

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

Chairini Cássia Thomé

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL PROGNÓSTICO DE RECEPTORES
METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO EM GLIOBLASTOMA**

Porto Alegre

2019

Chairini Cássia Thomé

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL PROGNÓSTICO DE RECEPTORES
METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO EM GLIOBLASTOMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestra em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Losch de Oliveira

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Thomé, Chairini Cássia
INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL PROGNÓSTICO DE RECEPTORES
METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO EM GLIOBLASTOMA / Chairini
Cássia Thomé. -- 2019.
70 f.
Orientador: Diogo Losch de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Glioblastoma. 2. Receptores Metabotrópicos de
Glutamato. 3. MGMT. 4. Marcadores Prognósticos. I.
Losch de Oliveira, Diogo, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Eu dedico esta dissertação em forma de agradecimento aos seguintes:

À minha mãe, Luci, e o meu pai, Volmir, por todo o amor, apoio financeiro, apoio emocional, paciência, e por acreditarem em mim sempre. Muito obrigada, amo vocês!

Aos meus avôs, Aracy, Ermílio e Olinda, por terem me criado como se eu fosse filha de vocês, me ensinado a importância da humildade, respeito, ética e caráter. Muito obrigada, amo vocês!

À minha família, por terem compreensão nos momentos em que estive ausente e por sempre confiarem em mim e no meu potencial. Muito obrigada, amo vocês!

Ao meu orientador, Prof. Diogo Losch de Oliveira, por ter me orientado e ensinado ao longo desses anos o que é ciência e estimulado a desenvolver pensamento crítico. Você foi fundamental no meu desenvolvimento profissional. Muito obrigada!

À Mery, minha eterna mamãe científica, por ter me ensinado a viver em laboratório e tudo o que há de importante na vida acadêmica. Obrigada pela correção e dicas na dissertação, tua opinião é sempre muito importante para mim. Além da excelente parceria profissional, você tem sido uma grande amiga por todos esses anos. Muito obrigada, amo você!

Ao Marco Antônio, por ter realizado todas as análises de bioinformática da minha dissertação. Sem você, eu não teria feito esse trabalho. Obrigada pela parceria profissional e pelas discussões filosóficas durante os almoços no RU. Muito obrigada!

Aos meus ICs, Eduarda e Crepin, por terem me ensinado tanto sobre ser paciente, não julgar, ser clara, objetiva e confiar minhas coisas aos outros. Ensinar vocês foi um grande aprendizado para mim. Muito obrigada!

Aos meus colegas (e amigos) do laboratório 24D e 24F (Maria, Patrícia, Daiane, Henrique, Lucimara, Luana, Thainá, Giovana, Suelen, Camila, Kamila, Alberto, Ivi, Lúcia, Liana, Diego, Emerson, Fábio, Cássio, Bem Hur) por todos os momentos de trabalho em grupo, diversão, companheirismo, motivação, tristeza coletiva e comemorações. A amizade de todos vocês é muito importante para mim e foi fundamental nos últimos 8 anos que estive no laboratório 24. Muito obrigada, amo vocês!

Aos meus amigos, principalmente à Carol, Juliana, Eduarda, Giovana, Bruno, Cem e Júlio, por todo o apoio, paciência, motivação, confiança e amizade. Muito obrigada, amo vocês!

Aos Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica e UFRGS, por toda a estrutura, suporte educacional e técnico. Muito obrigada!

Aos órgãos de fomento, CNPq e CAPES, pelo suporte financeiro e educacional. Muito obrigada!

“We must not forget that when radium was discovered no one knew that it would prove useful in hospitals. The work was one of pure science. And this is a proof that scientific work must not be considered from the point of view of the direct usefulness of it. It must be done for itself, for the beauty of science, and then there is always the chance that a scientific discovery may become like the radium a benefit for humanity. “

— Marie Curie Lecture at Vassar College, Poughkeepsie, New York (14 May 1921)

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| PARTE I..... | 6 |
| RESUMO | 7 |
| ABSTRACT | 8 |
| LISTA DE ABREVIACOES | 9 |
| INTRODUÇÃO..... | 10 |
| 1. Glioblastoma | 10 |
| 2. Marcadores Moleculares em GBM | 12 |
| 3. Heterogeneidade GBM..... | 16 |
| 4. Sistema Glutamatrgico | 17 |
| 5. Sistema Glutamatrgico em GBM | 17 |
| 6. mGluR em câncer | 18 |
| OBJETIVOS | 23 |
| 1. Objetivos gerais..... | 23 |
| 2. Objetivos específicos..... | 23 |
| PARTE II..... | 24 |
| CAPÍTULO I..... | 25 |
| PARTE III | 57 |
| DISCUSSÃO | 58 |
| CONCLUSOES E PERSPECTIVAS | 62 |
| REFERÊNCIAS | 63 |

PARTE I

RESUMO

O Glioblastoma (GBM) é um tumor infiltrativo muito recorrente, sendo o tumor cerebral maligno mais comum e agressivo. O tratamento padrão consiste de ressecção cirúrgica tumoral, seguida de radioterapia e quimioterapia com temozolomida (TMZ). A metilação do promotor da O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferase (*MGMT*) é um biomarcador preditivo para o tratamento de GBM com TMZ. Entretanto, tumores altamente heterogêneos, como o GBM, nem sempre se beneficiam de biomarcadores já estabelecidos, necessitando de novos alvos para um melhor prognóstico da doença. Receptores de glutamato metabotrópicos (mGluR) já foram descritos pelo seu envolvimento no crescimento tumoral e sua expressão aberrante já foi associada a tumores malignos. Em GBM, somente a expressão do mGluR3 foi investigada e associada a um pior prognóstico para os pacientes. Devido a insuficientes informações sobre o envolvimento dos mGluRs em GBM, neste trabalho nós avaliamos a relação entre os níveis de expressão gênica dos 8 subtipos de mGluR (*GRM1-8*) e o desfecho dos pacientes com GBM, levando também em consideração a expressão gênica de *MGMT*. Dados clínicos e de transcriptômica de 219 e 108 pacientes com GBM foram obtidos do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) e no *Chinese Glioma Genome Atlas* (CGGA), respectivamente. Os pacientes foram categorizados de acordo com o nível de expressão dos *GRM* e *MGMT* em dois grupos: baixa e alta expressão (valores $\leq 50\%$ e $> 50\%$ da expressão mediana, respectivamente). Nós usamos a regressão de riscos proporcionais de Cox e análise de sobrevivência de Kaplan-Meier (KM) seguida do teste de log-rank para avaliar a relação entre a expressão gênica e a sobrevivência global (OS) e a sobrevivência livre de doença (PFS). Na análise multivariada de Cox, o risco relativo foi ajustado para covariáveis clínicas como idade, gênero, *Karnofsky Performance Score* e raça. Em relação à expressão gênica do *MGMT*, a análise de KM indicou que pacientes do TCGA com alta expressão tumoral do gene apresentaram uma menor OS ($p < 0,0001$) e PFS ($p = 0,045$) quando comparados a pacientes com baixa expressão. Já a análise multivariada de Cox indicou que a expressão de *MGMT* está associada a um menor PFS (HR: 1,35; 95% IC: 1,02–1,78; $p = 0,036$) e OS (TCGA: HR: 1,87; 95% IC: 1,38–2,55; $p = 0,00006$ – CGGA: HR: 1,54; 95% IC: 1,01–2,36; $p = 0,045$) em ambas as coortes. Isoladamente ou em tumores com alta e baixa expressão de *MGMT*, a análise de KM indicou que os *GRM* não apresentam nenhuma influência significativa na sobrevivência dos pacientes. Entretanto, os resultados da análise multivariada de Cox indicaram que, em pacientes do TCGA, a expressão do *GRM8* em tumores com baixa expressão de *MGMT* está associado a uma longa OS (HR: 0,61; 95% IC: 0,39–0,97; $p = 0,035$), enquanto que a expressão do *GRM4* em tumores com alta expressão de *MGMT* está associado a uma curta OS (HR: 1,70; 95% IC: 1,12–2,58; $p = 0,012$). Por outro lado, nos pacientes do CGGA, a expressão de *GRM1* em tumores com baixa expressão de *MGMT* está associada a uma longa OS (HR: 0,73; 95% IC: 0,53–0,99; $p = 0,043$). Dessa forma, podemos concluir que os subtipos 1, 4 e 8 dos *GRM* estão associados com o desfecho dos pacientes, mas os resultados dependem do nível de expressão do *MGMT* e variam conforme a coorte analisada. O *GRM4* está associado a um prognóstico ruim, enquanto que o *GRM1* e 8 estão associados a um bom prognóstico em grupos de pacientes cujos tumores possuem alta e baixa expressão do *MGMT*, respectivamente. Além disso, nossos resultados também mostraram que a expressão gênica do *MGMT* é um fator prognóstico independente para OS e PFS em pacientes com GBM, visto que altos níveis de *MGMT* estão associados a um pior desfecho.

ABSTRACT

Glioblastoma (GBM) is an infiltrative highly-recurrent tumor, being the malignant brain tumor most common and aggressive. Standard treatment for GBM consist of tumor surgical resection, followed by radiotherapy and chemotherapy with temozolomide (TMZ). O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase (*MGMT*) promoter-methylation is a predictive biomarker for GBM treatment with TMZ. However, highly heterogenic tumors, such as GBM, does not always benefit from stablished biomarkers and require new targets for a better disease's prognostic. Metabotropic glutamate receptors (mGluRs) have already been described for their involvement in tumor growth and their aberrant expression has been associated with tumor malignancy. In GBM, only the expression of mGluR3 was investigated and associated with patient outcome. Due to insufficient information regarding the involvement of mGluRs in GBM, in this work we evaluate the relationship between gene-expression levels of mGluRs subtypes 1 to 8 (*GRM1-8*) and outcome of GBM patients, considering the gene-expression of *MGMT*. Clinical and gene-expression data from 219 and 108 GBM-patients were retrieved from *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) and *Chinese Glioma Genome Atlas* (CGGA), respectively. Patients were categorized according to the expression level of *GRMs* and *MGMT* in two groups: low- and high-expression (values <50% and >50% median expression level, respectively). We used Cox proportional hazards regression and Kaplan-Meier (KM) log-rank survival analyses to evaluate the relationship between gene-expression and overall survival (OS) and progression-free survival (PFS). In the multivariate Cox analysis, relative risk was adjusted for clinical covariates such as age, gender, *Karnofsky Performance Score* and race. In relation to *MGMT* gene-expression, KM analysis indicated that TCGA patients with high expression of *MGMT* have a shorter OS (p<0.0001) and PFS (p=0.045) when compared to patients with low *MGMT*-expression. Multivariate Cox analysis indicated that expression of *MGMT* was associated with a shorter PFS (HR: 1.35; 95% CI: 1.02 – 1.78; p=0.036) and OS in both cohorts (TCGA: HR:1.87; 95% CI: 1.38-2.55; p=0.00006 – CGGA: HR:1.54; 95% CI: 1.01-2.36; p=0.045). Alone or in tumors with high-/low-expression of *MGMT*, KM analysis showed that all *GRM* have no significant influence on patient survival. However, multivariate Cox results indicated that in TCGA patients, *GRM8* expression in tumors with low-expression of *MGMT* was associated with longer OS (HR: 0.61; 95% CI: 0.39-0.97; p= 0.035), while *GRM4* expression in tumors with high-expression of *MGMT* was associated with a shorter OS (HR: 1.70; 95% CI: 1.12-2.58; p= 0.012). On the other hand, in CGGA patients, *GRM1* expression in tumors with low-expression of *MGMT* was associated with longer OS (HR: 0.73; 95% CI: 0.53-0.99; p= 0.043). Therefore, we can conclude that subtypes 1, 4 and 8 of *GRM* are associated with patient outcome, but the results depend on *MGMT* expression levels and they vary according to the cohort analyzed. *GRM4* was associated with a poor prognosis, while *GRM1* and 8 were associated with a good prognosis in group of patients with tumors expressing high and low *MGMT* levels, respectively. Besides, our results also showed that gene-expression of *MGMT* is an independent prognostic factor for OS and PFS in patients with GBM, and high-levels of *MGMT* are associated with a poor outcome.

LISTA DE ABREVIACOES

AC: adenilato ciclase

AKT: proteína quinase B

AMPA: a-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato

CDKN2A: inibidor 2A da ciclina dependente de quinase

CGGA: Chinese Glioma Genomic Atlas

CHI3L1: proteína 1 da quitinase tipo 3

DAG: diacilglicerol

EAAT1 e 2: transportador de amino ácido excitatório

EGFR: receptor do fator de crescimento epidermal

GBM: glioblastoma

Glu: glutamato

mTORC1 e 2: alvo da rapamicina em mamíferos 1 e 2

NF1: neurofibromatose-1

NFκ-B: fator nuclear kappa B

NMDA: N-metil-D-aspartato

NOS: not otherwise specified

OS: sobrevivência geral

PDGFRA: receptor A do fator de crescimento derivado de plaquetas

PFS: sobrevivência livre de progressão

PI3K: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato 3-quinase

PIK3CA: subunidade alfa catalítica da fosfatidilinositol 3-quinase

PIK3R1: subunidade 1 regulatória da fosfatidilinositol 3-quinase

IDH: isocitrato desidrogenase

IDH1: isocitrato desidrogenase 1

iGluR: receptor de glutamato ionotrópicos

IP3: inositol-(1,4,5)-trifosfato

KPS: status de performance de Karnofsky

MAPK: proteína quinase ativada por mitógenos

MET: receptor do fator de crescimento de hepatócitos

met-pMGMT: metilao no promotor do *MGMT*

mGluR: receptor de glutamato metabotrópico

MGMT: O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferase

PIP2: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PKC: proteína quinase C

PLC: fosfolipase C

PTEN: proteína tensina

SNC: sistema nervoso central

TCGA: The Cancer Genome Atlas

TMZ: Temozolomida

TP53: proteína tumoral 53

un-pMGMT: promotor do *MGMT* não-metilado

INTRODUÇÃO

1. Glioblastoma

O glioblastoma (GBM) é um glioma primário maligno que ocorre no sistema nervoso central (SNC). Nos EUA, ele corresponde a 14,7% de todos os tumores do SNC e a 47,7% dos tumores cerebrais malignos primários, sendo a terceira classificação histológica mais frequente do SNC e o tumor maligno mais comum (OSTROM et al., 2018). Com uma incidência anual que varia entre 3,2-3,9 a cada 100.000 habitantes, é projetado que sejam diagnosticados 13.310 novos casos de GBM em 2019. Esses números pioram quando considerada a estimativa de sobrevivência relativa: somente 5,6% dos pacientes com GBM sobrevivem até 5 anos após o diagnóstico (GRAMATZKI et al., 2016; OSTROM et al., 2018).

O GBM é muito mais comum em adultos e o aumento da sua incidência é idade-dependente. As taxas de incidência anuais médias ajustadas por idade do tumor são 0,17 para crianças (0-14 anos), 0,53 para adolescentes e jovens adultos (15-39 anos) e 6,93 para adultos (>40 anos), sendo que as maiores taxas são encontradas em indivíduos com idade entre 75 e 84 anos (taxa de 15,03). Dessa forma, o GBM é geralmente diagnosticado em pacientes com idade mais avançada (mediana de idade de 65 anos) (OSTROM et al., 2018). Ao contrário da incidência, a taxa de sobrevivência diminui conforme aumenta a idade. Quase 20% dos pacientes com idade entre 20 e 44 anos sobrevivem até cinco anos após o diagnóstico, enquanto somente 2,6% dos pacientes com mais de 75 anos sobrevivem até o mesmo período (OSTROM et al., 2018). Esse tipo de neoplasia é mais comum em homens (1,58 a 1,64 vezes) e é aproximadamente 2 vezes mais comum entre caucasianos quando comparado a negros (GRAMATZKI et al., 2016; OSTROM et al., 2018).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define histologicamente os tumores do SNC de acordo com uma “escala de malignidade”, que vai do grau I ao grau IV. O GBM é um tumor

de grau IV, designação atribuída a tumores com malignidade citológica, atividade mitótica ativa, proliferação microvascular, neoplasmas propensas à necrose tipicamente associadas a uma rápida evolução pré- e pós-operatória da doença e desfecho fatal (LOUIS et al., 2007).

O tratamento padrão para GBM consiste na remoção cirúrgica do tumor, seguida por radioterapia mais quimioterapia concomitante e adjuvante com temozolomida (TMZ) – um agente alquilante do DNA (WELLER et al., 2014). A cirurgia é a primeira intervenção terapêutica, tanto biopsia como ressecção microcirúrgica, uma vez que a cito redução do tumor alivia os sintomas causados pela pressão tumoral e fornece amostra para identificação molecular e histológica (WEN; KESARI, 2008). Para pacientes recém diagnosticados com GBM, a ressecção de aproximadamente 78% da massa tumoral já aumenta a sobrevivência geral, sendo que a remoção total do tumor é a que apresenta melhores resultados (SANAI et al., 2011). A radioterapia externa pós-operatória é a mais recomendada para tratar GBM, com a aplicação de uma dose total de 50 a 60 Gy administrada em frações de 1,8 a 2,0 Gy (LAPERRIERE; ZURAW; CAIRNCROSS, 2002).

O TMZ é o quimioterápico de escolha no tratamento de GBM. Por ser uma pró-droga, o TMZ é ativado em pH fisiológico e induz lesões no DNA ao inserir grupamentos metil nas bases adenina (na posição O³) e guanina (nas posições N⁷ e O⁶) (FRIEDMAN; KERBY; CALVERT, 2000). A sua administração concomitante à radioterapia é o tratamento quimioterápico padrão para pacientes adultos recém diagnosticados com GBM, com idade até 70 anos e em boas condições gerais e neurológicas (TABATABAI et al., 2010; WELLER et al., 2014). De acordo com o protocolo estabelecido por Stupp *et. al.* (2010), o TMZ é administrado diariamente na concentração de 75 mg/m² concomitante à radioterapia, seguido de até seis ciclos com administração diária de 150–200 mg/m² por 5 dias e intervalos de 23 dias de recuperação para cada ciclo. Esse regime de exposição ao TMZ foi capaz de prolongar a

sobrevivência média geral dos pacientes em comparação ao tratamento somente com radioterapia (14.6 *versus* 12.1 meses) (STUPP et al., 2005).

O tratamento de pacientes com GBM recorrente ainda não está padronizado e é baseado no tratamento prévio, idade, status de performance de Karnofsky (KPS) e os padrões de recorrência tumoral (WELLER et al., 2013). Pacientes com idade <65-70 anos são geralmente submetidos a re-ressecção, re-irradiação e quimioterapia com nitrosureias, alternando os regimes de tratamento com TMZ e Bevacizumab (anti-VEGF). Enquanto que para pacientes com idade >65-70 anos é mais adequada a ressecção do tumor seguida de quimioterapia ou radioterapia (WELLER et al., 2014).

2. Marcadores Moleculares em GBM

O advento de abordagens moleculares aplicadas à oncologia revolucionou o diagnóstico e o tratamento do câncer. Técnicas de microarranjo, sequenciamento completo do genoma, medição do nível de metilação do DNA e ferramentas de bioinformática permitiram a identificação do perfil molecular e de alvos terapêuticos em vários tipos de tumores, guiando a descoberta de biomarcadores diagnósticos, prognósticos e preditivos em cânceres humanos. O GBM é um alvo da aplicação de abordagens genômicas e transcriptômicas, uma vez que são tumores heterogêneos e resultam do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas, similares a outros tipos de câncer (PATEL et al., 2014; STRATTON; CAMPBELL; FUTREAL, 2009; VERHAAK et al., 2010; VOGELSTEIN; KINZLER, 2004).

Relacionado ao diagnóstico, o status de mutação da isocitrato desidrogenase (IDH) foi o primeiro marcador molecular a ser aplicado no diagnóstico de GBM. Mutações no gene da IDH (*IDH*) estão implicadas na progressão e patologia de gliomas malignos. Gliomas de grau II/III e GBM “secundários” – classificação histológica de GBM de grau IV que se desenvolvem de tumores de graus menores – geralmente tem uma alta frequência de mutações no *IDH* e

apresentam um desfecho melhor quando comparado a GBM primário (de novo) com *IDH* selvagem (NOBUSAWA et al., 2009; WILLIAMS et al., 2008; YAN; PARSONS; JIN, 2009). Além disso, o status de mutação do *IDH* está relacionado com o nível de metilação do DNA dos gliomas (CECCARELLI et al., 2016; NOUSHMEHR et al., 2010). Mutação no *IDH1* leva ao estabelecimento de um fenótipo de hipermetilação, conhecido como fenótipo positivo de metilação nas ilhas CpG (G-CIMP+) (TURCAN et al., 2012). Gliomas de baixo grau (II-III) e GBM com mutação no *IDH* geralmente são G-CIMP+ (CECCARELLI et al., 2016).

Devido ao impacto no desfecho dos pacientes, o status do *IDH* foi incluído nas diretrizes da OMS para classificação de tumores do SNC, que é baseada nos perfis histológico-moleculares dos tumores. De acordo com a versão de 2016, os GBM são classificados em 3 grupos: 1) GBM *IDH* selvagem: compreende 90% dos casos, sendo classificados previamente como GBM primário (de novo) e predominante em pacientes com mais de 55 anos de idade; 2) GBM com *IDH* mutante: compreende aproximadamente 10% dos casos, sendo previamente classificados como secundários e acometendo geralmente pacientes mais jovens; 3) GBM NOS: são tumores cujo status do *IDH* não pode ser determinado clinicamente (LOUIS et al., 2016; OHGAKI; KLEIHUES, 2013; WESSELING; CAPPER, 2018).

Projetos baseados em consórcios, como o *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) e o *Chinese Glioma Genomic Atlas* (CGGA), tem ajudado na identificação de vias moleculares alteradas e na classificação de diferentes subtipos moleculares de GBM. Esses projetos aplicam identificação multiplataforma para definir de forma sistemática e abrangente o perfil genômico e transcriptômico dos GBM (BRENNAN et al., 2013; PHILLIPS et al., 2006; SUN et al., 2014; VERHAAK et al., 2010; YAN et al., 2012). Através do projeto do TCGA para GBM e utilizando análise de cluster hierárquico, Verhaak *et.al.* e colaboradores (2010) classificaram os GBMs de acordo com o seu distinto perfil molecular em quatro grupos principais: clássico,

proneural, neural e mesenquimal (Figura 1). Apesar do envolvimento no desfecho clínico dos pacientes, essa classificação ainda não foi aplicada na rotina de diagnóstico dos GBM.

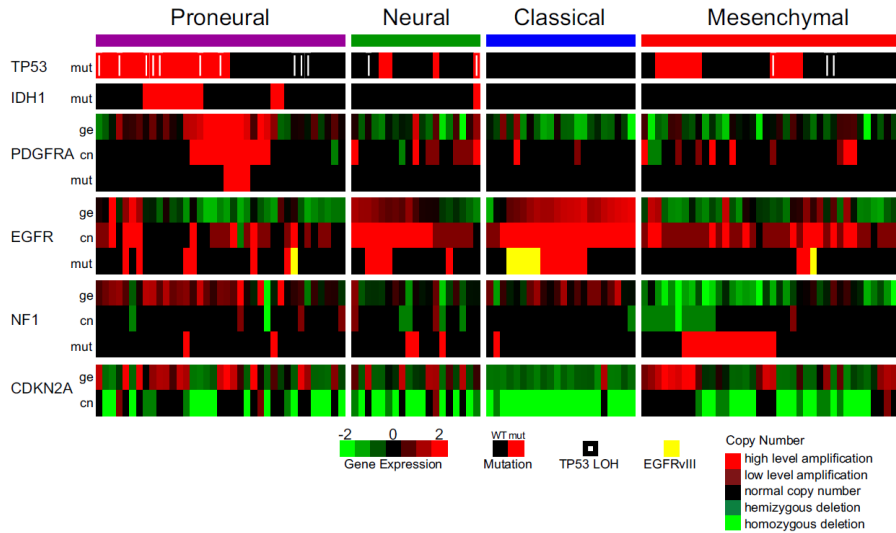


Figura 1. Classificação dos GBM em subtipos de acordo com o perfil molecular. Dados de expressão gênica (*ge*), mutação (*mut*) e variação no número de cópias gênicas (*cn*) de genes característicos dos subtipos proneural, neural, clássico e mesenquimal (Adaptado de Verhaak, *et. al.* 2010).

Para prever qual o regime de tratamento mais adequado para pacientes com GBM, o status de metilação do promotor do gene que codifica a O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferase (MGMT) é um biomarcador valioso (HEGI *et al.*, 2005; WICK *et al.*, 2014). A MGMT é enzima “suicida” que remove os adutos de DNA, conferindo resistência celular contra agentes alquilantes (BRENNAND; MARGISON, 1986; GERSON, 2004). Sua expressão e atividade são menores em GBM em comparação a tecidos normais não-tumorais (CITRON *et al.*, 1993), evento relacionado ao silenciamento epigenético do gene para MGMT, causado pela metilação das ilhas de CpG no seu promotor (ESTELLER *et al.*, 1999; QIAN; BRENT, 1997; WELLER *et al.*, 2010). Tumores com metilação no promotor do gene para MGMT (*met-pMGMT*) perdem ou tem baixos níveis de expressão da MGMT, enquanto aqueles com o promotor do *MGMT* desmetilado (*un-pMGMT*) expressam nível regular a alto de MGMT (ESTELLER *et al.*, 1999; KRETH *et al.*, 2011; WATTS *et al.*, 1997; WELLER *et al.*, 2010). A frequência de tumores *met-pMGMT* parece estar associada com a progressão dos gliomas e diminuir conforme

aumenta a malignidade desses tumores (RIEMENSCHNEIDER; HEGI; REIFENBERGER, 2010). Gliomas com mutação na *IDH* (gliomas de grau II/III e GBM secundários) apresentam alta frequência *met-pMGMT*, com valores a partir de 70 %. Os GBM primários, por sua vez, possuem uma frequência de metilação menor, onde 30-68% dos pacientes com GBM são positivos para *met-pMGMT* (CECCARELLI et al., 2016; WEILER et al., 2014).

Como indicado por Hedi *et. al.* (2005), *met-pMGMT* é um fator prognóstico independente e favorável para GBM, reduzindo o risco de morte dos pacientes em 55%. Pacientes com GBM, cujo tumor apresenta *met-pMGMT*, que foram tratados com TMZ e radioterapia apresentam uma melhor sobrevida quando comparado àqueles que receberam apenas radioterapia (mediana da sobrevivência livre de doença de 10,3 meses *versus* 5,9 meses e mediana da sobrevivência global de 21,7 meses *versus* 15,3 meses, respectivamente). Enquanto pacientes com GBM *un-pMGMT* não se beneficiam da adição do TMZ ao tratamento com radioterapia (HEGI et al., 2005). Devido a isso, o status de metilação do promotor do *MGMT* juntamente com a idade são os principais fatores preditivos para a administração de TMZ e radioterapia em pacientes com GBM. Pacientes com idade <65-70 anos são submetidos geralmente ao tratamento padrão para GBM. Já os pacientes com idade \geq 65-70 anos recebem tratamento padrão ou somente TMZ, se o tumor é *met-pMGMT*, porém se o tumor for *un-pMGMT*, os pacientes recebem somente radioterapia hipofracionada (HEGI et al., 2005; TABATABAI et al., 2010; WICK et al., 2012; WIRSCHING; GALANIS; WELLER, 2016).

A falta de eficácia do TMZ em pacientes com *un-pMGMT* é embasada por estudos *in vitro*, onde mostram que a não-metilação do promotor do gene para *MGMT* e, conseqüentemente, a expressão de *MGMT*, conferem resistência ao quimioterápico (BRENNAND; MARGISON, 1986; VAN NIFTERIK et al., 2010). Isso acontece durante o tratamento, quando a enzima remove o grupamento metil adicionado pelo TMZ, revertendo o dano induzido no DNA.

Apesar do seu valor preditivo, a MGMT aparenta não ser um potencial alvo terapêutico. Tentativas de inibir o efeito da MGMT no tratamento de tumores recorrentes e resistentes ao TMZ se mostrou ineficaz (QUINN et al., 2009). Em ensaio clínico de fase II foi observado que a combinação de TMZ com O⁶-benzilguanina (inibidor da enzima MGMT) não foi capaz de prolongar a sobrevivência dos pacientes com recidiva de GBM e previamente resistentes ao TMZ.

3. Heterogeneidade GBM

Como em vários tipos de tumores sólidos, a existência de subtipos tumorais com distintos perfis moleculares entre os GBMs é devido à sua característica heterogênea. A heterogeneidade intratumoral está diretamente relacionada com a heterogeneidade celular e molecular dos GBM (AUM et al., 2014; FRIEDMANN-MORVINSKI, 2014). A heterogeneidade celular se dá pela presença de células neoplásicas e células tronco de gliomas embebidas por um microambiente tumoral, composto de células do estroma, células endoteliais vasculares, periquitos, células gliais, células imunes infiltrativas e residentes, entre outros tipos celulares agrupados geralmente em nichos (DE VLEESCHOUWER; BERGERS, 2017). A heterogeneidade molecular se destaca pela presença de alterações genéticas e epigenéticas, como por exemplo mutações, deleções, amplificações, aumento ou diminuição de expressão gênica, duplicação de cromossomos ou genes (AUM et al., 2014). Tais alterações desestabilizam a homeostasia celular e estão relacionadas com os *hallmarks* do câncer (AUM et al., 2014; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A característica heterogênea dos tumores tem consequência direta na acurácia de biomarcadores clínicos. A presença de diversos tipos celulares com distintos perfis moleculares leva à uma alta variedade e variabilidade dos marcadores, o que dificulta a determinação de biomarcadores abrangentes e estáveis. Além disso, as biopsias geralmente retiram uma pequena

fração de células tumorais, ocasionando um diagnóstico molecular restrito. Tratamentos baseados em tal diagnóstico podem atingir somente a população de células conhecidas, vindo a selecionar clones que não são afetados ou até mesmo resistentes ao tratamento, levando a uma progressão da doença (ALMENDRO; MARUSYK; POLYAK, 2013).

4. Sistema glutamatérgico

O glutamato (Glu) é o principal neurotransmissor excitatório do SNC. Esse aminoácido medeia diferentes respostas fisiológicas no SNC, principalmente via ligação a receptores de membrana (FONNUM, 1984; HEADLEY; GRILLNER, 1990). Uma vez liberado, o Glu pode ligar-se a duas classes de receptores: ionotrópicos (iGluR) e metabotrópicos (mGluR). Os iGluR contêm canais iônicos específicos para cátions e são subdivididos em três grupos: α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA), cainato e N-metil-D-aspartato (NMDA). Em contrapartida, os mGluR são acoplados a proteínas ligantes de GTP (proteínas G) e modulam a sinalização intracelular via segundos mensageiros (OZAWA; KAMIYA; TSUZUKI, 1998).

A disfunção de receptores e transportadores de Glu pode desregular a homeostase deste aminoácido, o que é frequentemente associado a diversas desordens neurológicas e psiquiátricas, bem como a doenças neurodegenerativas (para revisões ver BOWIE, 2008; NICOLETTI et al., 2011; RIBEIRO et al., 2017; SHELDON; ROBINSON, 2007; V. GOLUBEVA et al., 2016). Tais disfunções também são reportadas em gliomas malignos, incluindo GBM.

5. Sistema Glutamatérgico em GBM

Comportando-se exatamente em oposição aos astrócitos, as células de gliomas apresentam quase completa ausência de captação de Glu Na^+ -dependente, elevada liberação de Glu no espaço extracelular, e localização errônea e/ou ausência de expressão de transportadores

de Glu (como por exemplo EAAT2 e EAAT1) (TAKANO et al., 2001; YE; ROTHSTEIN; SONTHEIMER, 1999; YE; SONTHEIMER, 1999). Células de gliomas liberam Glu principalmente via trocador de cistina-Glu, levando a uma concentração desse aminoácido até 2 vezes maior no tecido peritumoral em comparação ao tecido normal (BEHRENS et al., 2000; YE; SONTHEIMER, 1999). Altos níveis de Glu no espaço extracelular são considerados excitotóxicos, uma vez que a ativação de receptores NMDA nos neurônios estimula uma entrada excessiva de Ca^{2+} , o que vem a causar morte celular (TAKANO et al., 2001; YE; SONTHEIMER, 1999). Gliomas se beneficiam da excessiva liberação de Glu, pois esse processo facilita a expansão do tumor através da indução de morte celular do tecido adjacente (SONTHEIMER, 2003), liberando espaço e promovendo o crescimento tumoral (TAKANO et al., 2001).

Efeitos pró-tumorais do Glu também podem ser desencadeados via ligação a seus receptores. Receptores ionotrópicos AMPA, cainato e NMDA, bem como os mGluR, são expressos em vários tipos de tumores sólidos, incluindo gliomas (STEPULAK et al., 2009, 2014). Entretanto, entre os tipos de GluR, os mGluR são os principais mediadores da sinalização glutamatérgica em tumores, principalmente devido a sua atividade modulatória intracelular (PEREIRA et al., 2017; YU et al., 2017).

6. mGluR em câncer

Os mGluR são membros da superfamília dos receptores acoplados à proteína G. Eles são proteínas transmembrana heptahélicas com uma longa porção N-terminal extracelular, contendo o sítio de ligação do Glu, e um domínio C-terminal intracelular, compreendendo as regiões de regulação do receptor e de interação proteica. mGluR são subclassificados em três grupos, baseando-se na homologia da sua sequência, seletividade dos ligantes e associação a

vias de sinalização. O grupo I inclui os mGluR 1 e 5, o grupo II inclui os mGluR 2 e 3, e o grupo III inclui os mGluR 4, 6, 7 e 8 (KEW; KEMP, 2005; NISWENDER; CONN, 2010).

Os mGluR do grupo I estão acoplados a proteínas G_q e a sua ativação estimula a fosfolipase C (PLC) e a hidrólise de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂). A hidrólise de PIP₂ gera inositol (1,4,5)-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG), que estimula a liberação intracelular de Ca^{2+} do retículo endoplasmático e ativa a proteína quinase C (PKC), respectivamente. Em contrapartida, mGluR do grupo II e III estão acoplados principalmente a proteínas $G_{i/o}$, que inibem a adenilato ciclase (AC), diminuindo a formação de AMPc e, assim, diminuindo a atividade de canais iônico e outras vias de sinalização *downstream* (DE BLASI et al., 2001; NICOLETTI et al., 2011, 2007; NISWENDER; CONN, 2010; PEREIRA et al., 2017; WILLARD; KOOCHKEKPOUR, 2013a).

A ativação dos mGluR acaba por modular vias de sinalização como as vias da Ras/Mek/Erk, PI3K/Akt/mTOR e NF- κ B (NICOLETTI et al., 2011; NISWENDER; CONN, 2010; WILLARD; KOOCHKEKPOUR, 2013b). Essas vias regulam vários processos celulares (proliferação, crescimento, sobrevivência, diferenciação celular, entre outros) e estão geralmente desreguladas no câncer (SEVER; BRUGGE, 2015). Portanto, é esperado que uma expressão aberrante ou mutação nos mGluR possa ter um papel importante na patologia molecular de vários tipos de cânceres, incluindo os GBM (NICOLETTI et al., 2007; PEREIRA et al., 2017; TEH; CHEN, 2012; YU et al., 2017).

Alguns estudos já descreveram a expressão aberrante dos mGluR em diferentes tipos tumorais e o seu impacto na malignidade dessas neoplasias (TEH; CHEN, 2012; YU et al., 2017). Alguns desses achados estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1. Nível de expressão e impacto dos mGluRs em neoplasias humanas

| mGluR | Neoplasia* | Nível expressão** | Impacto do receptor | Referência |
|--------|---|-------------------|---|---|
| mGluR1 | Melanoma | Presente | Transformação maligna de melanócitos | (POLLOCK et al., 2003) |
| | Câncer de próstata | Alta | Presente em câncer primário e metastático | (KOOCHKEPOUR et al., 2012) |
| | Câncer de mama | Presente | Regulação do crescimento celular | (SPEYER et al., 2012) |
| | Meduloblastoma [#] Ependimoma [#] GBM [#] | Alta | Suporte para angiogênese | (BROCKE et al., 2010) |
| | Astrocitoma [#] grau I-II | Baixa | | (BROCKE et al., 2010) |
| mGluR2 | Meduloblastoma [#] Ependimoma [#] GBM [#] | Alta | | (BROCKE et al., 2010) |
| | Astrocitoma [#] grau I-II | Baixa | | (BROCKE et al., 2010) |
| mGluR3 | GBM | Baixa | Prognóstico positivo | (CICERONI et al., 2013) |
| mGluR4 | Ependimoma [#] GBM [#] | Alta | | (BROCKE et al., 2010) |
| | Astrocitoma [#] grau I-II | Baixa | | (BROCKE et al., 2010) |
| | Osteosarcoma | Superexpressão | Prognóstico ruim | (YANG et al., 2014) |
| | Câncer colorretal | Superexpressão | Prognóstico ruim | (CHANG et al., 2005; YOO et al., 2004) |
| | Melanomas malignos Carcinomas de células escamosas da laringe Carcinoma mamário | Superexpressão | Resistência ao quimioterápico 5-fluorouracil | (CHANG et al., 2005) |
| | Meduloblastoma | Alta | Prognóstico positivo | (BROCKE et al., 2010; IACOVELLI et al., 2006) |
| mGluR5 | Carcinoma oral de células escamosas | Presente | Diminui o tempo de sobrevivência dos pacientes Estimula migração e invasão celular | (PARK et al., 2007) |
| | Melanoma | Superexpressão | Desenvolvimento do tumor em camundongos transgênicos | (CHOI et al., 2011) |
| | Meduloblastoma [#] Ependimoma [#] GBM [#] | Alta | | (BROCKE et al., 2010) |
| | Astrocitoma [#] grau I-II | Baixa | | (BROCKE et al., 2010) |
| mGluR6 | Meduloblastoma [#] Ependimoma [#] GBM [#] | Presente | | (BROCKE et al., 2010) |
| mGluR8 | Meduloblastoma [#] | Alta | | (BROCKE et al., 2010) |
| | Ependimoma [#] GBM [#] | Baixa | | (BROCKE et al., 2010) |
| | Astrocitoma [#] grau I-II | | | |

*neoplasias humanas

**nível de expressão em relação às amostras não tumorais do tecido de origem

[#]tumores pediátricos

Apesar de detectada a expressão dos oito subtipos de mGluR em células de linhagens de gliomas e amostras humanas de GBM (PEREIRA et al., 2017), somente os mGluR1,

mGluR3 e mGluR8 são descritos pelo seu envolvimento direto com GBM. A superexpressão do *GRM8* – gene que codifica a proteína mGluR8 – em linhagens de GBM foi capaz de diminuir a proliferação celular, aumentar a apoptose e elevar a vulnerabilidade das células a agentes citotóxicos (JANTAS et al., 2018). Já estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que a ativação endógena de mGluR1 e mGluR3 aumenta a proliferação de células GBM com o possível envolvimento das vias MAPK e PI3K (ARCELLA et al., 2005; CICERONI et al., 2008; D’ONOFRIO et al., 2003; ZHANG et al., 2015; ZHOU et al., 2014). Além disso, Ciceroni *et al.* (2013) mostraram que o mGluR3 pode regular a quimiorresistência de células tronco de gliomas ao TMZ *in vitro* e *in vivo* através da indução da transcrição de *MGMT* por uma via de sinalização intracelular que envolve a ativação das proteínas PI3K e NF-kB (CICERONI et al., 2013).

Transpondo seus achados experimentais para a clínica, Ciceroni *et al.* (2013) analisaram uma possível relação entre os níveis de expressão de mGluR3 e a taxa de sobrevida de pacientes com GBM submetidos à cirurgia seguida por radioterapia e TMZ adjuvante. O transcrito do *GRM3* - gene que codifica o mGluR3 - foi avaliado por PCR quantitativo em tumores de uma coorte de 87 pacientes. Os níveis “normais” de mRNA do *GRM3* foram definidos como aqueles encontrados em amostras normais de cérebro. Níveis de *GRM3* abaixo da faixa normal foram detectados em 42 GBMs (48,3%), enquanto que em 45 casos (51,7%) seus níveis eram normais ou maiores. A análise de Kaplan-Meier (KM) indicou uma sobrevida prolongada no grupo de pacientes com expressão de *GRM3* abaixo da faixa normal. Na análise multivariada de Cox, KPS, Ki-67 (marcador de proliferação celular) e níveis de *GRM3* foram fatores preditivos independentes para sobrevida. Os autores também estratificaram pacientes pela expressão de *GRM3* e estado de metilação do promotor *MGMT*. O grupo com baixos níveis de *GRM3* e *met-pMGMT* sobreviveu mais tempo em comparação ao grupo com baixo nível de *GRM3* e *un-pMGMT*. Pacientes com níveis alto/“normais” de *GRM3* tiveram uma sobrevida curta, independentemente do estado de metilação do promotor. Em resumo, os níveis de mRNA do

GRM3 em GBM podem ser um fator prognóstico para o desfecho do paciente (CICERONI et al., 2013).

Combinando as evidências acima mencionadas, as quais sugerem um papel proeminente dos mGluR no desenvolvimento de tumores do SNC e periféricos, com a falta de informação sobre o envolvimento da grande maioria dos mGluR na sobrevivência de pacientes com GBM, nós decidimos avaliar a relação entre os níveis de expressão do mRNA de cada um dos oito subtipos de mGluR e o desfecho dos pacientes com GBM, levando em consideração os níveis de expressão de mRNA do *MGMT*.

OBJETIVOS

1. Objetivos gerais

Avaliar o potencial prognóstico dos receptores metabotrópicos de glutamato na sobrevivência de pacientes com glioblastoma.

2. Objetivos específicos

- Avaliar o potencial prognóstico independente do nível de expressão de mRNA do *MGMT* e dos *GRM (1 a 8)* no desfecho dos pacientes com GBM, utilizando dados públicos de microarranjo obtidos das coortes TCGA e CGGA;
- Avaliar o potencial prognóstico do nível de expressão de mRNA dos *GRM* no desfecho dos pacientes com GBM, levando em consideração os níveis de expressão de mRNA do *MGMT*.

PARTE II

CAPÍTULO I

Artigo a ser submetido para publicação

Metabotropic glutamate receptors are potential independent prognostic markers in glioblastoma patients with different expression levels of MGMT

Revista: International Journal of Cancer

Qualis-CAPES-CBII: A1

Fator de Impacto: 7.36

Metabotropic glutamate receptors are potential independent prognostic markers in glioblastoma patients with different expression levels of MGMT

Chairini Cássia Thomé^{1*}, Mery Stéfani Leivas Pereira¹, Marco Antônio De Bastiani², Fábio Klamt², Diogo Losch de Oliveira^{1*}

¹Cellular Neurochemistry Laboratory, Biochemistry Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

²Cellular Biochemistry Laboratory, Biochemistry Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

*** Corresponding authors:**

B.Sc. Chairini Cássia Thomé, Biochemistry Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos - 2600 anexo, CEP: 90035-003, Porto Alegre – RS – Brazil, E-mail: chairini.thome@gmail.com, Phone: +55 51 3308 5555

Prof. Dr. Diogo Losch de Oliveira, Biochemistry Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos - 2600 anexo, CEP: 90035-003, Porto Alegre – RS – Brazil, E-mail: losch@ufrgs.br, Phone: +55 51 3308 5556

Key-words: mGluR, *GRM*, glioblastoma, prognostic markers, *MGMT*

Abbreviations: GBM (glioblastoma), GRM1-8 (metabotropic glutamate receptors subtypes 1-8), MGMT (O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase), OS (overall survival), PFS (progression-free survival).

Article category: Research Article

Novelty and Impact

Here we confirmed that mRNA-expression of *MGMT* was an independent prognostic factor in GBM and its high-expression levels were associated with GBM patient's poor outcome. Furthermore, we found that mRNA-expression of *GRM4* was associated with a high mortality risk in patients with high mRNA-expression of *MGMT*, while gene-expression of *GRM1* and *GRM8* were associated with a low mortality risk in patients with low mRNA-expression of *MGMT*.

ABSTRACT

Metabotropic glutamate receptors (mGluR) are glutamate binding G-proteins responsive receptors. Despite of its aberrant expression been known to play a role in different tumors, including glioblastoma (GBM), literature lacks information about their involvement on GBM-patients outcome. To investigate the potential prognostic role of mGluR in GBM patients, we assessed the relationship between mRNA levels of mGluR subtypes 1 to 8 (*GRM1-8*) and patient survival, considering *MGMT* gene-expression. Clinical and tumoral-transcriptomic data from 219 and 108 GBM patients were retrieved from TCGA and CGGA, respectively. We categorized them as low- or high-expression according to their median mRNA-level of *GRM* and *MGMT* and used Cox proportional hazards regression and Kaplan-Meier log-rank survival analyses to evaluate the relationship between gene-expression and overall survival (OS) and progression-free survival (PFS). *MGMT* expression was an independent prognostic factor and its high-expression decreases PFS and OS. *GRM* also affected patient's outcome: *GRM4* expression was associated with poor prognosis (HR: 1.41; p= 0.025), while *GRM8* expression was associated with good prognosis (HR: 0.74; p= 0.041). In TCGA patients with low-expression of *MGMT*, *GRM8* was associated with a longer OS (HR: 0.61; p= 0.035), while *GRM4* was associated with a shorter OS (HR: 1.70; p= 0.043) in TCGA patients with high-expression of *MGMT*. Otherwise, *GRM1* expression indicated a smaller mortality risk (HR: 0.73; p= 0.012) in CGGA patients with low *MGMT* expression. Our results indicate a prognostic potential of *GRM1*, 4 and 8 in GBM-patients with different levels of *MGMT*-expression, suggesting a relation between *GRM* and *MGMT* in GBM.

INTRODUCTION

Glioblastoma (GBM) is the most aggressive and common primary malignant glioma, with an incidence rate of 3.2 per 100,000 and accounting for 14.7% of all brain tumors. Due to its infiltrative and highly-recurrent features, only 5.6% of patients with GBM survive five years post-diagnosis. This neoplasia is more common in elderly adults (median age at diagnosis of 65 years), in males than females (1.58:1) and among whites than blacks (1.96:1) ¹. The World Health Organization (WHO) histologically classifies GBM as a grade IV tumor due to its malignant cytology, active mitosis, microvascular proliferation, necrosis-prone neoplasms typically associated with rapid pre- and postoperative disease evolution and a fatal outcome ². Considering isocitrate dehydrogenase (IDH) mutation status, WHO further divides GBM into 3 groups: IDH-wildtype (90% of cases); IDH-mutant (10% of cases); and NOS, tumors with undetermined IDH status ^{3,4}. Standard GBM treatment - recommended for patients <65-70 years - consist of tumor resection, followed by radiotherapy and chemotherapy with TMZ, concomitant or adjuvant to radiotherapy ^{5,6}. Patients >65-70 years receive treatment based on their tumor's O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) promoter-methylation status: if methylated, they receive standard treatment or TMZ only; if unmethylated, they undergo only hypofractionated radiotherapy ⁷⁻⁹. Despite intensive efforts, patients' median overall survival after standard treatment stills around 15 months ⁶.

Metabotropic glutamate receptors (mGluR) have already been described for their involvement in tumor growth ¹⁰ and, therefore, as potential therapeutic targets in cancer, including malignant gliomas ^{11,12}. mGluR are coupled to G-proteins and, upon glutamate binding, modulate intracellular signaling pathways via messengers ¹³. These receptors are subclassified into three groups based on sequence homology, ligand selectivity, and associated-

signaling pathway. Group I includes mGluRs 1 and 5, Group II includes mGluRs 2 and 3, and Group III includes mGluRs, 4, 6, 7, and 8¹⁴.

Aberrant expression of mGluR has been associated with malignancy in several types of tumors¹⁵. In pediatric brain tumors, mGluR1, mGluR2, mGluR4, mGluR5 and mGluR6 were overexpressed in malignant gliomas compared to samples of human brain or low-grade astrocytoma; whereas, mGluR8 was upregulated in medulloblastoma, and downregulated in GBM, ependymoma and low-grade astrocytoma¹⁶. On the other hand, high expression of mGluR4 was associated with a positive clinical outcome in medulloblastoma of adult patients¹⁷.

In GBM tumors, only the expression of mGluR3 was investigated by its association with patient outcome¹⁸. In an Italian cohort of GBM-patients, mGluR3 mRNA levels were independent predictor factor for patient outcome and its low expression was indicated to prolong patient survival. Furthermore, patients with low mGluR3 mRNA levels and methylated *MGMT* promoter survived longer compared to those with unmethylated *MGMT* promoter; while patients with high mGluR3 mRNA level had short survival, regardless of the methylation state¹⁸.

Due to the scarce information regarding the involvement of mGluRs in GBM, the present work evaluated the relationship between tumoral mRNA-expression levels of mGluR subtypes 1 to 8 (*GRMI-8*) and outcome of GBM patients, considering also the *MGMT* mRNA-expression levels. Hereby, we explored the prognostic potential of the eight mGluR subtypes on GBM patients using clinical and tumor's transcriptomic information from two large cohorts, TCGA and CGGA.

METHODS

Expression Data Acquisition and Patient Selection

The clinical and tumor-gene-expression data from GBM's patients were retrieved from two sources: The Cancer Genome Atlas (TCGA) (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) and the Chinese Glioma Genome Atlas (CGGA) (<http://www.cgga.org.cn/>).

TCGA gene-expression quantification information was originally obtained with Affymetrix HT Human Genome U133 (HT_HG-U133A) platform. We obtained the data through the R/Bioconductor package TCGAbiolinks¹⁹, which was accessed and downloaded in August 2017. The 219 patients from the 519 original were selected according to the clinical variables available in the dataset and based on the following criteria: tumors were untreated primary (de novo) GBM; samples were obtained through total tumor resection or excisional biopsy; transcription data were from the first-tumor sample of each patient; patient underwent radiotherapy; presence of description of Karnofsky Performance Score (KPS), age at diagnosis, gender, race, overall survival (OS) and progression-free survival (PFS). Patients were excluded when values regarding any of the above criteria were missing. Clinical routine usually establishes or updates KPS at different times during the disease's management. In our analyses, we used the KPS available and indicated the timing of collection (Table 1). All available patients in the database received the standard treatment of craniotomy followed by post-operative radiotherapy and some form of chemotherapy, and TMZ was given in at least one indication regiment (adjuvant and after recurrence/progression of the disease), combined or not with other therapy-drugs.

CGGA gene-expression quantification information was originally obtained with Agilent Whole Human Genome Oligo Microarray in a 4*44k platform. We obtained the data through the CGGA data portal in form of Excel file

(<http://www.cgga.org.cn/index.php?m=Page&a=index&id=42>), which was accessed and downloaded in August 2018. From the 301 patients, we selected 108 patients according to the clinical variables available in the dataset and based on the following criteria: tumors were histologically classified as primary GBM according WHO 2007 classification; description of OS, age and gender. Patients were excluded when values regarding any of the above criteria were missing. All patients underwent surgery, followed by radiotherapy and chemotherapy with alkylating agents. Tumor samples were originally obtained before patients receive radiotherapy/chemotherapy.

The mRNA-expression level of *MGMT* and z-score of *GRM* were separated in two groups: low- and high-expression (settled as values $\leq 50\%$ and $> 50\%$, respectively), designated using the median expression level as a cut-off (Supplementary Figure 1A and 1B). Based on this separation, patients from both cohorts had the expression of each gene labeled as high or low (Supplementary Figure 1C and 1D). Gene-expression distribution graphs were generated using GraphPad Prism 7.

Cox Proportional Hazard Regression and Kaplan-Meier Survival Curves

The relationship between GBM's gene-expression levels and survival (OS and PFS) was evaluated using Cox proportional hazards regression and Kaplan-Meier log-rank survival analyses. For OS analysis with TCGA data, the time-to-event variable used was "days to death" information or "days to last follow-up". For TCGA-PFS analysis, the time to event information available was "days to new event after initial treatment" - when absent, we used "days to death" or "days to last follow-up". Cox analysis was used to adjust for confounding variables, such as age, gender, *MGMT* expression, race and KPS (last two available only in TCGA cohort). Results of Cox analysis were expressed as hazard ratio (HR). Both multivariate Cox analysis and log-rank tests were computed using R statistical software survival package^{20,21}. Kaplan-

Meier curves and forest plots were generated using ggplot2 and survminer packages^{22,23}. For all analyses, we set a significant level as p-value <0.05.

RESULTS

Cohorts Demographic Information

We selected a total of 219 and 108 GBM-patients from TCGA and CGGA, respectively. Patients clinical profile and available tumor characteristics are summarized at Table 1.

TCGA patients had median age of 57 years (range, 10-86 years) at the time of diagnosis. The majority of them were male (64%), white (88%) and presented a KPS \geq 80 (84%). All patients underwent surgery for tumor removal – through tumor resection (84%) and excisional biopsy (16%) - and received radiotherapy. TMZ was administered to all patients at some point of their treatment, but only 74% received TMZ as adjuvant to radiotherapy. Other forms of therapy were also used, such as alkylating agents, hormone therapy, anti-tumor vaccines, interleukins, corticoids, etc. Additionally, 213 out of 219 patients had a new tumor event (i.e. recurrence, progression or metastasis) after the adjuvant treatment. GBM patients have a median OS and PFS of 508 days (range, 82 – 3524 days) or 16.9 months and 208 days (range, 13 – 2339 days) or 6.9 months, respectively (Figure 1A and B).

CGGA patients had a median age of 51 years (range, 13 – 70 years) at the time of diagnosis and 61% (66 out of 108) were male (Table 1). The GBM-patients from CGGA have a median OS of 432 days (range, 27 – 2604 days) or 14.4 months (Figure 1A). No extra clinical information was available on the dataset file, but previous studies indicate that these patients underwent standard clinical treatment with tumor surgical resection, and subsequently received radiotherapy and/or chemotherapy with alkylating agents.

Survival Analysis

MGMT promoter-methylation has been already described by its predictive value in GBM treatment. Promoter-methylation status was inversely correlated with the mRNA expression^{24,25}. The negative effect of high *MGMT* mRNA levels on GBM-patient's outcome have already been pointed²⁶, making it a suitable indicator whether these datasets were fitting literature information. We divided patients into groups of high or low *MGMT* expression (Supplementary Figure 1A and B) and performed KM analysis to assess their survival probabilities (Figure 2). KM results indicated that TCGA patients with high *MGMT* expression have a shorter OS ($p < 0.0001$) and PFS ($p = 0.045$) when compared to patients with low expression of this gene (Figure 2A and B). Despite showing the same profile, no significant difference in OS was observed between the two groups in CGGA cohort (Figure 2C). We further performed a multivariate Cox analysis to evaluate the contribution of *MGMT* expression in the mortality risk independent of other risk factors (Table 2). As expected, the tumoral *MGMT* expression was associated with a shorter PFS (HR: 1.35; 95% CI: 1.02 – 1.78; $p = 0.036$) and OS in TCGA (HR: 1.87; 95% CI: 1.38-2.55; $p = 0.00006$) and CGGA cohorts (HR: 1.54; 95% CI: 1.01-2.36; $p = 0.045$).

To evaluate the effect of tumoral *GRM* expression on patient survival using KM analysis, we first categorized the patients according to their GBM-*GRM* expression levels (Supplementary Figure 1C and D) and divided them into groups of low and high expression. In both cohorts, no significant differences in OS and PFS probabilities were observed between groups with high and low expression of *GRM* (Supplementary Figure 2).

To assess the prognostic potential of the eight *GRM* genes independent of clinical covariates (age, race, gender, KPS and *MGMT* expression level), we performed a multivariate Cox analysis (Table 3). Opposing from KM results, Cox results indicate that *GRM* have significant contribution only in OS of TCGA patients, where *GRM4* expression was

associated with a poor outcome (HR: 1.41; 95% CI: 1.04-1.90; $p=0.025$) and an expression of *GRM8* was associated with a good outcome (HR: 0.74, 95% CI: 0.55-0.99; $p=0.041$). As expected²⁷, the covariates age and *MGMT* expression level also had a significant effect on OS and PFS in both TCGA and CGGA patients (Table 3).

Furthermore, we investigated the prognostic value of *MGMT* together with *GRM* levels in GBM samples. For that, we divided patients in groups of high-/low-*MGMT* expression (Supplementary Figure 1C and D). Subsequently, we subdivided the patients of each group into high/low *GRM*-GBM-expression groups and assessed their survival probabilities (Supplementary Figure 3). KM results indicate that *GRM* expression of all eight subtypes had no significant effect on TCGA-OS probabilities in groups with high/low *MGMT* expression. However, high *GRM4* expression in low *MGMT* expression group was associated with a longer PFS ($p=0.03$) (Supplementary Figure 3C), while low *GRM4* expression in high *MGMT* expression group was associated with a longer PFS ($p=0.05$) (Supplementary Figure 3D). In CGGA patients with low *MGMT* expression, high *GRM1* expression showed an increased OS probability, but the difference between groups is not significant ($p=0.062$) (Supplementary Figure 3E).

Additionally, we assessed the mortality risk of each *GRM* with multivariate Cox analysis (Table 4). In TCGA patients with low *MGMT* expression, expression of *GRM8* was associated with a 39% decrease in mortality risk (HR: 0.61; 95% CI: 0.39-0.97; $p=0.035$), while in patients with high *MGMT* expression, *GRM4* expression increases 70% the patient's mortality risk (HR: 1.70; 95% CI: 1.12 - 2.58; $p=0.012$). On the other hand, in CGGA patients with low *MGMT* expression, *GRM1* expression decreases up to 27% the mortality risk (HR: 0.73; 95% CI: 0.53-0.99; $p=0.043$).

DISCUSSION

MGMT promoter methylation status is widely used as predictive biomarker for TMZ administration in GBM^{8,9}. Methylation on *MGMT* promoter reduced protein-expression of *MGMT*, a repair enzyme that removes adducts from DNA, conferring sensibility to chemotherapy based on alkylating agents, such as TMZ²⁴. However, some tumors with methylated *MGMT* promoter can present elevated gene- and protein-expression of *MGMT* and tumors with unmethylated promoter may lack expression of the enzyme^{26,28}. These events may happen because promoter methylation is not the only mechanism regulating *MGMT* expression. Transcription factors as p53, NF- κ B, NDRG1, c-Myc, CBP-p300 complex, pathways as JNK and Wnt/ β -catenin, and miRNAs can also regulate the enzyme expression²⁹. Copy number variation or deletions on chromosome 10 do not seem to affect *MGMT* gene-expression³⁰. Due to insufficient information about the relationship between *MGMT* gene-expression and GBM-patient survival, we evaluated the impact of *MGMT* mRNA-expression levels on patient outcome. Our findings confirmed the literature's assumption²⁶: gene-expression of *MGMT* was an independent prognostic factor and its high-levels of expression were associated with poor outcome of GBM patients (Table 2 and Figure 2), corroborating with results of previous studies analyzing *MGMT* promoter-methylation in GBM⁸.

Our findings suggest that gene-expression of mGluR4 and mGluR8 are prognostic factors independent from influence of clinical covariates (Table 3). As mGluR1 gene-expression, those genes are also independent prognostic factors in patients with high/low *MGMT* expression (Table 4). A direct association between mGluR1, mGluR4 and mGluR8 with *MGMT* has never been described in GBM. However, those receptors were previously associated to malignant tumors. High-expression of mGluR1 has been detected in primary and metastatic prostatic cancer³¹ and its pharmacological activation increased proliferation of GBM

cells in vitro and in vivo³². High-expression of mGluR8 has been detected in pediatric medulloblastoma, while its low-expression was detected in pediatric GBM, ependymoma and low-grade astrocytoma¹⁶. In neuroblastoma and GBM cell lineages, GRM8 downregulation and upregulation induced chemoresistance and decreased cell proliferation, respectively³³. In osteosarcoma, high gene- and protein-expression of mGluR4 were frequent in samples with higher stage and metastasis, being associated with inferior PFS rate and poorer OS rate³⁴. mGluR4 expression is also frequently identified in colorectal adenocarcinomas (68%), malignant melanomas of skin (63%), laryngeal squamous cell carcinomas (50%), and breast carcinomas (46%), when compared to their normal corresponding tissue³⁵. In human medulloblastoma samples, mGluR4 expression was inversely related to tumor severity, spreading, and recurrence, suggesting an association between high-expression levels of mGluR4 and positive clinical outcome¹⁷.

Previous study realized by Ciceroni et. al. (2013) suggested that mGluR3 gene-expression was an independent prognostic factor for GBM-patient outcome. Contrary to those findings, we observed no significant effect of *GRM3* expression on the mortality risk and survival probabilities in our cohorts, irrespective of *MGMT*-expression segregation (Table 3 and 4; Supplementary Figure 2 and 3). TCGA, CGGA and Ciceroni's GBM-patients have similar clinical characteristics (age, gender, OS and PFS) and treatment regimen, but the diverse ethnicity and geographic heterogeneity of GBM patients can explain the contrasting results observed between cohorts. Ciceroni et.al. (2013) study had a cohort of 87 patients (65% male) with median age of 58 years, who underwent resection of histologically confirmed GBM (WHO grade IV) and were treated postoperatively with adjuvant radiotherapy and TMZ at Università Cattolica del Sacro Cuore (Rome, Italy). TCGA comprehends tumor samples from patients originated from hospitals across United States and Canada, while CGGA comprehends samples collected from patients at Beijing Tiantan Hospital in China^{36,37}. Besides, cohorts used different

techniques for transcriptomics analysis and considered different clinical information on multivariate Cox analysis^{18,36-38}.

GBM is a highly heterogenic tumor, constituted with not only neoplastic cells, but also endothelial cells (forming microvasculature), pericytes, microglia, cancer stem cells, and infiltrating immune cells, including regulatory T-lymphocytes (Treg CD4+) and cytotoxic T-lymphocytes (CTL CD8+)^{39,40}. Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) CD4+ were positively correlated with glioma grade and FoxP3+ TILs were found only in GBM. Additionally, the combination of high CD4+ and low CD8+ TIL levels are independent predictors of poor PFS and OS in GBM patients⁴¹. A study in mice showed that brain-infiltrating lymphocytes CD4+ Foxp3+ express high levels of *GRM4* (up to 4-fold mRNA change), which are upregulated in activated natural Tregs and under inducible Treg-favoring conditions⁴². In our results, we observed a high expression of *GRM4* in TCGA-GBM samples as an independent factor of poor prognosis (Table 3). Together, these findings indicate that the high expression of *GRM4* in the GBM samples may be not only from GBM cells, but also from TILs, which may also influence the expression of this gene in the whole tumor, corroborating for the prediction of patient's survival.

Previous studies have already indicated potential role of mGluRs as therapeutic targets in GBM¹². Our study suggests the potential independent prognostic role of *GRM1*, *GRM4* and *GRM8* in GBM patients with different levels of *MGMT* expression. Indicating a putative association between *GRM* and *MGMT*, and highlighting the involvement of mGluR from group III in GBM.

ACKNOWLEDGES

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors reported no conflict of interest.

REFERENCES

1. Ostrom QT, Gittleman H, Truitt G, Boscia A, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015. *Neuro Oncol [Internet]* 2018;20:iv1-iv86. Available from: https://academic.oup.com/neuro-oncology/article/20/suppl_4/iv1/5090960
2. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007;114:97–109.
3. Wesseling P, Capper D. WHO 2016 Classification of gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2018;44:139–50.
4. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 2016;131:803–20.
5. Weller M, van den Bent M, Hopkins K, Tonn JC, Stupp R, Falini A, Cohen-Jonathan-Moyal E, Frappaz D, Henriksson R, Balana C, Chinot O, Ram Z, et al. EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. *Lancet Oncol*

- 2014;15:395–403.
6. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med [Internet]* 2005;352:987–96. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa043330>
 7. Wick W, Platten M, Meisner C, Felsberg J, Tabatabai G, Simon M, Nikkhah G, Papsdorf K, Steinbach JP, Sabel M, Combs SE, Vesper J, et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol [Internet]* 2012;13:707–15. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70164-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70164-X)
 8. Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JEC, Hau P, et al. MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *N Engl J Med [Internet]* 2005;352:997–1003. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa043331>
 9. Wirsching HG, Galanis E, Weller M. Glioblastoma. *Handb Clin Neurol* 2016;134:381–97.
 10. Nicoletti F, Arcella A, Iacovelli L, Battaglia G, Giangaspero F, Melchiorri D. Metabotropic glutamate receptors: new targets for the control of tumor growth? *Trends Pharmacol Sci* 2007;28:206–13.
 11. Iacovelli L, Orlando R, Rossi A, Spinsanti P, Melchiorri D, Nicoletti F. ScienceDirect Targeting metabotropic glutamate receptors in the treatment of primary brain tumors. *Curr Opin Pharmacol [Internet]* 2018;38:59–64. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.02.005>

12. Pereira MSL, Klamt F, Thomé CC, Worm PV, Losch De Oliveira D. Metabotropic glutamate receptors as a new therapeutic target for malignant gliomas. *Oncotarget* 2017;8:22279–98.
13. Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol [Internet]* 1998;54:581–618. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301008297000853>
14. Niswender CM, Conn PJ. Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol [Internet]* 2010;50:295–322. Available from: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533>
15. Teh J, Chen S. Metabotropic glutamate receptors and cancerous growth. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal* 2012;1:211–20.
16. Brocke KS, Stauffer C, Luksch H, Geiger KD, Stepulak A, Marzahn J, Schackert G, Temme A, Ikonomidou C. Glutamate receptors in pediatric tumors of the central nervous system. *Cancer Biol Ther* 2010;9:455–68.
17. Iacovelli L, Arcella A, Battaglia G, Pazzaglia S, Aronica E, Spinsanti P, Caruso A, De Smaele E, Saran A, Gulino A, D'Onofrio M, Giangaspero F, et al. Pharmacological Activation of mGlu4 Metabotropic Glutamate Receptors Inhibits the Growth of Medulloblastomas. *J Neurosci [Internet]* 2006;26:8388–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16899734>
18. Ciceroni C, Bonelli M, Mastrantoni E, Niccolini C, Laurenza M, Larocca LM, Pallini R, Traficante A, Spinsanti P, Ricci-Vitiani L, Arcella A, De Maria R, et al. Type-3 metabotropic glutamate receptors regulate chemoresistance in glioma stem cells, and their levels are inversely related to survival in patients with malignant gliomas. *Cell Death Differ [Internet]* 2013;20:396–407. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2012.150>

19. Colaprico A, Silva TC, Olsen C, Garofano L, Cava C, Garolini D, Sabedot TS, Malta TM, Pagnotta SM, Castiglioni I, Ceccarelli M, Bontempi G, et al. TCGAbiolinks: An R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. *Nucleic Acids Res* 2016;44:e71.
20. R Core T. Crossdating in dplR. 2016;2:1–12.
21. Terry M, Therneau M. Package “survival” Title Survival Analysis. 2018; Available from: <https://github.com/therneau/survival>
22. Kassambara A, Kosinski M, Biecek P. survminer: Drawing Survival Curves using ‘ggplot2’. *R Packag version 03* 2017;1.
23. Wickham H. Introduction [Internet]. In: *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Cham: Springer International Publishing, 2016. 3–10. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4_1
24. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA Repair Gene O 6 - Methylguanine-DNA Methyltransferase by Promoter Hypermethylation is a Common Event in Primary Human Neoplasia Advances in Brief Inactivation of the DNA Repair Gene O 6 - Methylguanine-DNA Methyltransferase by Prom. *Cancer Res* 1999;793–7.
25. Weller M, Stupp R, Reifenberger G, Brandes AA, Van Den Bent MJ, Wick W, Hegi ME. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: Ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol [Internet]* 2010;6:39–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2009.197>
26. Kreth S, Thon N, Eigenbrod S, Lutz J, Ledderose C, Egensperger R, Tonn JC, Kretzschmar HA, Hinske LC, Kreth FW. O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) mRNA expression predicts outcome in malignant glioma independent of MGMT promoter methylation. *PLoS One* 2011;6.

27. Gramatzki D, Dehler S, Rushing EJ, Zaugg K, Hofer S, Yonekawa Y, Bertalanffy H, Valavanis A, Korol D, Rohrmann S, Pless M, Oberle J, et al. Glioblastoma in the Canton of Zurich, Switzerland revisited: 2005 to 2009. *Cancer* 2016;122:2206–15.
28. Uno M, Oba-Shinjo SM, Camargo AA, Moura RP, Aguiar PH de, Cabrera HN, Begnami M, Rosemberg S, Teixeira MJ, Marie SKN. Correlation of MGMT promoter methylation status with gene and protein expression levels in glioblastoma. *Clinics [Internet]* 2011;66:1747–55. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1807-59322011001000013&lng=en&nrm=iso&tlng=en
29. Erasmus H, Gobin M, Niclou S, Van Dyck E. DNA repair mechanisms and their clinical impact in glioblastoma. *Mutat Res Mutat Res [Internet]* 2016;769:19–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.05.005>
30. Bady P, Hegi ME. Sensitivity Analysis of the MGMT-STP27 Model and Impact of Genetic and Epigenetic Context to Predict the MGMT Methylation Status in Gliomas and Other Tumors. *J Mol Diagnostics [Internet]* 2016;18:350–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.11.009>
31. Koochekpour S, Majumdar S, Azabdaftari G, Attwood K, Scioneaux R, Subramani D, Manhardt C, Lorusso GD, Willard SS, Thompson H, Shourideh M, Rezaei K, et al. Serum glutamate levels correlate with Gleason score and glutamate blockade decreases proliferation, migration, and invasion and induces apoptosis in prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 2012;18:5888–901.
32. Zhang C, Yuan XR, Li HY, Zhao ZJ, Liao YW, Wang XY, Su J, Sang SS, Liu Q. Anti-cancer effect of metabotropic glutamate receptor 1 inhibition in human glioma U87 Cells: Involvement of PI3K/Akt/mTOR pathway. *Cell Physiol Biochem* 2015;35:419–32.

33. Jantas D, Grygier B, Gołda S, Chwastek J, Zatorska J, Tertel M. An endogenous and ectopic expression of metabotropic glutamate receptor 8 (mGluR8) inhibits proliferation and increases chemosensitivity of human neuroblastoma and glioma cells. *Cancer Lett* 2018;432:1–16.
34. Yang W, Maolin H, Jinmin Z, Zhe W. High expression of metabotropic glutamate receptor 4: Correlation with clinicopathologic characteristics and prognosis of osteosarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2014;140:419–26.
35. Chang HJ, Yoo BC, Lim SB, Jeong SY, Kim WH, Park JG. Metabotropic glutamate receptor 4 expression in colorectal carcinoma and its prognostic significance. *Clin Cancer Res* 2005;11:3288–95.
36. Sun Y, Zhang W, Chen D, Lv Y, Zheng J, Lilljebjörn H, Ran L, Bao Z, Sonesson C, Sjögren HO, Salford LG, Ji J, et al. A glioma classification scheme based on coexpression modules of EGFR and PDGFRA. *Proc Natl Acad Sci [Internet]* 2014;111:3538–43. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1313814111>
37. Yan W, Zhang W, You G, Zhang J, Han L, Bao Z, Wang Y. Molecular classification of gliomas based on whole genome gene expression : a systematic. 2012;14:1432–40.
38. Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, Campos B, Nounshmehr H, Salama SR, Zheng S, Chakravarty D, Sanborn JZ, Berman SH, Beroukhim R, Bernard B, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 2013;155:462–77.
39. Brooks WH, Markesbery WR, Gupta GD, Roszman TL. Relationship of lymphocyte invasion and survival of brain tumor patients. *Ann Neurol [Internet]* 1978;4:219–24. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ana.410040305>
40. De Vleeschouwer S, Bergers G. Glioblastoma: To Target the Tumor Cell or the Microenvironment? [Internet]. Codon Publications, 2017 [cited 2019 Jan 31]. Available

from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29251862>

41. Han S, Zhang C, Li Q, Dong J, Liu Y, Huang Y, Jiang T, Wu A. Tumour-infiltrating CD4+and CD8+lymphocytes as predictors of clinical outcome in glioma. *Br J Cancer* 2014;110:2560–8.
42. Fallarino F, Volpi C, Fazio F, Notartomaso S, Vacca C, Busceti C, Biciato S, Battaglia G, Bruno V, Puccetti P, Fioretti MC, Nicoletti F, et al. Metabotropic glutamate receptor-4 modulates adaptive immunity and restrains neuroinflammation. *Nat Med [Internet]* 2010;16:897–902. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2183>

Table 1. Clinical Profile of the patients selected from TCGA and CGGA

| | TCGA | CGGA |
|---|----------------------|-----------|
| Selected Patients – n (%) | 219 (100) | 108 (100) |
| Age at time diagnosis - years | | |
| Median | 57 | 51 |
| Range | 10 – 86 | 13 – 70 |
| Gender – n (%) | | |
| Female | 78 (36) | 42 (39) |
| Male | 141 (64) | 66 (61) |
| KPS | | |
| ≥ 80 | 183 (84) | - |
| < 80 | 36 (16) | - |
| Timing KPS – n (mode; range) (%) | | |
| Preoperative | 64 (80; 60-80) (29) | - |
| Pre-Adjuvant Therapy | 63 (80; 40-100) (29) | - |
| Post-Adjuvant Therapy | 35 (80; 20-100) (16) | - |
| Other | 13 (80; 60-100) (6) | - |
| Not informed | 44 (80; 60-100) (9) | - |
| Race – n (%) | | |
| White | 192 (88) | - |
| Other | 27 (12) | - |
| Extent of surgery – n (%) | | |
| Excisional biopsy | 35 (16) | - |
| Tumor resection | 184 (84) | - |
| New tumor event – n (%) | | |
| Recurrence | 66 (30) | - |
| Progression | 143 (65) | - |
| Recurrence + Progression | 3 (1) | - |
| Mestasis + Progression | 1 (0) | - |
| Not informed | 6 (3) | - |
| Tumor IDH Status – n (%) | | |
| Wild-type | 129 (59) | - |
| Mutation | 9 (4) | - |
| Not informed | 81 (37) | - |
| Adjuvant Chemotherapy – n (%) | | |
| Received TMZ | 162 (74) | - |
| Not received TMZ | 57 (26) | - |

n: number of patients; %: percentage of patients; KPS: Karnofsky Performance Score; IDH: isocitrate deshydrogenase.

Figure 1

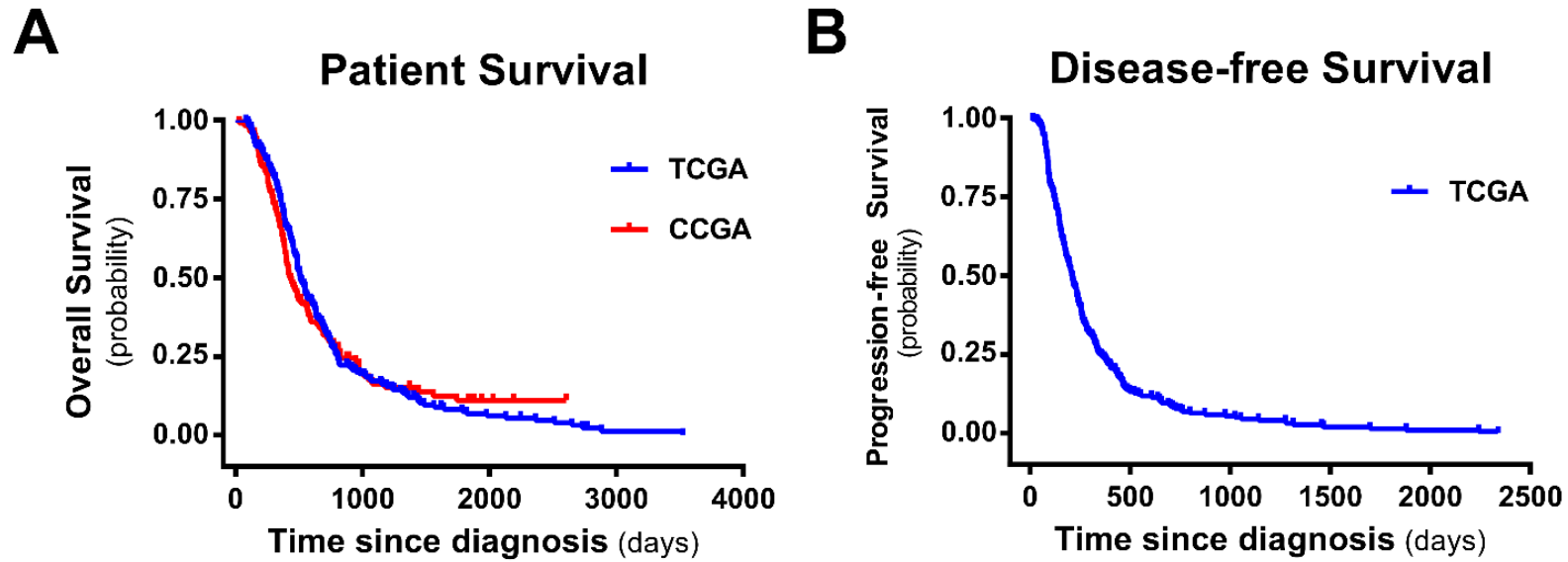


Figure 1. Overall survival and progression-free survival of GBM patients from TCGA and CGGA. (A) overall survival probabilities of 219 GBM-patients from TCGA (blue line) and 108 GBM-patients from CGGA (red line) days after diagnosis. (B) progression-free survival probabilities of 219 GBM- patients from TCGA (blue line) days after diagnosis.

Figure 2

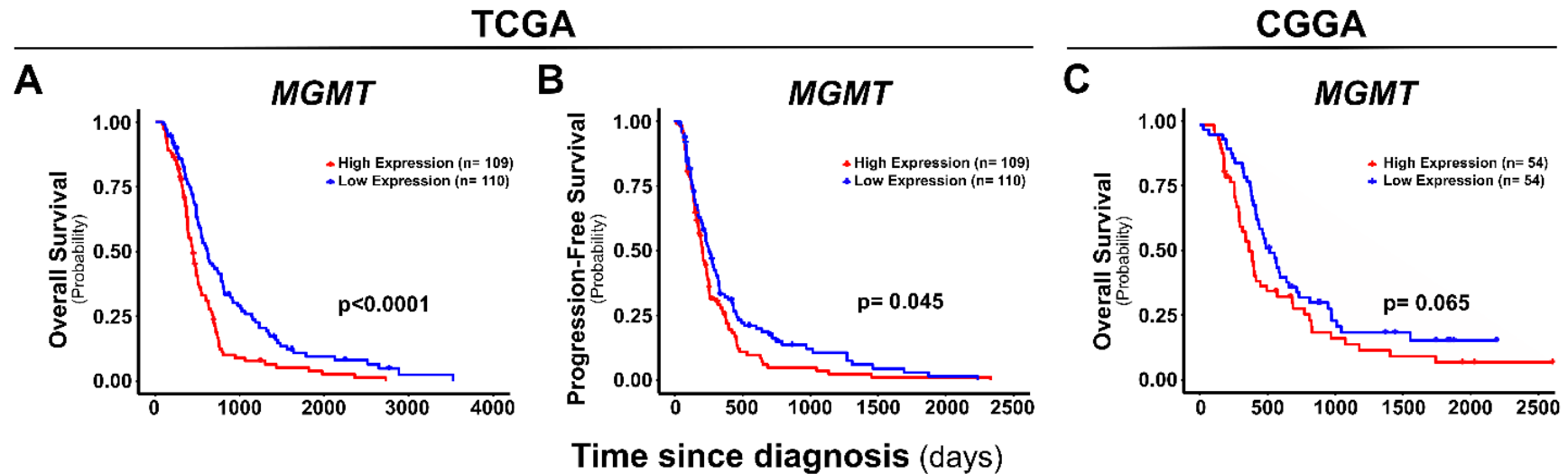


Figure 2. Kaplan-Meier estimates of overall survival and progression-free survival from groups of GBM-patients with high- and low-expression of *MGMT*. Kaplan-Meier analysis indicated that the group of TCGA-GBM patients with high-expression of *MGMT* (red) (n=109 patients) have a lower overall survival probability (A) ($p < 0.0001$) and progression-free survival probability (B) compared to the group with low-expression of *MGMT* (blue) (n=110 patients). Kaplan-Meier analysis also indicated that the group of CGGA-GBM patients with high-expression of *MGMT* (red) (n=109 patients) have a lower overall survival probability (C) compared to the group with low-expression of *MGMT* (blue), but without significant difference ($p = 0.065$). Statistical analysis with log-rank tests considering a significant level as p-value < 0.05 .

Table 2. Multivariate Cox Analysis of Clinical Features and *MGMT*-mRNA Expression from TCGA's and CGGA's GBM Patients

| | TCGA | | | | CGGA | |
|--------------------|--------------------|----------------|---------------------------|--------------|--------------------|--------------|
| | Overall Survival | | Progression-Free Survival | | Overall Survival | |
| | HR (95% CI) | p-value | HR (95% CI) | p-value | HR (95% CI) | p-value |
| Age | 1.02 (1.01 - 1.03) | 0.00045 | 1.01 (1.00 - 1.03) | 0.008 | 1.03 (1.01 - 1.04) | 0.008 |
| Gender | 1.26 (0.93 - 1.73) | 0.140 | 1.02 (0.76 - 1.37) | 0.880 | 1.06 (0.69 - 1.63) | 0.786 |
| Race | 1.20 (0.76 - 1.91) | 0.435 | 0.82 (0.54 - 1.25) | 0.353 | - | - |
| KPS | 0.99 (0.98 - 1.00) | 0.075 | 0.99 (0.98 - 1.01) | 0.317 | - | - |
| <i>MGMT</i> | 1.87 (1.38 - 2.55) | 0.00006 | 1.35 (1.02 - 1.78) | 0.036 | 1.54 (1.01 - 2.36) | 0.045 |

p-value <0.05 is considered significant

TCGA: The Cancer Genome Atlas; CGGA: Chinese Genome Glioma Atlas; HR: hazard ratio; KPS: Karnofsky Performance Score; *MGMT*: O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase

Table 3. Multivariate Cox Analysis of Clinical Features and *MGMT*- and *GRM*-mRNA Expression from TCGA's and CGGA's GBM Patients

| | TCGA | | | | CGGA | |
|--------------------|--------------------|----------------|---------------------------|--------------|--------------------|---------------|
| | Overall Survival | | Progression-Free Survival | | Overall Survival | |
| | HR (95% CI) | p-value | HR (95% CI) | p-value | HR (95% CI) | p-value |
| Age | 1.02 (1.01 - 1.04) | 0.00004 | 1.02 (1.00 - 1.03) | 0.004 | 1.03 (1.01 - 1.04) | 0.0065 |
| Gender | 1.15 (0.84 - 1.58) | 0.369 | 0.97 (0.72 - 1.31) | 0.844 | 1.14 (0.74 - 1.77) | 0.547 |
| Race | 1.13 (0.71 - 1.78) | 0.615 | 0.78 (0.51 - 1.19) | 0.256 | - | - |
| KPS | 0.99 (0.98 - 1.01) | 0.242 | 1.00 (0.98 - 1.01) | 0.500 | - | - |
| <i>MGMT</i> | 1.87 (1.38 - 2.55) | 0.00006 | 1.35 (1.02 - 1.78) | 0.036 | 1.54 (1.01 - 2.36) | 0.045 |
| <i>GRM1</i> | 1.08 (0.64 - 1.81) | 0.769 | 1.02 (0.64 - 1.64) | 0.922 | 0.89 (0.72 - 1.10) | 0.280 |
| <i>GRM2</i> | 1.05 (0.80 - 1.36) | 0.739 | 1.07 (0.84 - 1.37) | 0.572 | 0.98 (0.74 - 1.32) | 0.918 |
| <i>GRM3</i> | 0.89 (0.71 - 1.10) | 0.279 | 0.90 (0.73 - 1.12) | 0.352 | 0.97 (0.78 - 1.20) | 0.768 |
| <i>GRM4</i> | 1.41 (1.04 - 1.90) | 0.025 | 1.18 (0.89 - 1.56) | 0.260 | 0.94 (0.68 - 1.30) | 0.708 |
| <i>GRM5</i> | 0.87 (0.54 - 1.42) | 0.582 | 0.95 (0.83 - 1.85) | 0.832 | 0.85 (0.62 - 1.16) | 0.307 |
| <i>GRM6</i> | 1.23 (0.82 - 1.87) | 0.316 | 1.24 (0.83 - 1.85) | 0.295 | - | - |
| <i>GRM7</i> | 1.22 (0.82 - 1.81) | 0.320 | 1.23 (0.87 - 1.74) | 0.249 | 1.16 (0.91 - 1.48) | 0.229 |
| <i>GRM8</i> | 0.74 (0.55 - 0.99) | 0.041 | 0.75 (0.57 - 1.01) | 0.054 | 1.18 (0.94 - 1.48) | 0.154 |

p-value <0.05 is considered significant.

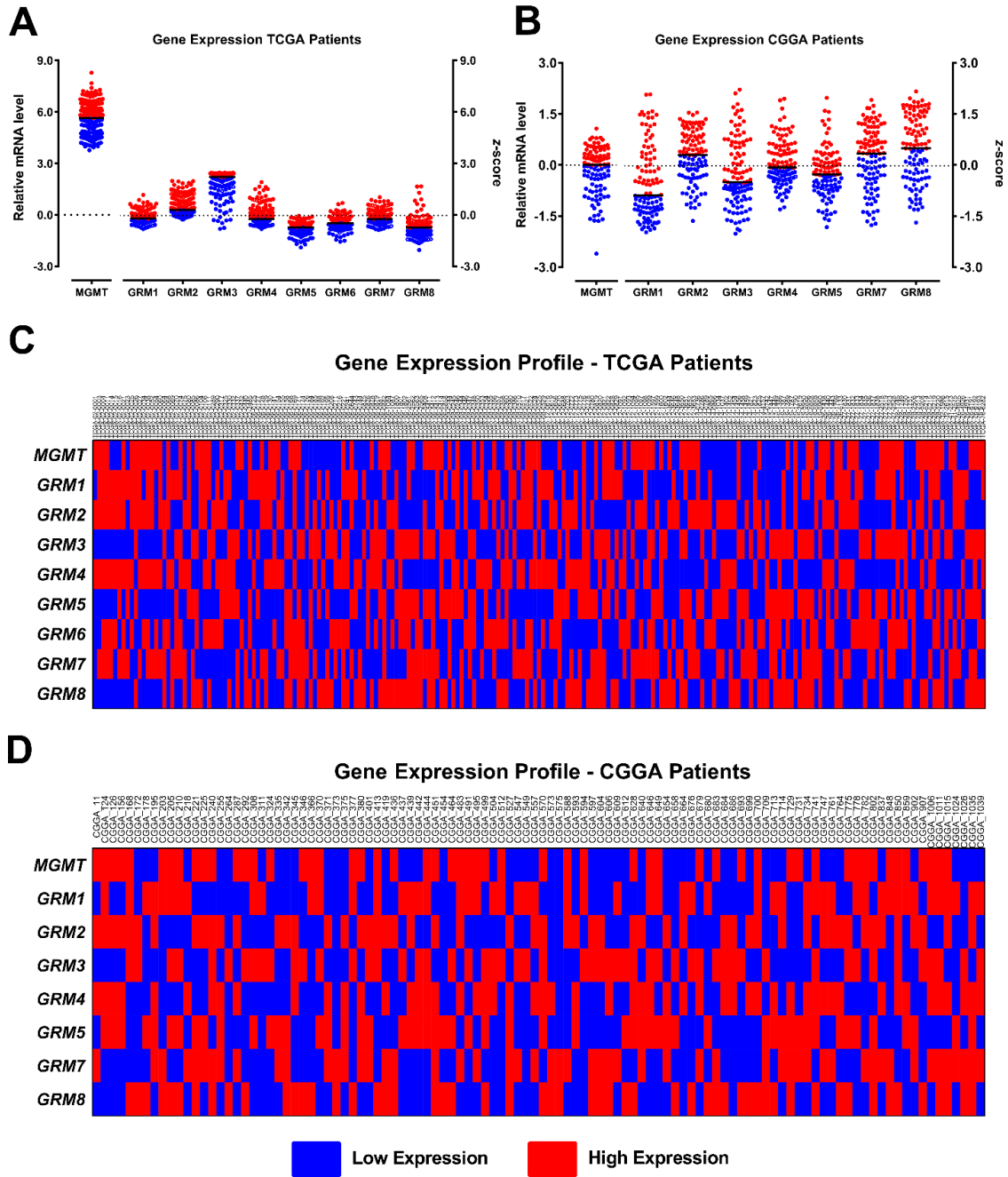
TCGA: The Cancer Genome Atlas; CGGA: Chinese Genome Glioma Atlas; HR: hazard ratio; KPS: Karnofsky Performance Score; *MGMT*: O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase; *GRM1-8*: metabotropic glutamate subtypes 1 – 8.

| Table 4. Multivariate Cox Analysis of Clinical Features and GRM-mRNA Expression in Groups of TCGA's and CGGA's GBM Patients with Low- and High-MGMT mRNA Expression | | | | | | | | | | | | |
|---|--------------------------|---------------|---------------------------|---------|---------------------------|-------------------|---------------------------|----------------|--------------------------|---------------|---------------------------|-------------------|
| | TCGA | | | | | | | | CGGA | | | |
| | Low-MGMT mRNA Expression | | | | High-MGMT mRNA Expression | | | | Low-MGMT mRNA Expression | | High-MGMT mRNA Expression | |
| | Overall Survival | | Progression-Free Survival | | Overall Survival | | Progression-Free Survival | | Overall Survival | | Overall Survival | |
| | HR (95% CI) | p-value | HR (95% CI) | p-value | HR (95% CI) | p-value | HR (95% CI) | p-value | HR (95% CI) | p-value | HR (95% CI) | p-value |
| Age | 1.01 (0.99 - 1.03) | 0.184 | 1.01 (0.99 - 1.02) | 0.289 | 1.04 (1.02 - 1.06) | 0.00006*** | 1.02 (1.01 - 1.04) | 0.006** | 1.00 (0.97 - 1.02) | 0.773 | 1.06 (1.03 - 1.09) | 0.00022*** |
| Gender | 1.35 (0.87 - 2.10) | 0.187 | 1.05 (0.69 - 1.60) | 0.810 | 0.99 (0.63 - 1.56) | 0.966 | 0.95 (0.62 - 1.46) | 0.817 | 0.98 (0.52 - 1.85) | 0.940 | 1.67 (0.91 - 3.08) | 0.100 |
| Race | 1.37 (0.71 - 2.62) | 0.344 | 0.92 (0.52 - 1.61) | 0.767 | 0.95 (0.49 - 1.84) | 0.872 | 0.56 (0.29 - 1.06) | 0.075 | - | - | - | - |
| KPS | 0.98 (0.96 - 1.00) | 0.058 | 0.99 (0.97 - 1.00) | 0.103 | 1.00 (0.98 - 1.02) | 0.920 | 1.00 (0.99 - 1.02) | 0.608 | - | - | - | - |
| GRM1 | 1.24 (0.62 - 2.49) | 0.540 | 1.26 (0.66 - 2.41) | 0.475 | 0.81 (0.35 - 1.86) | 0.623 | 0.78 (0.37 - 1.63) | 0.511 | 0.73 (0.53 - 0.99) | 0.043* | 1.11 (0.83 - 1.48) | 0.481 |
| GRM2 | 1.18 (0.77 - 1.79) | 0.447 | 1.12 (0.75 - 1.68) | 0.582 | 0.93 (0.65 - 1.31) | 0.667 | 1.04 (0.76 - 1.41) | 0.814 | 1.24 (0.77 - 2.00) | 0.383 | 0.74 (0.49 - 1.12) | 0.160 |
| GRM3 | 0.96 (0.66 - 1.41) | 0.853 | 0.92 (0.61 - 1.39) | 0.707 | 0.86 (0.64 - 1.14) | 0.294 | 0.92 (0.70 - 1.19) | 0.523 | 1.01 (0.73 - 1.42) | 0.932 | 0.98 (0.71 - 1.34) | 0.877 |
| GRM4 | 1.07 (0.67 - 1.70) | 0.776 | 0.88 (0.56 - 1.38) | 0.566 | 1.70 (1.12 - 2.58) | 0.012* | 1.43 (0.99 - 2.06) | 0.055 | 0.80 (0.48 - 1.33) | 0.387 | 0.93 (0.61 - 1.42) | 0.726 |
| GRM5 | 1.12 (0.52 - 2.43) | 0.777 | 1.27 (0.65 - 2.48) | 0.476 | 0.93 (0.48 - 1.81) | 0.841 | 0.93 (0.49 - 1.77) | 0.821 | 0.82 (0.56 - 1.22) | 0.336 | 0.87 (0.48 - 1.56) | 0.635 |
| GRM6 | 1.40 (0.86 - 2.28) | 0.171 | 1.42 (0.86 - 2.33) | 0.168 | 0.72 (0.32 - 1.63) | 0.433 | 0.78 (0.37 - 1.66) | 0.523 | - | - | - | - |
| GRM7 | 0.91 (0.53 - 1.57) | 0.733 | 0.96 (0.60 - 1.56) | 0.883 | 1.66 (0.89 - 3.10) | 0.113 | 1.60 (0.90 - 2.84) | 0.111 | 1.24 (0.86 - 1.78) | 0.256 | 1.02 (0.72 - 1.45) | 0.912 |
| GRM8 | 0.61 (0.39 - 0.97) | 0.035* | 0.74 (0.49 - 1.12) | 0.157 | 0.91 (0.62 - 1.34) | 0.626 | 0.75 (0.50 - 1.14) | 0.176 | 1.38 (1.00 - 1.90) | 0.051 | 1.16 (0.84 - 1.59) | 0.368 |

p-value <0.05 is considered significant.

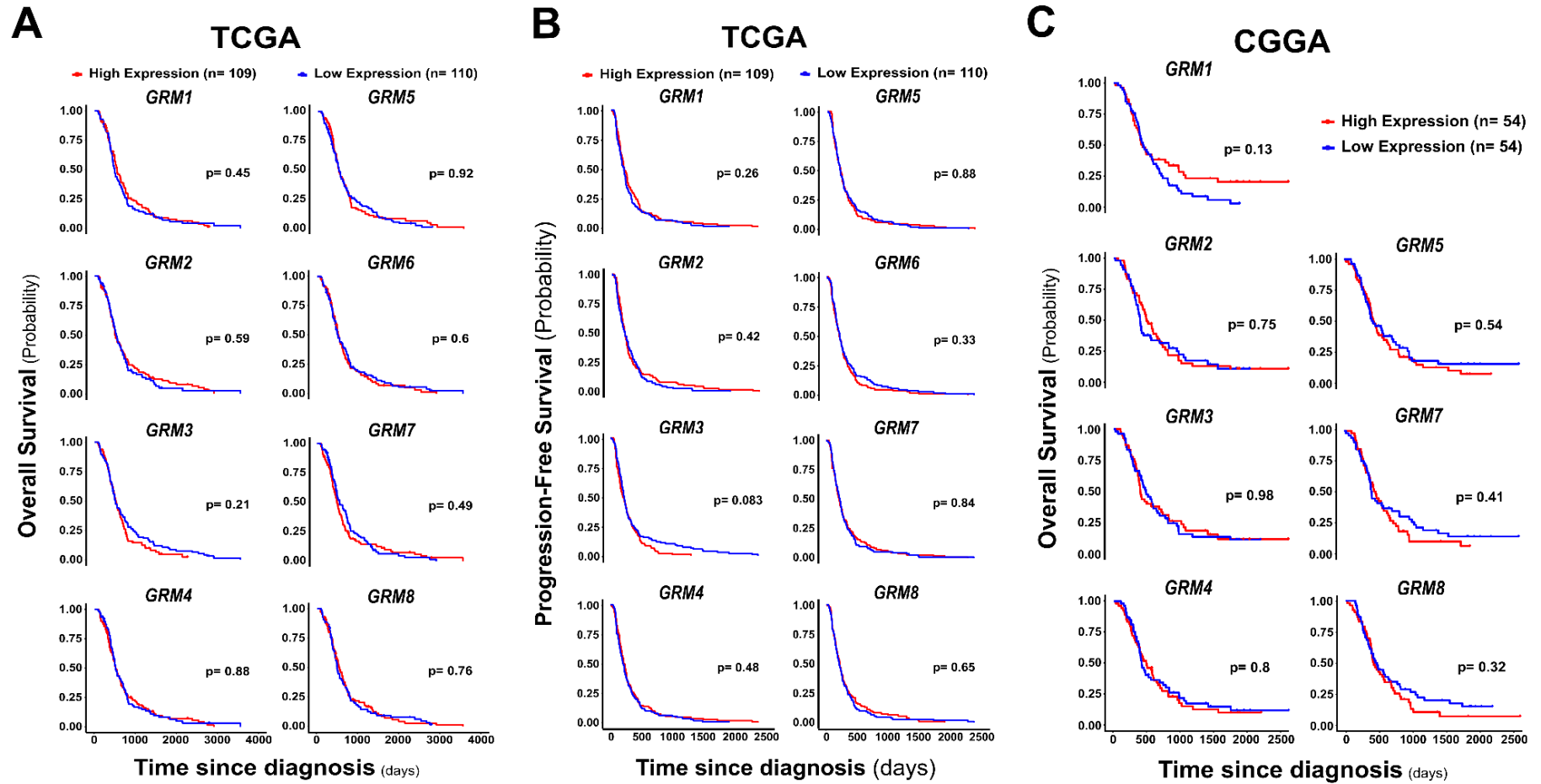
TCGA: The Cancer Genome Atlas; CGGA: Chinese Genome Glioma Atlas; HR: hazard ratio; KPS: Karnofsky Performance Score; MGMT: O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase; GRM1-8: metabotropic glutamate subtypes 1 – 8.

Supplementary Figure 1



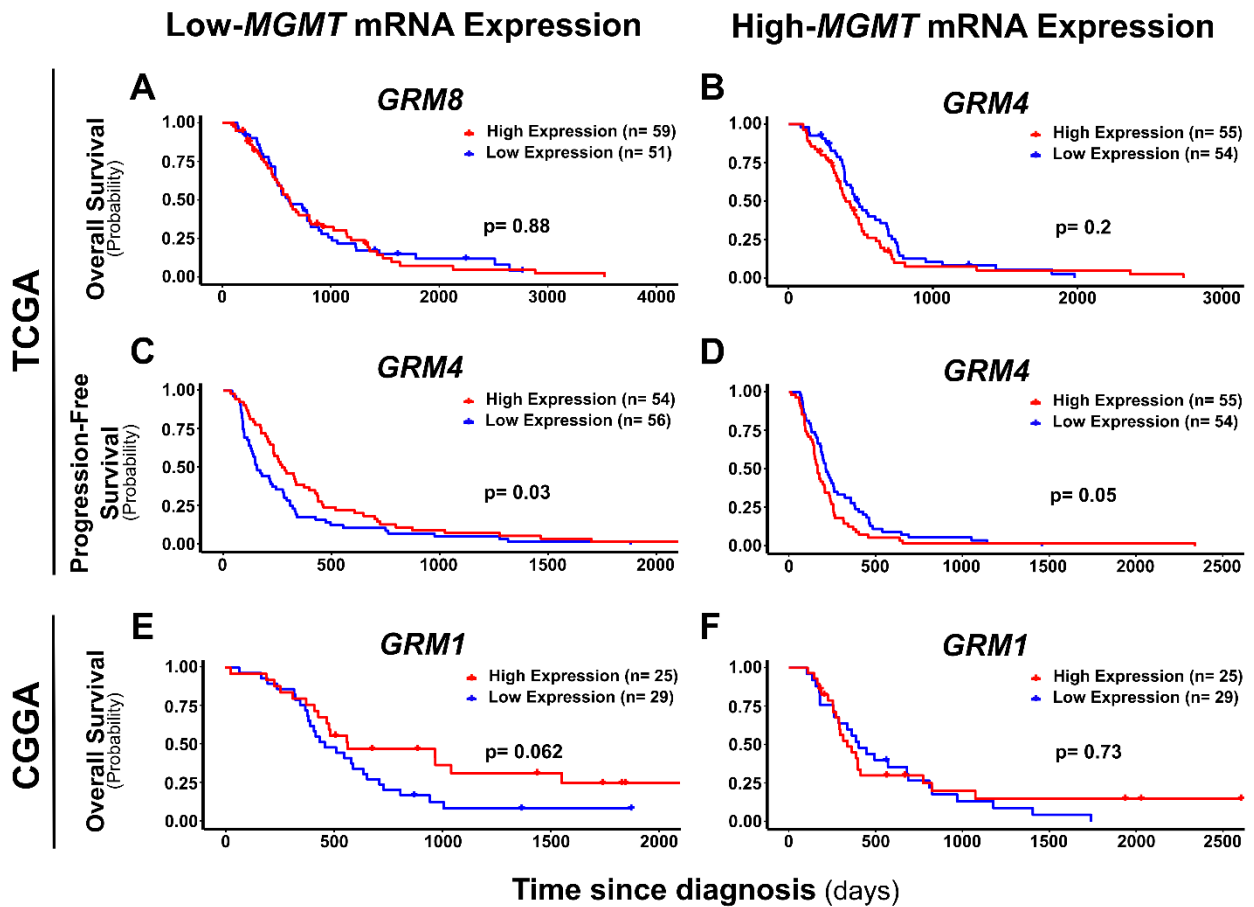
Supplementary Figure 1. *MGMT* and *GRM* gene-expression profile of GBM patients from TCGA and CGGA. The z-score of *GRM1-8* and *MGMT* relative mRNA level from TCGA (A) and CGGA (B) patients were divided by their median. For each gene, TCGA (C) and CGGA (D) patients were labeled as high-expression (red) for expression values above the median (values >50%), while patients were labeled as low-expression (blue) for expression value below median (values ≤50%).

Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 2. Kaplan-Meier estimates of overall survival and progression-free survival from groups of GBM-patients with high- and low-expression of *GRM1-8*. Kaplan-Meier analysis indicates that there is no significant differences in the overall survival probabilities (A) and progression-free survival probabilities (B) between groups of TCGA-GBM patients with high-expression (red) (n=109 patients) and low-expression (blue) (n=110 patients) of *GRM1, 2, 3, 4, 5, 6, 7* and 8. Kaplan-Meier analysis also indicates that there is no significant differences in the overall survival probabilities (C) days after diagnosis between groups of CGGA-GBM patients with high-expression (red) (n=54 patients) and low-expression (blue) (n=54 patients) of *GRM 1, 2, 3, 4, 5, 7* and 8. Statistical analysis with log-rank tests considering a significant level as p-value <0.05.

Supplementary figure 3



Supplementary Figure 3. Kaplan-Meier estimates of overall survival and progression-free survival from groups of GBM-patients with high- and low-expression of *MGMT* and *GRM*. In GBM-patients with low-expression of *MGMT*, Kaplan-Meier analysis indicates that there are no significant differences between overall survival probabilities of subgroups with high-expression (red) and low-expression (blue) of *GRM8*(A) and *GRM1*(B) from TCGA and CGGA patients, respectively. In GBM-patients with high-expression of *MGMT*, Kaplan-Meier analysis also indicates no significant differences between overall survival probabilities of subgroups with high-expression (red) and low-expression (blue) of *GRM4*(A) and *GRM1*(B) from TCGA and CGGA patients, respectively. Regarding progression-free survival probabilities, subgroup of *GRM4* low-expression (blue) has a lower probability (C) than the subgroup with *GRM4* high-

expression (red) ($p=0.03$) in patients with low-expression of *MGMT*; while subgroup of *GRM4* high-expression (blue) has a lower probability (C) than the subgroup with *GRM4* low-expression (red) ($p=0.05$) in patients with high-expression of *MGMT*. Statistical analysis with log-rank tests considering a significant level as p-value <0.05 .

PARTE III

DISCUSSÃO

Ser diagnosticado com glioblastoma é praticamente receber uma sentença de morte para os pacientes que são acometidos por essa doença. Mesmo submetidos a um intenso regime de tratamento com remoção cirúrgica do tumor, radioterapia e vários ciclos de quimioterapia com TMZ, a sobrevida média dos pacientes não passa dos 15 meses, sendo que só 5,6% deles sobrevivem até cinco anos após o diagnóstico (OSTROM et al., 2018; STUPP et al., 2005; WELLER et al., 2014). Esse desfecho fatal está relacionado ao fato de o GBM ser um tumor infiltrativo, resistente ao tratamento convencional e, em quase todos os casos, recorrente.

A dificuldade de tratar o GBM estimulou pesquisadores na última década a investigarem o genoma e transcriptoma desse tipo de tumor, visando entender melhor sua origem e buscando por marcadores moleculares que possam vir a auxiliar no seu diagnóstico e tratamento. Dessa necessidade, surgiram projetos ambiciosos, como o TCGA e CGGA, que analisaram o perfil de mutação, metilação e expressão gênica de GBMs em larga escala (BRENNAN et al., 2013; SUN et al., 2014). Dentre os marcadores moleculares investigados ao longo dos anos, os que mais tiveram êxito, e são hoje aplicados na rotina clínica, são o status de mutação do IDH e de metilação do promotor do *MGMT*. O IDH é um biomarcador empregado no diagnóstico do GBM, enquanto o *MGMT* é um biomarcador preditivo para o tratamento do GBM (WESSELING; CAPPER, 2018; WIRSCHING; GALANIS; WELLER, 2016). Pacientes com GBM, cujo tumor é identificado com metilação no promotor da *MGMT*, beneficiam-se da quimioterapia com TMZ em comparação aos que tem promotor desmetilado (HEGI et al., 2005). Infelizmente, somente 30 a 65% dos GBM apresentam metilação no promotor do *MGMT* (WELLER et al., 2010). A alta heterogeneidade do tumor impede que boa parte dos pacientes se beneficie dos marcadores já utilizados, por esse motivo se faz necessária a busca por marcadores moleculares mais abrangentes.

Apesar de presente em vários tumores malignos e associada ao desfecho de pacientes, a expressão dos receptores de glutamato metabotrópicos (mGluR) e sua associação com o desfecho dos pacientes tem sido pouco investigada em GBM (CICERONI et al., 2013; STEPULAK et al., 2014; TEH; CHEN, 2012; YU et al., 2017). Portanto, nosso grupo de pesquisa decidiu investigar o valor prognóstico da expressão gênica dos oito subtipos de mGluR, utilizando dados clínicos e de transcriptômica tumoral de pacientes com GBM obtidos do banco de dados do TCGA e CGGA. No **capítulo I** desta dissertação encontra-se o manuscrito a ser submetido para publicação com os resultados deste estudo.

Através da análise dos dados da expressão gênica obtida por microarranjo, podemos observar que, na coorte do TCGA, a expressão gênica dos subtipos 4 e 8 dos mGluR (*GRM4* e *GRM8*) está associada ao desfecho dos pacientes independentemente do impacto de covariáveis clínicas. Na mesma coorte, levando em consideração o nível de expressão gênica de *MGMT*, observamos que, em tumores com alta expressão de *MGMT*, o aumento da expressão gênica do *GRM4* aumenta o risco de morte dos pacientes em até 70%; enquanto que em tumores com baixa expressão de *MGMT*, o aumento da expressão gênica do *GRM8* reduz o risco de morte dos pacientes em até 39%. Já nos pacientes do CGGA, o aumento da expressão gênica do *GRM1* em pacientes com baixa expressão de *MGMT* reduz o risco de morte dos pacientes em até 27%.

Diferentemente dos resultados encontrados por Ciceroni *et. al.* (2013), o *GRM3* não apresentou um valor prognóstico, independentemente do nível de expressão do *MGMT* (CICERONI et al., 2013). Os motivos que podem vir a explicar esses resultados contrastantes observados entre as três coortes podem ser: a alta heterogeneidade do GBM, o tamanho das coortes, as diferentes origens étnicas e espaciais dos pacientes, as diferentes plataformas de microarranjo utilizadas e falta de algumas informações clínicas dos pacientes do CGGA. Cabe também destacar, que esse estudo foi o único que investigou o valor prognóstico dos mGluRs

em pacientes com GBM, sendo que ele investigou somente o *GRM3* (mGluR3)(CICERONI et al., 2013).

A alta expressão de *GRM4* e sua associação com prognóstico ruim pode ser consequência de células imunes que infiltram o tumor. O GBM é comumente infiltrado por linfócitos periféricos que expressam marcadores CD4+ e CD8+. A combinação de altos níveis de linfócitos CD4+ e baixos níveis de linfócitos CD8+ são fatores preditivos independentes para um desfecho ruim em pacientes com GBM. Dentre os linfócitos CD4+, os linfócitos Foxp3+ são encontrados somente em GBM (HAN et al., 2014). Em camundongos, os linfócitos CD4+ Foxp3+ que infiltram o cérebro dos animais expressam altos níveis de *GRM4*, e esse nível de expressão aumenta quando os linfócitos são ativados (FALLARINO et al., 2010). A alta expressão de *GRM4* e sua associação com prognóstico ruim de pacientes com GBM, indicada por nossos resultados, pode ser decorrente da expressão desse gene também em linfócitos CD4+Foxp3+ que infiltram o tumor. Isso abre espaço para se investigar melhor o papel dos mGluR em linfócitos CD4+ e o seu envolvimento com GBM.

Além disso, nosso trabalho confirmou nas duas coortes estudadas o que a literatura especulava qual seja: a expressão gênica do *MGMT* é um fator prognóstico independente. Baixos níveis de mRNA do *MGMT* estão associados a uma longa sobrevida e uma longa sobrevivência livre de doença quando comparado com a sobrevivência de pacientes cujos tumores possuem altos níveis de expressão do *MGMT* (KRETH et al., 2011). A metilação do promotor do *MGMT* é comumente utilizada na clínica como um marcador preditivo para o tratamento de GBM e em trabalhos que estudam a biologia e quimiorresistência dessa neoplasia, por inferir-se que a metilação do gene diminuiria os níveis de expressão gênica e proteica do *MGMT*, o que facilitaria a ação alquilante do TMZ (ESTELLER et al., 1999; HEGI et al., 2005; WELLER et al., 2010). Entretanto, nem sempre a metilação do promotor do *MGMT* diminui a expressão da enzima ou a não-metilação do promotor aumenta a sua expressão (KRETH et al.,

2011; UNO et al., 2011). Isso pode vir a acontecer, pois o gene da MGMT é regulado por outros fatores intracelulares, além da metilação do promotor (ERASIMUS et al., 2016). Neste trabalho nós mostramos que o nível de expressão gênica tem o mesmo caráter prognóstico que o nível de metilação do promotor do gene para a MGMT, ambos sendo fatores prognósticos independentes para pacientes com GBM.

Nossos resultados também indicaram uma possível associação entre os baixos níveis de expressão de mGluR8 e MGMT. Um estudo *in vitro* mostrou que a *downregulation* do mGluR8 em clones da linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y foi capaz de conferir resistência à ação citotóxica da estaurosporina, doxorubicina, irinitecan e cisplatina. Além disso, esses clones apresentaram baixa atividade catalítica da GSK-3 β e calpainas, aumento do nível citosólico de β -catenina e baixa expressão de Akt e JNK-p46 (JANTAS et al., 2018). O nível de expressão gênica e proteica do MGMT é regulado positivamente por fatores de transcrição como NF-kB, via das JNK quinases, via Wnt/ β -catenina, NDRG1, entre outros (ERASIMUS et al., 2016; WICKSTRÖM et al., 2015); enquanto que a via da Akt e β -catenina está superativada em células resistentes ao TMZ (YI et al., 2016). Considerando essas evidências, podemos inferir que uma diminuição *in vitro* nos níveis de mGluR8 estaria relacionada uma menor expressão de MGMT, o que levaria uma maior sensibilidade das células ao quimioterápico TMZ. Esse mesmo estudo também avaliou a superexpressão do GRM8 em células da linhagem de glioblastoma U87-MG, onde constatou-se que uma alta expressão desse gene estaria associada a uma elevada proliferação celular. Porém, nenhuma via de sinalização foi avaliada, muito menos a expressão de MGMT (JANTAS et al., 2018). Entretanto, as células da linhagem U87-MG expressam naturalmente níveis elevados de GRM8, quando comparado com outros GRM, e não expressam MGMT *in vitro* (ALONSO et al., 2007). Esses achados *in vitro* e combinados com nossos resultados clínicos indicam uma possível associação entre expressão de GRM8 e MGMT.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Através desse trabalho podemos concluir que os mGluR não possuem um valor prognóstico forte o suficiente para poder prever de maneira consolidada o desfecho dos pacientes com GBM. Primeiramente, seria interessante investigar em outras coortes de pacientes com GBM, especialmente compostas por pacientes de diferentes países e etnias, a fim de se investigar melhor a relação entre os *GRM* e *MGMT*.

Além disso, pouco se sabe sobre as vias de sinalização desencadeadas pela ativação dos mGluR em GBM, principalmente os do grupo III, no qual estão inclusos os subtipos 4 e 8. Contudo, indícios apresentados na literatura juntamente com os achados do nosso trabalho indicam uma possível interação entre mGluR4 e 8 e a expressão da enzima de reparo *MGMT*. Para esclarecer essa interação e possibilitar um melhor entendimento do papel desses receptores na resistência do GBM à quimioterapia, são necessários experimentos biológicos em modelo celular e animal para validar nossos resultados *in silico*.

REFERÊNCIAS

- ALMENDRO, Vanessa; MARUSYK, Andriy; POLYAK, Kornelia. Cellular Heterogeneity and Molecular Evolution in Cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 277–302, 2013. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-pathol-020712-163923>>
- ALONSO, Marta M. et al. Adenovirus-based strategies overcome temozolomide resistance by silencing the O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter. **Cancer Research**, [s. l.], v. 67, n. 24, p. 11499–11504, 2007.
- ARCELLA, Antonietta et al. Pharmacological blockade of group II metabotropic glutamate receptors reduces the growth of glioma cells in vivo. **Neuro-Oncology**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 236–245, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1215/S1152851704000961>>
- AUM, Diane J. et al. Molecular and cellular heterogeneity: the hallmark of glioblastoma. **Neurosurgical Focus**, [s. l.], v. 37, n. December, p. 1–11, 2014.
- BEHRENS, P. F. et al. Extracellular glutamate and other metabolites in and around RG2 rat glioma: An intracerebral microdialysis study. **Journal of Neuro-Oncology**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 11–22, 2000.
- BOWIE, Derek. Iontropic Glutamate Receptors & CNS Disorders. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 129–143, 2008. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5273&volume=7&issue=2&spage=129>>
- BRENNAND, J.; MARGISON, G. P. Reduction of the toxicity and mutagenicity of alkylating agents in mammalian cells harboring the Escherichia coli alkyltransferase gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 83, n. 17, p. 6292–6296, 1986. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3529080>>

CECCARELLI, Michele et al. Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. **Cell**, [s. l.], v. 164, n. 3, p. 550–563, 2016.

CHOI, Kyu Yeong et al. Expression of the metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) induces melanoma in transgenic mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, v. 108, n. 37, p. 15219–15224, 2011.

CICERONI, C. et al. Type-3 metabotropic glutamate receptors negatively modulate bone morphogenetic protein receptor signaling and support the tumorigenic potential of glioma-initiating cells. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 55, n. 4, p. 568–576, 2008.

CITRON, Marc et al. O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human normal and malignant lung tissues. **Cancer Investigation**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 258–263, 1993.

D'ONOFRIO, Mara et al. Pharmacological blockade of mGlu2/3 metabotropic glutamate receptors reduces cell proliferation in cultured human glioma cells. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 84, n. 6, p. 1288–1295, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01633.x>>

DE BLASI, Antonio et al. Molecular determinants of metabotropic glutamate receptor signaling. **Trends in Pharmacological Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 114–120, 2001. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165614700016357>>

FONNUM, Frode. Glutamate: A Neurotransmitter in Mammalian Brain. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 1–11, 1984. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.1984.tb09689.x>>

FRIEDMAN, H. S.; KERBY, T.; CALVERT, H. Temozolomide and treatment of malignant glioma. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, [s. l.], v. 6, n. 7, p. 2585–2597, 2000.

FRIEDMANN-MORVINSKI, Dinorah. Glioblastoma Heterogeneity and Cancer Cell Plasticity. **Critical Reviews in Oncogenesis**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 327–336, 2014.

GERSON, Stanton L. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. **Nat Rev Cancer**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 296–307, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrc1319>>

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, [s. l.], v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>>

HEADLEY, P. Ma.; GRILLNER, Sten. Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function. **Trends in Pharmacological Sciences**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 205–211, 1990. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016561479090116P>>

KEW, James N. C.; KEMP, John A. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 179, n. 1, p. 4–29, 2005. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00213-005-2200-z>>

LAPERRIERE, Normand; ZURAW, Lisa; CAIRNCROSS, Gregory. Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: A systematic review. **Radiotherapy and Oncology**, [s. l.], v. 64, n. 3, p. 259–273, 2002.

NICOLETTI, F. et al. Metabotropic glutamate receptors: From the workbench to the bedside. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 60, n. 7–8, p. 1017–1041, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.10.022>>

NOBUSAWA, Sumihito et al. IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 15, n. 19, p. 6002–6007, 2009.

NOUSHMEHR, Houtan et al. Identification of a CpG Island Methylator Phenotype that Defines a Distinct Subgroup of Glioma. **Cancer Cell**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 510–522, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2010.03.017>>

OHGAKI, Hiroko; KLEIHUES, Paul. The definition of primary and secondary glioblastoma.

Clinical Cancer Research, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 764–772, 2013.

PARK, So-Yeon et al. Clinical significance of metabotropic glutamate receptor 5 expression in oral squamous cell carcinoma. **Oncology reports**, Greece, v. 17, n. 1, p. 81–87, 2007.

PATEL, Anoop P. et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 344, n. 6190, p. 1396–401, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24925914>>

PHILLIPS, Heidi S. et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. **Cancer Cell**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 157–173, 2006.

POLLOCK, Pamela M. et al. Melanoma mouse model implicates metabotropic glutamate signaling in melanocytic neoplasia. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 108–112, 2003.

QIAN, Xilin C.; BRENT, Thomas P. Methylation Hot Spots in the 5' Flanking Region Denote Silencing of the O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Gene. **Cancer Research**, [s. l.], v. 57, p. 3672–3677, 1997.

QUINN, Jennifer A. et al. Phase II trial of temozolomide plus O6-benzylguanine in adults with recurrent, temozolomide-resistant malignant glioma. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 27, n. 8, p. 1262–1267, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19204199>>

RIBEIRO, Fabiola M. et al. Metabotropic glutamate receptors and neurodegenerative diseases. **Pharmacological Research**, [s. l.], v. 115, p. 179–191, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2016.11.013>>

RIEMENSCHNEIDER, Markus J.; HEGI, Monika E.; REIFENBERGER, Guido. MGMT promoter methylation in malignant gliomas. **Targ Oncol**, [s. l.], n. 5, p. 161–165, 2010.

SANAI, Nader et al. An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas. **Journal of Neurosurgery**, [s. l.], v. 115, n. 1, p. 3–8, 2011. Disponível em:

<<http://thejns.org/doi/10.3171/2011.2.JNS10998>>

SEVER, Richard; BRUGGE, Joan S. Signal transduction in cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 1–22, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0027510704002775>>

SHELDON, Amanda L.; ROBINSON, Michael B. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 51, n. 6–7, p. 333–355, 2007.

SONTHEIMER, Harald. Malignant gliomas: Perverting glutamate and ion homeostasis for selective advantage. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 26, n. 10, p. 543–549, 2003.

SPEYER, Cecilia L. et al. Metabotropic glutamate receptor-1: A potential therapeutic target for the treatment of breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, [s. l.], v. 132, n. 2, p. 565–573, 2012.

STEPULAK, Andrzej et al. Expression of glutamate receptor subunits in human cancers. **Histochemistry and Cell Biology**, [s. l.], v. 132, n. 4, p. 435–445, 2009.

STEPULAK, Andrzej et al. Glutamate and its receptors in cancer. **Journal of Neural Transmission**, [s. l.], v. 121, n. 8, p. 933–944, 2014.

STRATTON, Michael R.; CAMPBELL, Peter J.; FUTREAL, P. Andrew. The cancer genome. **Nature**, [s. l.], v. 458, n. 7239, p. 719–724, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature07943>>

TABATABAI, Ghazaleh et al. Molecular diagnostics of gliomas: The clinical perspective. **Acta Neuropathologica**, [s. l.], v. 120, n. 5, p. 585–592, 2010.

TAKANO, Takahiro et al. Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. **Nat Med**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. 1010–1015, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nm0901-1010>>

TURCAN, Sevin et al. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator

phenotype. **Nature**, [s. l.], v. 483, n. 7390, p. 479–483, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22343889>>

V. GOLUBEVA, Anna et al. Metabotropic Glutamate Receptors in Central Nervous System Diseases. **Current Drug Targets**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 538–616, 2016. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&iissn=1389-4501&volume=17&issue=5&spage=538>>

VAN NIFTERIK, K. A. et al. Absence of the MGMT protein as well as methylation of the MGMT promoter predict the sensitivity for temozolomide. **British Journal of Cancer**, [s. l.], v. 103, n. 1, p. 29–35, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6605712>>

VERHAAK, Roel G. W. W. et al. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer Cell**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 98–110, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>>

VOGELSTEIN, Bert; KINZLER, Kenneth W. Cancer genes and the pathways they control. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 789–799, 2004.

WATTS, G. S. et al. Methylation of discrete regions of the O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) CpG island is associated with heterochromatinization of the MGMT transcription start site and silencing of the gene. **Molecular and cellular biology**, [s. l.], v. 17, n. 9, p. 5612–9, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9271436>><<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC232409>>

WEILER, M. et al. mTOR target NDRG1 confers MGMT-dependent resistance to alkylating chemotherapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 111, n. 1, p. 409–414, 2014. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1314469111>>

WELLER, Michael et al. Standards of care for treatment of recurrent - are we there yet? [s. l.],

v. 15, n. 1, p. 4–27, 2013.

WICK, Wolfgang et al. MGMT testing - The challenges for biomarker-based glioma treatment. **Nature Reviews Neurology**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 372–385, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2014.100>>

WICKSTRÖM, Malin et al. Wnt/ β -catenin pathway regulates MGMT gene expression in cancer and inhibition of Wnt signalling prevents chemoresistance. **Nature Communications**, [s. l.], v. 6, 2015.

WILLARD, Stacey S.; KOOCHKPOUR, Shahriar. Glutamate, glutamate receptors, and downstream signaling pathways. **International Journal of Biological Sciences**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. 948–959, 2013. a.

WILLARD, Stacey S.; KOOCHKPOUR, Shahriar. Glutamate signaling in benign and malignant disorders: Current status, future perspectives, and therapeutic implications. **International Journal of Biological Sciences**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 728–742, 2013. b.

WILLIAMS, D. et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. **Science**, [s. l.], v. 321, n. September, p. 1807–1812, 2008.

YAN, Hai; PARSONS, Williams; JIN, Genglin. Mutations in Gliomas. **The New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 360, n. 8, p. 765–773, 2009.

YE, Z. C.; ROTHSTEIN, J. D.; SONTHEIMER, H. Compromised glutamate transport in human glioma cells: reduction-mislocalization of sodium-dependent glutamate transporters and enhanced activity of cystine-glutamate exchange. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, [s. l.], v. 19, n. 24, p. 10767–77, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10594060>>

YE, Zu Cheng; SONTHEIMER, Harald. Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate. **Cancer Research**, [s. l.], v. 59, n. 17, p. 4383–4391, 1999.

YI, Guo Zhong et al. Akt and β -catenin contribute to TMZ resistance and EMT of MGMT

negative malignant glioma cell line. **Journal of the Neurological Sciences**, [s. l.], v. 367, p. 101–106, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2016.05.054>>

YOO, Byong Chul et al. Metabotropic glutamate receptor 4-mediated 5-fluorouracil resistance in a human colon cancer cell line. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 10, n. 12 I, p. 4176–4184, 2004.

YU, Lumeng J. et al. **Metabotropic glutamate receptors in cancer** **Neuropharmacology**, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028390816300466>>

ZHOU, Kun et al. MGlu3 receptor blockade inhibits proliferation and promotes astrocytic phenotype in glioma stem cells. **Cell Biology International**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 426–434, 2014.