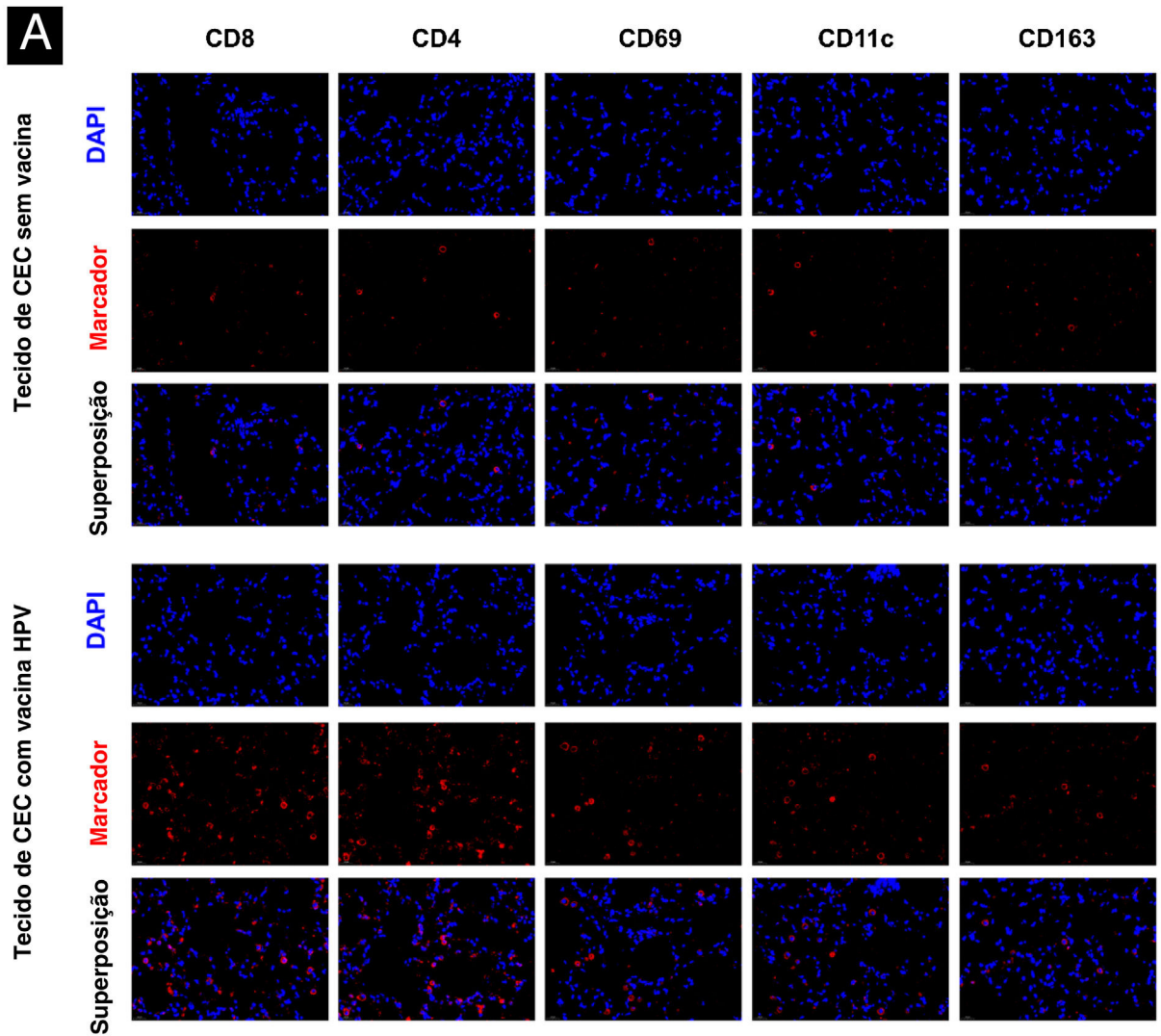


Figura 1 Diferenças no microambiente imunológico em tecidos de CECC de pacientes vacinados e não vacinados contra HPV. (A) Diferenças no microambiente imunológico (CD8, CD4, NK, DC, macrófago) em tecidos de CECC. (B) Análise estatística com uso do *software* Image J da porcentagem de células imunológicas positivas. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

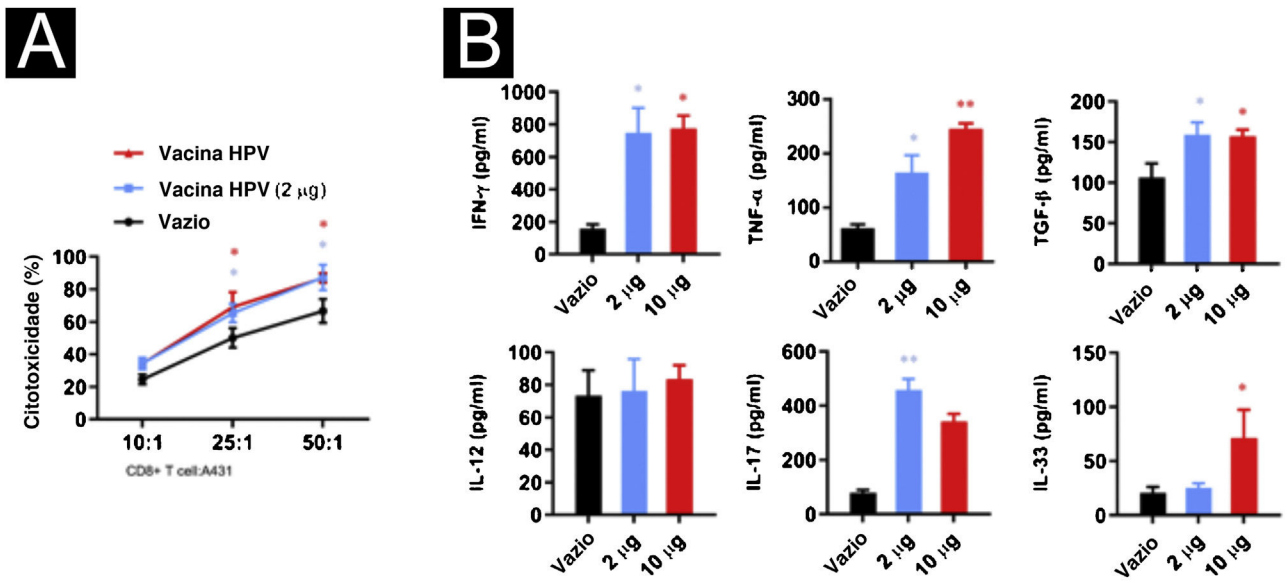


Figura 2 Efeito da vacina contra HPV na atividade das células T CD8⁺ no CECC. (A) Ensaio de morte de células T CD8⁺ em células A431. (B) Produção de fatores inflamatórios por estimulação da vacina contra HPV em células T CD8⁺. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

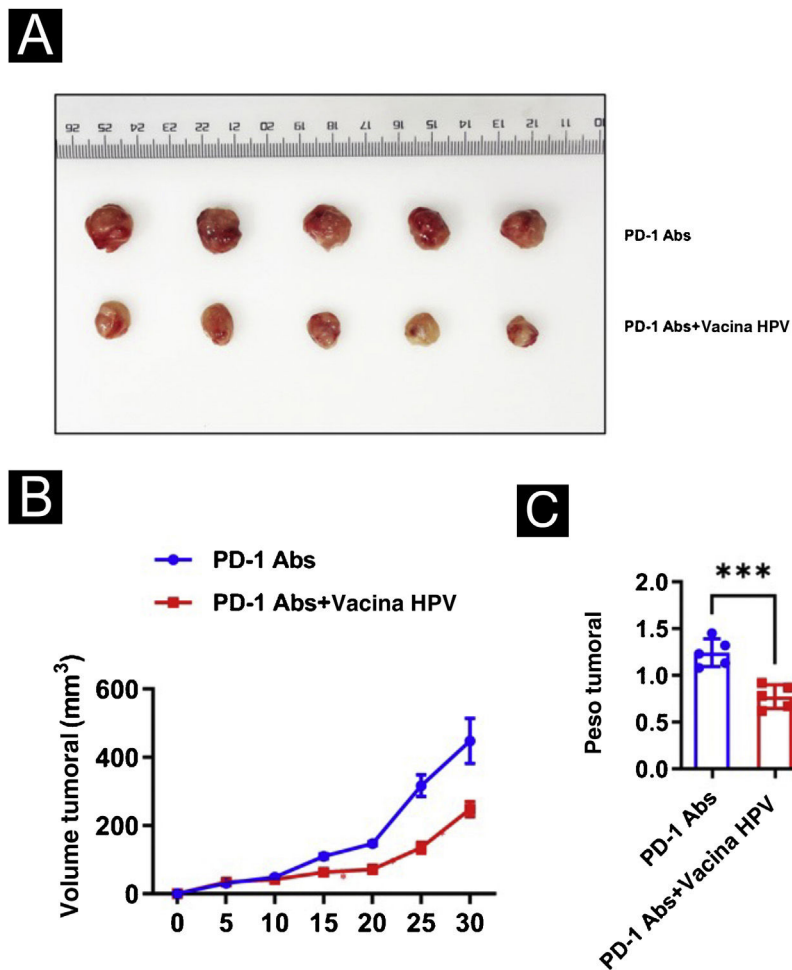


Figura 3 Impacto da vacina contra HPV combinada com anticorpo monoclonal PD-1 para CECC. (A) Imagem tumoral. (B) Alteração de volume. (C) Alteração de peso. ***p < 0.001.

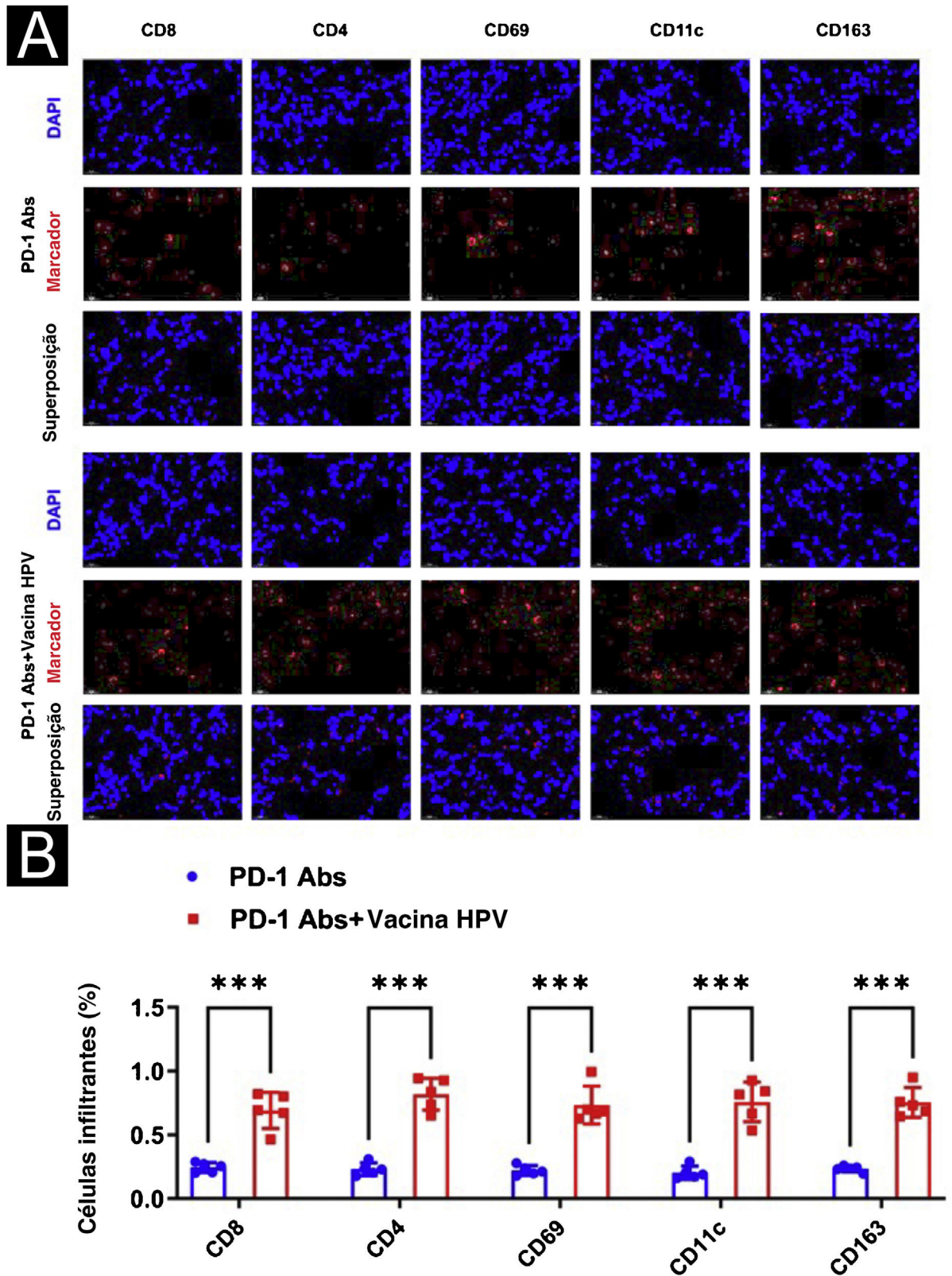


Figura 4 Efeito da vacina contra HPV combinada com anticorpo monoclonal PD-1 na imunofluorescência em camundongos. (A) Observação por imunofluorescência de diferenças no microambiente imunológico (CD8, CD4, NK, DC, macrófago). (B) Análise estatística utilizando o *software* Image J da porcentagem de células imunológicas positivas. ***p < 0,001.

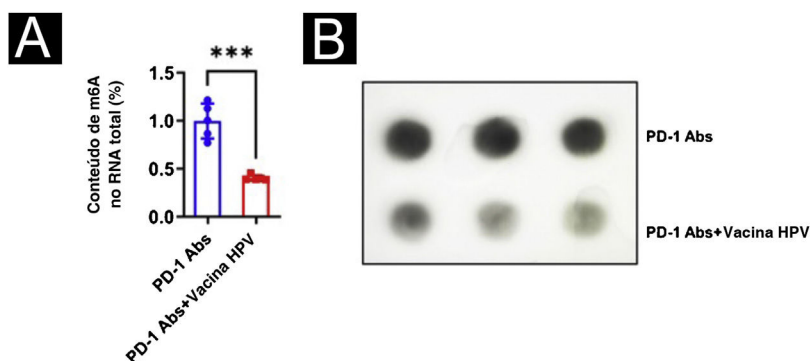


Figura 5 Expressão de mRNA e proteína m6A em tecidos tumorais. (A) Análise colorimétrica do conteúdo de m6A em tumores. (B) *Dot blot* para verificar o conteúdo de m6A em tecido tumoral. *** $p < 0,001$.

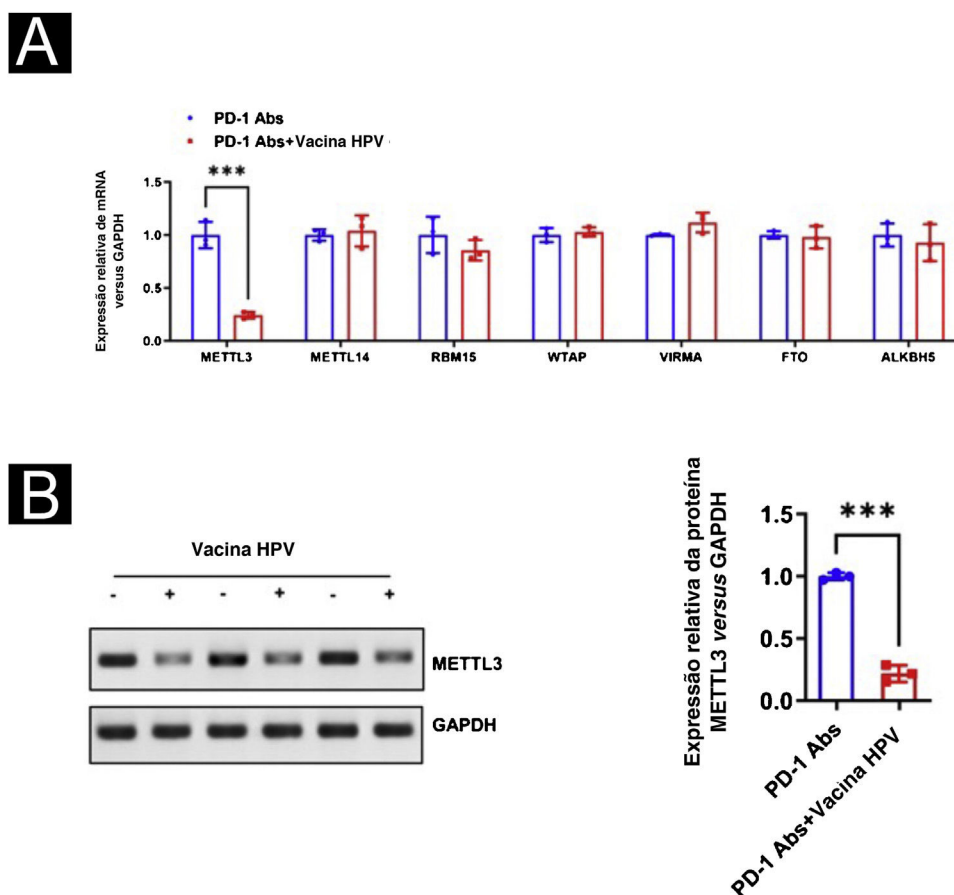


Figura 6 Seleção de alvos com expressão aberrante de m6A. (A) PCR em tempo real para rastrear a expressão de metiltransferase e desmetilase relacionadas a m6A em tecidos tumorais; (B) *Western blot* para verificar a diferença da expressão de METTL3. *** $p < 0,001$.

foi então isolado e pesado (fig. 3A). Em comparação com o grupo PD-1Abs, os tumores no grupo PD-1Abs+vacina HPV diminuíram de peso (fig. 3B) e volume (fig. 3C) no 30º dia, o que demonstrou que regressão estável foi observada nos tumores em todos os grupos. A análise dos tecidos tumorais de camundongos com imunofluorescência mostrou aumento significativo na infiltração intratumoral de CD8, CD4, NK, DC e macrófagos em camundongos que receberam anticorpo monoclonal PD-1 combinado com vacina contra o HPV (fig. 4).

A fim de observar o efeito da vacina contra HPV em m6A em tecidos tumorais, foi analisado o conteúdo de m6A em tecidos tumorais de camundongos usando método colorimétrico e *Dot blot*, e observou-se que o conteúdo de m6A no grupo de PD-1Abs+vacina contra o HPV foi significativamente menor do que no grupo PD-1Abs (fig. 5). Avaliou-se também a expressão de m6A metil-esterase e desmetilase por qPCR, e os resultados foram mostrados em 3H. METTL3 foi regulado negativamente de maneira significativa na presença da vacina contra o HPV, enquanto as diferenças

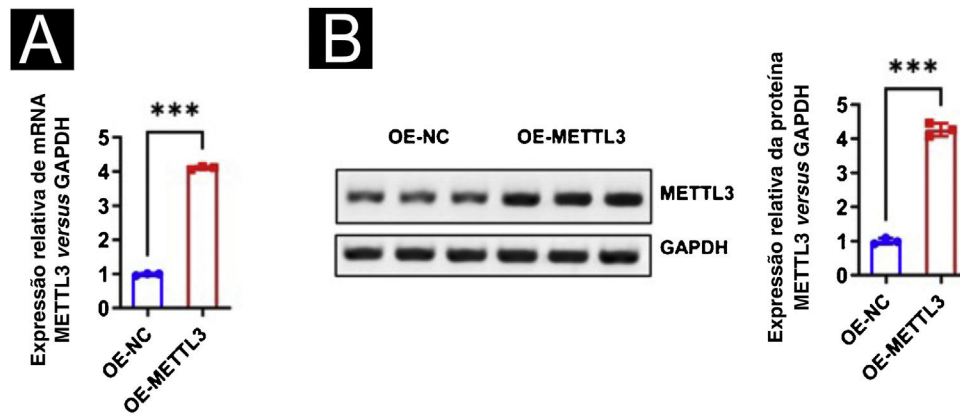


Figura 7 Identificação de superexpressão de METTL3. PCR em tempo real e *Western blot* verificaram a eficiência da superexpressão de METTL3. *** $p < 0,001$.

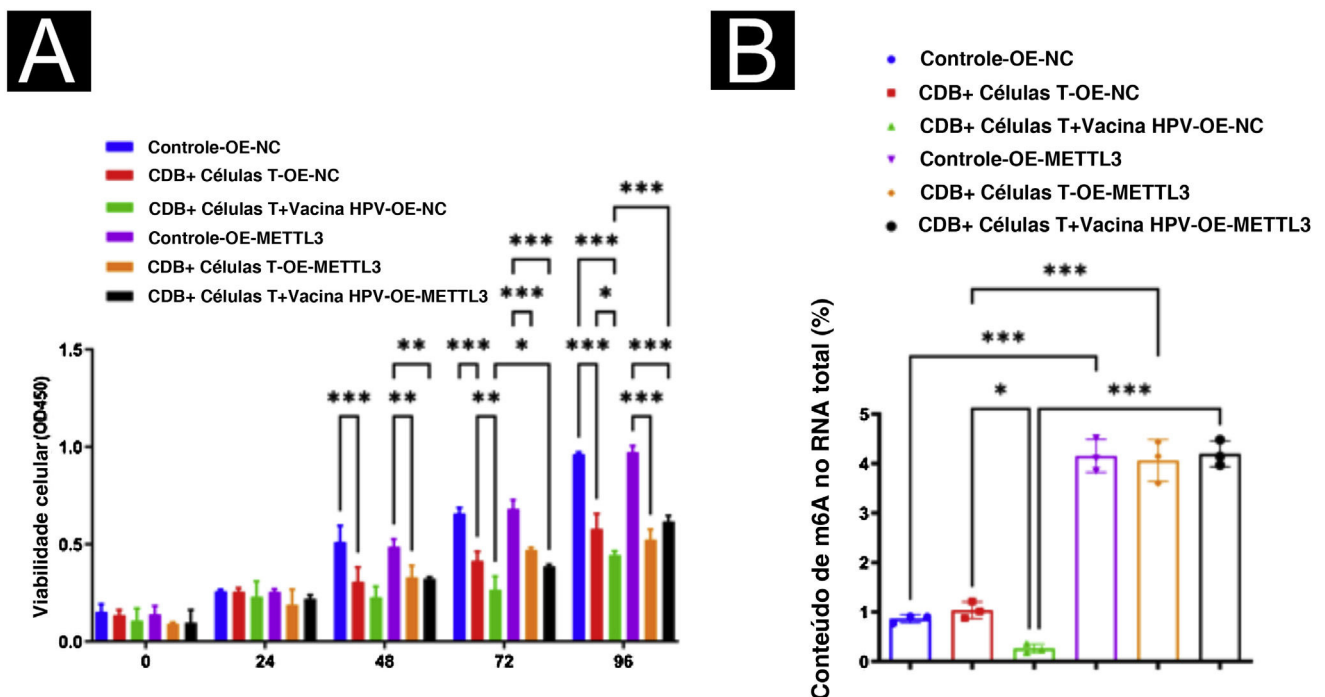


Figura 8 Mecanismos da suscetibilidade aumentada do CECC à imunoterapia, induzida pela vacina contra HPV. (A) Ensaio CCK8 revelou que a vacina contra o HPV promoveu significativamente o efeito supressor das células T CD8⁺ nas células A431, enquanto a superexpressão de METTL3 atenuou o efeito supressor do tratamento com a vacina contra o HPV nas células A431 pelas células T CD8⁺. (B) O ensaio m6A revelou que a vacina contra o HPV reduziu significativamente o conteúdo total de m6A no sistema de cocultura de células T CD8⁺ + células A431, enquanto o *knockdown* de METTL3 aboliu significativamente este efeito. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

de METTL14, RBM15, WTAP, VIRMA, FTO e ALKBH5 não foram estatisticamente significantes (fig. 6A). A regulação negativa da expressão de METTL3 ao nível de proteína no grupo PD-1Abs+vacina contra o HPV foi também verificada por *Western blot* (fig. 6B).

Vacina contra o HPV mediada por METTL3 aumenta a suscetibilidade do CECC à imunoterapia

Para estudos adicionais sobre o efeito da vacina contra HPV na expressão de METTL3 no CECC, foi realizada a

superexpressão de METTL3, e qPCR e *Western blot* foram realizados para detectar a eficiência de superexpressão nos níveis de mRNA e proteína (fig. 7). O ensaio CCK-8 revelou que não houve diferença significativa na atividade celular entre os seis grupos após 24 horas de incubação. Após 96 horas de cultura, a atividade celular foi significativamente reduzida quando cocultivada com células T CD8⁺ e células A431 em comparação com o grupo controle, com maior redução na atividade das células A431 após a adição da vacina contra HPV, com diferenças estatísticas em todos os grupos. Após a superexpressão de METTL3, demonstrou-se o efeito inibitório das células T CD8⁺ e da vacina contra o

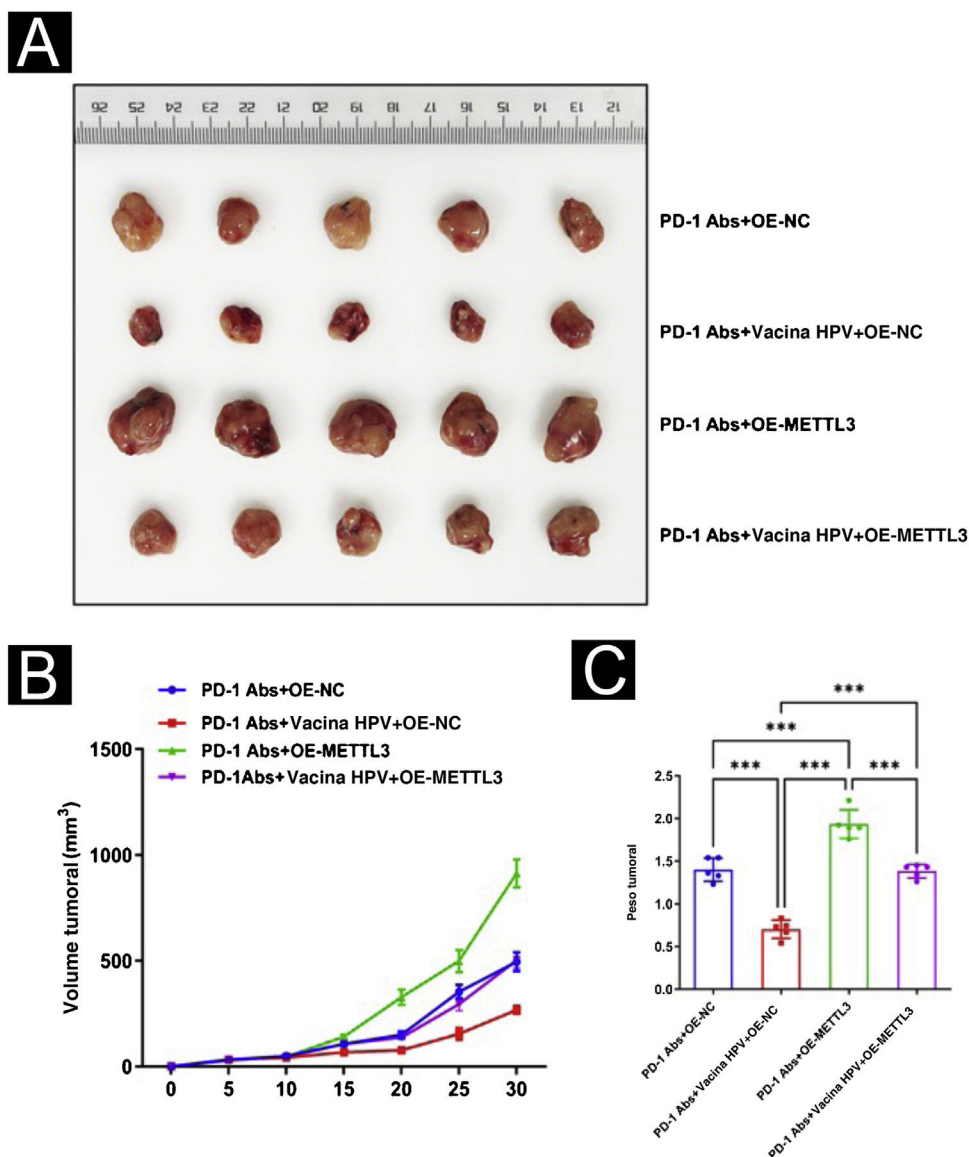


Figura 9 Validação em modelo animal da superexpressão de METTL3 abolindo a vacina contra o HPV para aumentar a sensibilidade de camundongos com CECC tratados com anticorpo monoclonal PD-1. (A) Imagem tumoral. (B) Alteração de volume. (C) Alteração de peso. *** $p < 0,001$.

HPV na atividade das células A431, e a atividade das células A431 foi significativamente maior no grupo de células T CD8⁺ + vacina contra HPV-OE-METTL3 do que no grupo células T CD8⁺ + vacina contra o HPV-OE-NC (fig. 8A). Além disso, m6A foi avaliado em cada grupo e observou-se que a vacina contra o HPV reduziu significativamente o conteúdo total de m6A no sistema de cocultura, enquanto a superexpressão de METTL3 aboliu significativamente esse efeito. Curiosamente, o conteúdo de m6A no grupo de células T CD8⁺ + vacina contra HPV-OE-NC não foi estatisticamente diferente de modo significativo do grupo Controle-OE-NC, enquanto o conteúdo de m6A no grupo de células T CD8⁺-OE-NC foi elevado em comparação com o grupo Controle-OE-NC, embora sem diferença estatística (fig. 8B).

Superexpressão de METTL3 elimina a inibição da vacina contra o HPV no CECC in vivo

Para avaliação adicional do efeito de METTL3 na vacina contra o HPV no CECC, foram realizadas experiências de xenoinxerto de tumor. Os modelos de camundongos com CECC foram divididos em quatro grupos de cinco camundongos cada e foi administrado tratamento com PD-1Abs + OE-NC, PD-1Abs + vacina contra o HPV + OE-NC, PD-1Abs + OE-METTL3 e PD-1Abs + vacina contra o HPV + OE-METTL3, respectivamente. Na combinação do anticorpo anti-PD-1 com a vacina contra o HPV, o volume e o peso do tumor foram significativamente reduzidos, e o cotratamento com a vacina contra o HPV e o anticorpo anti-PD-1 de

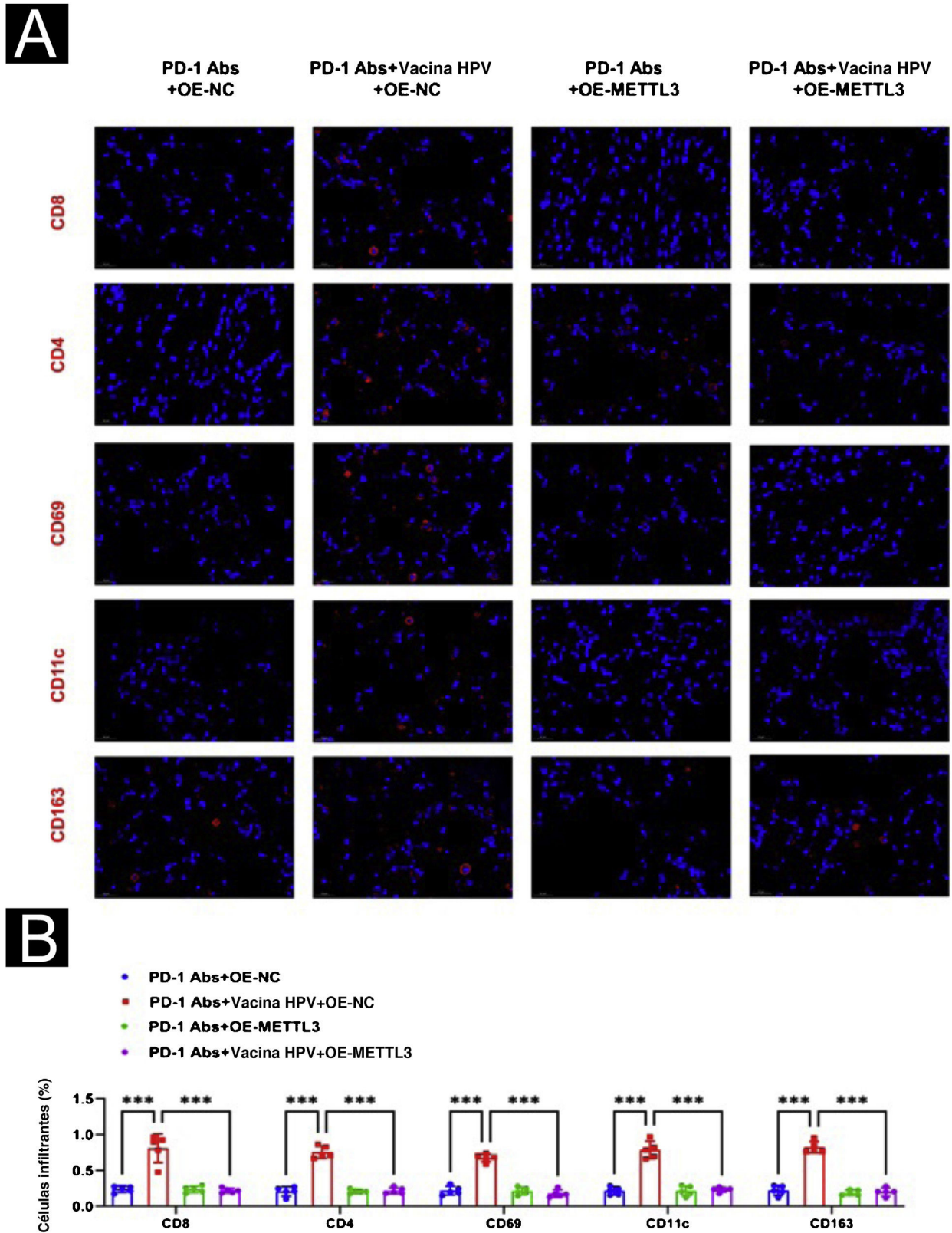


Figura 10 Efeito da superexpressão de METTL3 na terapia combinada avaliado na imunofluorescência. (A) Observação por imunofluorescência de diferenças no microambiente imunológico (CD8, CD4, NK, DC, macrófago). (B) Análise estatística com o *software* Image J da proporção de células imunes positivas.***p < 0,001.

camundongo resultou na inibição completa do crescimento do tumor, enquanto o efeito inibitório do anticorpo anti-PD-1 no volume e peso do tumor foi atenuado após superexpressão de METTL3 (fig. 9). Histologicamente, verificou-se que o grupo PD-1Abs + vacina contra HPV + OE-NC apresentou infiltrados intratumorais significativamente maiores de CD8, CD4, NK, DC e macrófagos do que os outros grupos (fig. 10).

Discussão

A imunossupressão se manifesta principalmente pela capacidade proliferativa diminuída ou ausente dos linfócitos T e pela produção disfuncional de citocinas.^{26,27} As células T CD8⁺ são células imunológicas que podem reconhecer e matar células cancerígenas, sendo consideradas células com potencial de erradicação tumoral.²⁸ O presente estudo descobriu que a vacina contra o HPV aumentou os efeitos tóxicos das células T CD8⁺ no CECC. As células T CD8⁺ são produtoras de múltiplas citocinas, e a vacina contra o HPV resultou no aumento da produção de IFN- γ , TNF- α , TGF- β , IL-17 e IL-33 pelas células T CD8⁺. Yunyan Sun concluiu que ambas as vacinas cervicovaginais com TA-HPV poderiam induzir forte resposta imune local de células T CD8⁺ antígeno-específicas para o HPV-16E7.²⁹ Os presentes resultados sugerem que após a vacinação contra o HPV em humanos, o corpo produz certa resposta imune específica de células T juntamente com a resposta antígeno-anticorpo, e as citocinas resultantes atuam na supressão de células do carcinoma espinocelular cutâneo, sugerindo que a vacina contra o HPV possa ser útil na estimulação da resposta imune antitumoral.

As enzimas modificadoras de RNA são cruciais para a sobrevivência do tumor à imunoterapia, e as modificações do m6A desempenham papéis oncogênicos em muitos tipos de câncer.³⁰ Os resultados do presente estudo mostraram que a superexpressão de METTL3 em células de CECC aumentou o nível de modificação de m6A em células de CECC, o que confirma o estudo de Rengpeng Zhou, adicionalmente,³¹ indicando que METTL3 manteve a modificação de m6A em células tumorais e promoveu a atividade proliferativa das células neoplásicas no CECC. Portanto, conclui-se que a vacina contra o HPV inibe o desenvolvimento do CEC ao regular negativamente METTL3, provavelmente porque a regulação negativa da expressão de METTL3 aumenta a sensibilidade das células tumorais às citocinas. Lingling Wang sugeriu que o alto *status* de expressão de METTL3 estava negativamente correlacionado com a infiltração de células imunes tumorais.³² De maneira similar, os resultados mostraram que as células infiltrantes imunes em tecidos de CECC estavam significativamente reduzidas após a superexpressão de METTL3 no modelo animal deste estudo.

METTL3 pode ser alvo potencial para tratamento clínico de CECC.³³ Eliza Yankova demonstrou que um inibidor de METTL3 (STM2457) inibe os efeitos carcinogênicos causados pela superexpressão da enzima METTL3 em experimentos celulares *in vitro* e *in vivo* em animais.³⁴ Lingling Wang demonstrou que a depleção das metiltransferases METTL3 e METTL14 melhorou a resposta ao tratamento com anti-PD-1 no câncer colorretal e no melanoma.³² A superexpressão de METTL3 seguida de tratamento com anticorpos monoclonais PD-1 não mostrou tendência significativa de regressão

tumoral no presente estudo, enquanto a vacina contra o HPV tem potencial para atuar como inibidor de METTL3, e a combinação com anticorpos monoclonais PD-1 para CECC desempenhou papel sinérgico para desacelerar ainda mais o crescimento do tumor.

Há urgente necessidade de descobrir alvos precisos e eficazes para as abordagens terapêuticas atuais no CECC. A principal descoberta deste estudo foi que o tratamento do CEC com vacina contra o HPV está correlacionado com a expressão de METTL3 e também inibiu a formação de microambiente tumoral imunossupressor. Existem certas deficiências neste estudo: o número de amostras clínicas é pequeno, e pode ser necessário coletar amostras suficientes para estudos futuros, enquanto o uso adicional do sequenciamento de m6A e sequenciamento do transcriptoma podem ser necessários para explorar profundamente os mecanismos regulatórios moleculares do tratamento com vacina contra o HPV mediado por METTL3 para CECC. Em conclusão, os resultados do presente estudo sugerem que METTL3, que pode ser regulado negativamente pelas vacinas contra o HPV, é alvo promissor para o tratamento de CECC.

Conclusões

A vacina contra o HPV aumenta a sensibilidade ao tratamento com anti-PD-1 ao regular negativamente METTL3 no CECC. A combinação da vacina contra o HPV e do tratamento com anticorpos monoclonais PD-1 produz aumento da infiltração de células imunológicas, resultando em melhor controle do tumor e promovendo sua eliminação. No geral, este estudo fornece informação de referência para a exploração e pesquisa aprofundadas da vacina contra o HPV. Em estudos futuros, a investigação sobre os mecanismos de ação do METTL3 deverá ser aprofundada.

Suporte financeiro

Nenhum.

Contribuição dos autores

Yingjie Zhang: Concepção e planejamento do estudo; obtenção de dados, ou análise e interpretação dos dados; redação do manuscrito; obtenção, análise e interpretação dos dados.

Yiru Wang: Obtenção dos dados, ou análise e interpretação dos dados; obtenção, análise e interpretação dos dados.

Shuping Guo: Análise estatística; obtenção, análise e interpretação dos dados; participação efetiva na orientação da pesquisa.

Hongzhou Cui: Revisão crítica de conteúdo intelectual importante; participação efetiva na orientação da pesquisa; revisão crítica da literatura; aprovação da versão final do manuscrito.

Conflito de interesses

Nenhum.

Agradecimentos

Este trabalho recebeu apoio do First Hospital of Shanxi Medical.

Referências

- Global Burden of Disease Cancer Collaboration Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the Global burden of disease study. *JAMA Oncol.* 2017;3:524–48.
- Hedberg ML, Berry CT, Moshiri AS, Xiang Y, Yeh CJ, Attilasoy C, et al. Molecular mechanisms of cutaneous squamous cell carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2022;23:3478.
- Saraiya M, Unger ER, Thompson TD, Lynch CF, Hernandez BY, Lyu CW, et al. US assessment of HPV types in cancers: implications for current and 9-valent HPV vaccines. *J Natl Cancer Inst.* 2015;107:djv086.
- Li YJ, Qing X, Tao QX, Xiang L, Gong L, Zhou TJ. Vasculogenic Mimicry formation is associated with erythropoietin expression but not with Erythropoietin receptor expression in cervical squamous cell carcinoma. *Biomed Res Int.* 2019;2019:1934195.
- Peng S, Tan M, Li YD, Cheng MA, Farmer E, Ferrall L, et al. PD-1 blockade synergizes with intratumoral vaccination of a therapeutic HPV protein vaccine and elicits regression of tumor in a preclinical model. *Cancer Immunol Immunother.* 2021;70:1049–62.
- Rositch AF, Koshiol J, Hudgens MG, Razzaghi H, Backes DM, Pimenta JM, et al. Patterns of persistent genital human papillomavirus infection among women worldwide: a literature review and meta-analysis. *Int J Cancer.* 2013;133:1271–85.
- Stratigos A, Garbe C, Lebbe C, Malvehy J, del Marmol V, Pehamberger H, et al. Diagnosis and treatment of invasive squamous cell carcinoma of the skin: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur J Cancer.* 2015;51:1989–2007.
- Nichols AJ, Allen AH, Shareef S, Badiavas EV, Kirsner RS, Ioannides T. Association of human Papillomavirus vaccine with the development of keratinocyte carcinomas. *JAMA Dermatol.* 2017;153:571–4.
- Nichols AJ, Gonzalez A, Clark ES, Khan WN, Rosen AC, Guzman W, et al. Combined systemic and intratumoral administration of human papillomavirus vaccine to treat multiple cutaneous basaloid squamous cell carcinomas. *JAMA Dermatol.* 2018;154:927–30.
- Li K, Zhang A, Li X, Zhang H, Zhao L. Advances in clinical immunotherapy for gastric cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2021;1876:188615.
- Zheng Y, Fang YC, Li J. PD-L1 expression levels on tumor cells affect their immunosuppressive activity. *Oncol Lett.* 2019;18:5399–407.
- Karim R, Jordanova ES, Piersma SJ, Kenter GG, Chen L, Boer JM, et al. Tumor-expressed B7-H1 and B7-DC in relation to PD-1 + T-cell infiltration and survival of patients with cervical carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2009;15:6341–7.
- Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2012;12:252–64.
- Rice AE, Latchman YE, Balint JP, Lee JH, Gabitzsch ES, Jones FR. An HPV-E6/E7 immunotherapy plus PD-1 checkpoint inhibition results in tumor regression and reduction in PD-L1 expression. *Cancer Gene Ther.* 2015;22:454–62.
- Lee HH, Hong SH, Rhee JH, Lee SE. Optimal long peptide for flagellin-adjuvanted HPV E7 cancer vaccine to enhance tumor suppression in combination with anti-PD-1. *Transl Cancer Res.* 2022;11:1595–602.
- Chen XY, Zhang J, Zhu JS. The role of m(6)A RNA methylation in human cancer. *Mol Cancer.* 2019;18:103.
- Shi H, Wei J, He C. Where, when, and how: context-dependent functions of RNA methylation writers, readers, and erasers. *Mol Cell.* 2019;74:640–50.
- Roundtree IA, Evans ME, Pan T, He C. Dynamic RNA Modifications in Gene Expression Regulation. *Cell.* 2017;169:1187–200.
- He L, Li H, Wu A, Peng Y, Shu G, Yin G. Functions of N6-methyladenosine and its role in cancer. *Mol Cancer.* 2019;18:176.
- Frye M, Harada BT, Behm M, He C. RNA modifications modulate gene expression during development. *Science.* 2018;361:1346–9.
- Yi L, Wu G, Guo L, Zou X, Huang P. Comprehensive analysis of the PD-L1 and immune infiltrates of m(6)A RNA methylation regulators in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2020;21:299–314.
- In GK, Vaidya P, Filkins A, Hermel DJ, King KG, Ragab O, et al. PD-1 inhibition therapy for advanced cutaneous squamous cell carcinoma: a retrospective analysis from the University of Southern California. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2021;147:1803–11.
- Maubec E, Boubaya M, Petrow P, Beylot-Barry M, Basset-Seguin N, Deschamps L, et al. Phase II study of pembrolizumab as first-line, single-drug therapy for patients with unresectable cutaneous squamous cell carcinomas. *J Clin Oncol.* 2020;38:3051–61.
- Migden MR, Rischin D, Schmults CD, Guminski A, Hauschild A, Lewis KD, et al. PD-1 blockade with cemiplimab in advanced cutaneous squamous-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 2018;379:341–51.
- Salzmann M, Leiter U, Loquai C, Zimmer L, Ugurel S, Gutzmer R, et al. Programmed cell death protein 1 inhibitors in advanced cutaneous squamous cell carcinoma: real-world data of a retrospective, multicenter study. *Eur J Cancer.* 2020;138:125–32.
- Verdon DJ, Mulazzani M, Jenkins MR. Cellular and molecular mechanisms of CD8(+) T cell differentiation, dysfunction and exhaustion. *Int J Mol Sci.* 2020;21:7357.
- Marcovecchio PM, Thomas G, Salek-Ardakani S. CXCL9-expressing tumor-associated macrophages: new players in the fight against cancer. *J Immunother Cancer.* 2021;9:e002045.
- Farhood B, Najafi M, Mortezaee K. CD8(+) cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: a review. *J Cell Physiol.* 2019;234:8509–21.
- Sun YY, Peng S, Han L, Qiu J, Song L, Tsai Y, et al., Local HPV recombinant vaccinia boost following priming with an HPV DNA vaccine enhances local HPV-specific CD8+T-cell-mediated tumor control in the genital tract. *Clin Cancer Res.* 2016;22:657–69.
- Liu J, Harada BT, He C. Regulation of gene expression by N(6)-methyladenosine in cancer. *Trends Cell Biol.* 2019;29:487–99.
- Zhou R, Gao Y, Lv D, Wang C, Wang D, Li Q. METTL3 mediated m(6)A modification plays an oncogenic role in cutaneous squamous cell carcinoma by regulating DeltaNp63. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;515:310–7.
- Wang L, Hui H, Agrawal K, Kang Y, Li N, Tang R, et al. m(6)A RNA methyltransferases METTL3/14 regulate immune responses to anti-PD-1 therapy. *EMBO J.* 2020;39:e104514.
- Martin A, Epifano C, Vilaplana-Marti B, Hernandez I, Macias RIR, Martinez-Ramirez A, et al. Mitochondrial RNA methyltransferase TRMT61B is a new, potential biomarker and therapeutic target for highly aneuploid cancers. *Cell Death Differ.* 2022;30:37–53.
- Yankova E, Blackaby W, Albertella M, Rak J, De Braekeleer E, Tsagkogeorga G, et al. Small-molecule inhibition of METTL3 as a strategy against myeloid leukaemia. *Nature.* 2021;593:597–601.