

Catarina Rosa e Silva Santos

Integração de dados de single cell RNA e transcriptoma espacial para investigação da invasão perineural e do ritmo circadiano no adenocarcinoma de pâncreas

> Maceió 2024

## CATARINA ROSA E SILVA SANTOS

Integração de dados de single cell RNA e transcriptoma espacial para investigação da invasão perineural e do ritmo circadiano no adenocarcinoma de pâncreas

Exame de Qualificação (Mestrado) / Tese apresentada (o) ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Alagoas-UFAL, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre/Doutor(a) em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Doenças Crônicas e Degenerativas

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de C. Fraga

Coorientadora: Profa. Dra.: Carolinne de Sales Marques

Maceió 2024

# Catalogação na Fonte Universidade

# Federal de Alagoas Biblioteca Central Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Antonia Izabel da Silva Meyer - CRB-4 - 1558

 S237i Santos, Catarina Rosa e Silva. Integração de dados de single cell RNA e transcriptoma espacial para investigação da invasão perineural e do ritmo circadiano no adenocarcinoma de pâncreas / Catarina Rosa e Silva Santos. – 2024. 86 f. : il.

> Orientador: Carlos Alberto de C. Fraga. Co-orientadora: Carolinne de Sales Marques. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Universidade Federal de Alagoas. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas. Maceió, 2024.

Bibliografia: f. 81-86.

1. Pâncreas - Câncer. 2. scRNA. 3. transcriptoma espacial. 4. Ritmo circadianos. I. Título.

CDU: 616.37-006.6

### Folha de Aprovação

Catarina Rosa e Silva Santos

Integração de dados de single cell RNA e transcriptoma espacial para investigação dainvasão perineural e do ritmo circadiano no adenocarcinoma de pâncreas

Dissertação submetida ao corpo docentedo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da UniversidadeFederal de Alagoas.



# Prof. Dr. Carlos Alberto de C. Fraga

Universidade Federal de Alagoas - Campus Arapiraca

Orientador

**Banca Examinadora:** 



#### **Alysson Wagner Fernandes Duarte**

Universidade Federal de Alagoas - Campus Arapiraca

Examinador interno



# Emisael Stênio Batista Gomes

Universidade Federal de Alagoas - Campus Arapiraca

Examinador interno



# Jussara Almeida de Oliveira Baggio

Universidade Federal de Alagoas - Campus Arapiraca

Examinador interno

#### AGRADECIMENTOS

Por mais clichê que seja, a frase cantada por Raul Seixas com os dizeres "um sonho que se sonha junto é realidade" transmite a sensação do momento atual. O mestrado proporcionou a possibilidade de conviver com pessoas e me sentir acolhida de diversas formas, e meus agradecimentos a pessoas especiais nesse período.

Aos meus pais e irmãos que sempre estiveram apoiando com amor todas as decisões. Ao Eduardo, companheiro mais compreensivo de todos os dias, trazendo a clareza e paz nos dias difíceis.

Meus familiares e sinceros amigos que aplaudem e torcem por cada conquista.

Aos amigos do mestrado adquiridos nessa jornada, em especial Alexandre que vivenciou comigo todas as experiências de forma que conseguimos amenizar nossas dificuldades.

Ao orientador professor Carlos que aceitou me orientar e acompanhar nessa jornada, apesar de suas diversas atribulações.

Em especial à Deus, que me proporcionou saúde para conduzir a essa jornada tão importante na vida.

#### RESUMO

O câncer ductal adenocarcinoma pancreático (PDAC) é reconhecido pela sua agressividade e prognóstico desfavorável, com a invasão perineural (PNI) sendo um importante contribuinte para a gravidade clínica. Os presentes estudos exploraram o PDAC em níveis moleculares distintos, utilizando dados de sequenciamento de RNA de célula única (scRNA-seq) e transcriptoma espacial. O primeiro estudo investigou as complexidades moleculares da PNI no PDAC, com foco nas Células Estreladas Pancreáticas (PSCs) e em genes críticos como SPP1, IGFBP3, PLAU e POSTN. Observamos padrões de sinalização distintos em tumores PNIpositivos, enfatizando a importância das PSCs e células mieloides, e identificamos módulos associados a processos celulares fundamentais, como apresentação de antígenos e modulação imune. Os dados de transcriptoma espacial corroboram os resultados do scRNA, demonstrando que as células PSCs que expressam o gene POSTN estão próximas às células tumorais e expressam genes da família do colágeno. O segundo estudo examinou os efeitos do jet lag crônico no PDAC, também utilizando scRNA-seq em modelo animal de indução de PDAC. Observou-se alterações significativas na composição celular, interações e padrões de expressão gênica, com um aumento notável de células acinares e mieloides sob jet lag crônico. Destacamos um perfil distinto de produção de citocinas em células mieloides, especialmente marcado pela regulação positiva de genes associados a receptores de quimiocinas como Cxcl12, e identificamos módulos enriquecidos em macrófagos sob jet lag crônico, enfatizando o impacto dos ritmos circadianos interrompidos no microambiente tumoral. Ambos os estudos ressaltam a plasticidade celular e os padrões de expressão gênica em resposta à PNI e ao jet lag crônico, oferecendo insights valiosos sobre os mecanismos de regulação imunológica e potenciais alvos terapêuticos para investigações futuras.

Palavras-chave: scRNA, pâncreas, transcriptoma espacial, câncer

### ABSTRACT

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is recognized for its aggressiveness and unfavorable prognosis, with perineural invasion (PNI) being a significant contributor to clinical severity. The present studies explored PDAC at distinct molecular levels, utilizing single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) data and spatial transcriptomics. The first study investigated the molecular complexities of PNI in PDAC, focusing on Pancreatic Stellate Cells (PSCs) and critical genes such as SPP1, IGFBP3, PLAU, and POSTN. We observed distinct signaling patterns in PNI-positive tumors, emphasizing the importance of PSCs and myeloid cells, and identified modules associated with fundamental cellular processes like antigen presentation and immune modulation. Spatial transcriptomics data corroborated scRNA results, demonstrating that POSTN-expressing PSCs are proximal to tumor cells and express collagen family genes. The second study examined the effects of chronic jet lag on PDAC, also using scRNA-seq in an animal model of PDAC induction. Significant alterations in cellular composition, interactions, and gene expression patterns were observed, with a notable increase in acinar and myeloid cells under chronic jet lag. We highlighted a distinct cytokine production profile in myeloid cells, particularly marked by upregulation of genes associated with chemokine receptors like Cxcl12, and identified modules enriched in macrophages under chronic jet lag, emphasizing the impact of disrupted circadian rhythms on the tumor microenvironment. Both studies underscore cellular plasticity and gene expression patterns in response to PNI and chronic jet lag, offering valuable insights into immune regulation mechanisms and potential therapeutic targets for future investigations.

Keywords: scRNA, pancreas, spatial transcriptomics, cancer

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Anotação celular de dados single-cell na imagem do tecido. Amostra de	
córtex visual primário de rato adulto. Imagem adaptada - tutorial Seurat 4.2.0	36
Figura 2 - Clusters identificados pela ferramenta inferCNV Adaptada de 44. A:	
Distribuição dos diferentes agrupamentos de expressão gênica identificados após a	
operação de clusterização. B: Heatmap com os perfis de CNVs de cada cluster.	
Regiões cromossômicas em vermelho representam amplificação, e em azul,	
deleções	36
Figura 3. Variação da expressão de genes selecionados ao longo de uma trajetória	

Figura 3.	variaçao	da expressad	de gene	s selecionados	ao longo	de uma trajetoria	
definida e	m uma am	nostra de carc	inoma pu	lmonar			. 37

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAF	Fibroblastos associados ao câncer
СР	Câncer pancreático
CXCL	Ligante de quimiocina
DEGs	Genes diferencialmente expressos
INCA	Instituto Nacional do Câncer
OMS	Organização Mundial de Saúde
NSQ	Núcleo supraquiasmático
PDAC	Adenocarcinoma ductal de pâncreas
PLAU	Ativador de plasminogênio, uroquinase
POSTN	Periostina (gene)
PSCs	Células Estelares Pancreáticas
PNI	Invasão Perineural
REM	Rapid eye movement
scRNA	RNA célula única
scRNA-seq	Sequenciamento de RNA de célula única
TAM	Macrófagos associados a tumores
TME	Microambiente tumoral

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12			
2. OBJETIVOS	15			
2.1 Objetivo Geral	15			
2.2 Objetivos Específicos	15			
3 REVISÃO DE LITERATURA	16			
3.1 Câncer de Pâncreas	16			
3.1.1 Características gerais	16			
3.1.2 Epidemiologia				
3.1.3 Fatores de risco	18			
3.1.3.1 Fatores de risco não modificáveis	18			
3.1.3.2 Fatores de risco modificáveis				
3.1.4 Diagnóstico	21			
3.1.5 Tratamento	22			
3.2 Genética do câncer de pâncreas	23			
3.2.1 Sequenciamento de RNA de células únicas (scRNAseq)	24			
3.2.2 Invasão perineural e câncer de pâncreas	26			
3.3 Ritmo circadiano e câncer	27			
3.3.1 Ritmo circadiano: Características gerais	27			
3.3.2 O sono e o trabalho noturno	29			
3.3.3 Desregulação do ritmo circadiano no câncer	30			
3.3.3.1 Ritmo circadiano e câncer de pâncreas	32			
4. METODOLOGIA	34			
4.1 Integração dos conjuntos de dados de single-cell e anotação celular	34			
4.2 Análise de interação célula-célula	35			
4.3 Integração dos dados de Sequenciamento de RNA single-cell e Transcriptômica				
Espacial	35			
4.4. Identificação e localização de Copy Number Variations (CNVs)	36			
4.5 Análise de Trajetória do perfil de expressão gênica	37			
4.6. Localização e da proximidade espacial de processos biológicos				
5. PRODUTOS	39			
5.1 PRODUTO 1	39			

5.2 PRODUTO 2	60
6. CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS	80

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer pancreático (CP) continua sendo uma doença altamente fatal e ocupa o sétimo lugar como causa de morte por câncer em todo o mundo, tanto em homens quanto em mulheres. Estima-se que haja cerca de 459.000 novos casos e 432.000 mortes por CP de acordo com as estimativas do GLOBOCAN 2018 (MIZRAHI et al., 2020). A incidência desse tipo de câncer está aumentando em uma taxa de 0,5% a 1,0% ao ano, sendo projetado que se torne a segunda principal causa de morte por câncer nos Estados Unidos até 2030 (PARK; CHAWLA; O'REILLY, 2021). No Brasil, o CP é responsável por aproximadamente 2% de todos os casos de câncer diagnosticados e por 4% do total de mortes relacionadas ao câncer, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) (DA SILVA et al., 2021).

Clinicamente, câncer de pâncreas é o termo geral para tumor maligno formado nas células epiteliais de estruturas glandulares nas células ductais pancreáticas, conhecido como adenocarcinoma, e o adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) é responsável por mais de 90% dos cânceres pancreáticos. Outros cânceres pancreáticos exócrinos menos comuns incluem carcinoma adenoescamoso, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células gigantes, carcinoma de células acinares e carcinoma de pequenas células (HU et al, 2021.).

Os fatores que determinam a letalidade do PDAC são numerosos, centrados na incapacidade de detectar a doença até o final da progressão, muitas vezes após metástases à distância. Além disso, fora da minoria (10%-15%) dos casos atribuídos a mutações germinativas ou fatores de risco conhecidos, tais como lesões císticas mucinosas e pancreatite crónica, não existe um único fator de risco atribuível para a maioria dos pacientes. (HALBROOK et al., 2023). O mal prognóstico está relacionado à rápida disseminação para os linfonodos e órgãos distantes, a ausência de sintomas específicos que possam levar a um diagnóstico precoce e a escassez de biomarcadores para a detecção de tumores em estágio avançado. (DA SILVA et al., 2021).

Atualmente, as opções terapêuticas disponíveis incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia e o uso de drogas direcionadas. No entanto, até o momento, as terapias direcionadas às vias moleculares associadas ao câncer não têm mostrado resultados satisfatórios. Isso ocorre, em parte, devido à rápida ativação de vias alternativas compensatórias, bem como à presença de uma reação desmoplásica densa no tumor (ADAMSKA; DOMENICHINI; FALASCA, 2017).

A mudança na estrutura etária da população global, especialmente em regiões em desenvolvimento, juntamente com as alterações nos fatores de risco modificáveis estabelecidos, desempenham um papel significativo nas tendências observadas no câncer pancreático. Tanto os fatores genéticos quanto as exposições modificáveis, isoladamente ou em combinação, têm influência no risco de desenvolvimento desse tipo de câncer (KLEIN, 2021). Dentre as muitas lesões genéticas identificadas no câncer pancreático, o mutante ativo K-ras é um dos primeiros a ocorrer na tumorigênese pancreática, seguido pela inativação de vários supressores tumorais, incluindo p53, p16INK4a e outros, como genes envolvidos no ritmo circadiano (JIANG et al., 2022).

Os ritmos circadianos oscilam ao longo de um período de 24 horas e impactam muitos processos fisiológicos e aspectos da vida diária, incluindo comportamentos alimentares, regulação do ciclo sono-vigília e homeostase metabólica (STEELE et al., 2021). Vários processos biológicos importantes são regulados por ritmos circadianos. Assim, a interrupção do relógio circadiano pode contribuir para a proliferação celular anormal, aumento da mutação genética e resistência à apoptose, que são características importantes do câncer. Com base nas descobertas de estudos epidemiológicos e laboratoriais, os ritmos circadianos anormais foram listados como potenciais cancerígenos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o que aumentou o foco na definição dos mecanismos subjacentes à tumorigênese induzida pela interrupção circadiana (ZHOU et al.,2022).

Especificamente, o pâncreas é um dos órgãos mais afetados por esse sistema de cronometragem, pois possui seu próprio sistema de temporização endógeno regulado pelo SCN (núcleo supraquiasmático) e sinais não fóticos que mantêm sua fisiologia normal. Além disso, o pâncreas está intimamente ligado à sua função endócrina. Estudos in vitro e in vivo têm demonstrado que a interrupção do ritmo circadiano também está associada ao desenvolvimento, progressão e resistência aos tratamentos no câncer pancreático. Análises prospectivas da expressão dos genes circadianos em pacientes com adenocarcinoma ductal pancreático revelaram uma menor expressão de PER1, PER2, PER3, CRY1, CRY2, TIPIN, TIM, CK1E, BMAL-ARNTL e CLOCK nos tecidos cancerosos em comparação com seus tecidos adjacentes correspondentes (GARCÍA-COSTELA et al., 2020).

Além dos mecanismos que auxiliam na proliferação das células, o ritmo circadiano está sendo associado com a evolução das neoplasias a nível metastático. A invasão perineural (PNI) corresponde a um tipo de disseminação metastática no qual as

células neoplásicas invadem os nervos do sistema nervoso periférico para realizar o seu trajeto até o sítio secundário, uma vez que, os nervos protegem essas células neoplásicas contra as defesas imunológicas (CHEN et al., 2019).

Avanços recentes na genômica de célula única fornecem ferramentas poderosas na exploração da heterogeneidade genética e funcional, reconstrução de linhagens evolutivas e detecção de subpopulações raras. Além disso, estudos de scRNA-seg em tumores humanos revelaram novos insights sobre a heterogeneidade tumoral e subpopulações distintas, que são essenciais para dissecar detalhadamente o mecanismo relacionado ao tumor (PENG et al., 2019). Por meio do scRNA-seq, pesquisadores encontraram dois grupos de células ductais e pelo menos sete subgrupos com suprarregulações únicos de genes em cada um. Eles também identificaram cinco subgrupos de linfócitos T e macrófagos, cada um compreendendo ecossistemas imunológicos únicos. É imperativo considerar as várias populações de células não cancerígenas ao explorar esses microambientes tumorais. Em particular, as células imunes precisam ser examinadas, pois a sobrevivência do paciente foi associada à infiltração imune, com correlações significativas com os tipos de células imunes e as assinaturas de inflamação presentes. Com o tempo, o scRNA-seq pode muito provavelmente inaugurar uma nova era de medicina de precisão na pesquisa e terapêutica do câncer de pâncreas (BOU ZERDAN et al., 2022).

Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a progressão do CP, associando esse evento à expressão dos genes circadianos e observar uma possível interação entre esse evento e a desdiferenciação das células de Schwann, agentes importantes para a promoção da invasão perineural. O CP é um tipo tumoral complexo e agressivo que necessita de mais estudos para melhorar o entendimento sobre os processos que estão relacionados a sua progressão.

## 2. OBJETIVOS

## 2.1 Objetivo geral

• Compreender a interação entre o ritmo circadiano e a invasão perineural no contexto do adenocarcinoma de pâncreas

## 2.2 Objetivos específicos

- Identificar os genes diferencialmente expressos no câncer de pâncreas;
- Analisar as vias moleculares associadas aos genes diferencialmente expressos do câncer de pâncreas;
- Associar os genes diferencialmente expressos do câncer de pâncreas à expressão dos genes do ritmo circadiano;
- Analisar o processo de invasão celular das células neoplásicas de câncer de pâncreas;
- Analisar a diversidade celular e o microambiente tumoral no carcinoma ductal pancreático (PDAC);
- Correlacionar os dados de scRNA e trancriptoma espacial.

## 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Câncer de Pâncreas

#### 3.1.1 Características gerais

O pâncreas normal consiste em células acinares secretoras de enzimas digestivas, células ductais secretoras de bicarbonato, células centroacinares que são a transição geográfica entre células acinares e ductais, ilhotas endócrinas secretoras de hormônios e células estreladas relativamente inativas. A maioria das neoplasias malignas do pâncreas são adenocarcinomas; neoplasias pancreáticas raras incluem tumores neuroendócrinos (que podem secretar hormônios como insulina ou glucagon) e carcinomas acinares (que podem liberar enzimas digestivas na circulação). Neoplasias ainda menos comuns incluem carcinomas colóides, pancreatoblastomas e neoplasias sólidas pseudopapilares (KLEEFF et al., 2016).

Dentre todos os subtipos de tumores pancreáticos, o mais prevalente é o adenocarcinoma (de origem no tecido glandular), correspondendo a 90% dos casos diagnosticados. O PDAC é um tumor epitelial que se origina no compartimento exócrino do pâncreas, que contém células acinares responsáveis pela síntese de enzimas digestivas e o ducto pancreático funciona como um canal para o intestino delgado. O PDAC interrompe a secreção de enzimas digestivas, levando à má digestão e, consequentemente, à desnutrição. O PDAC tem uma natureza agressiva e metastatiza com frequência, especialmente para o fígado (PANG et al., 2022).

Infelizmente, a maioria dos cânceres pancreáticos se apresenta de forma inespecífica e não é diagnosticada até o final do curso da doença, depois que o câncer já se espalhou para outros órgãos. Os sintomas comuns incluem dor, particularmente dor epigástrica que irradia para as costas, perda de peso inexplicável, icterícia, fezes cor de barro, náusea e em ~10% tromboflebite migratória (síndrome de Trousseau). Às vezes apresentam diabetes mellitus de início recente ou sinais e sintomas de pancreatite crônica (WOLFGANG, et al., 2013).

O câncer de pâncreas está associado a um prognóstico extremamente ruim por várias razões. Geralmente é diagnosticado em estágios avançados, o que geralmente ocorre devido a inespecíficos e - em alguns casos - ausência de sintomas, falta de marcadores tumorais sensíveis e específicos e dificuldades na geração de imagens de

tumores em estágio inicial. O câncer de pâncreas é agressivo, com crescimento local perineural e vascular e metástases distantes precoces que impedem a ressecção cirúrgica curativa na maioria dos pacientes. O câncer de pâncreas é caracterizado por uma notável resistência (ou tolerância) à maioria das opções de tratamento convencionais, incluindo quimioterapia, radioterapia e terapia alvo molecular. Finalmente, o câncer pancreático abriga múltiplas alterações genéticas e epigenéticas e possui microambientes tumorais complexos e densos. Todos esses fatores resultam em uma taxa de sobrevida geral em 5 anos de <7%, com quase todos os sobreviventes nesse momento sendo 10 a 20% dos pacientes submetidos à ressecção cirúrgica; para esses pacientes, a taxa de sobrevida em 5 anos é de aproximadamente 15–25% (KLEEFF et al., 2016).

#### 3.1.2 Epidemiologia

Análises de dados de base populacional devem considerar variações geográficas e temporais na qualidade dos diagnósticos clínicos e na proporção de casos de câncer pancreático verificados histologicamente, que raramente é superior a 50%. Por exemplo, o acesso diferenciado aos cuidados de saúde, incluindo ferramentas radiológicas avançadas, pode influenciar a precisão das taxas relatadas de câncer pancreático (KLEEFF et al., 2016).

Nas últimas duas décadas, o número global anual de cânceres de pâncreas diagnosticados dobrou. Em 2017, havia 441.000 cânceres pancreáticos em todo o mundo, em comparação com 196.000 em 1990. Dado que o câncer pancreático é uma doença cujo risco aumenta com a idade e raramente ocorre antes dos 40 anos, a mudança na estrutura etária da população global juntamente com a melhoria do diagnóstico respondem por grande parte do aumento da incidência (número de casos na população em um ano) de câncer pancreático, particularmente em países de alta renda. (KLEIN, 2021).

O PDAC é a terceira principal causa de mortalidade por câncer nos Estados Unidos (EUA) e a sétima principal causa em todo o mundo. A idade média no momento do diagnóstico nos EUA é de 71 anos, e o PDAC é ligeiramente mais comum em homens do que em mulheres (5,5 vs 4,0 por 100.000 indivíduos). Na apresentação, 50% dos pacientes têm doença metastática, 10% a 15% têm doença localizada passível de cirurgia e o restante (30% a 35%) tem doença localmente avançada principalmente irressecável devido à extensão de envolvimento tumoral-vascular (PARK; CHAWLA; O'REIL; 2021).

Essa patologia corresponde no cenário brasileiro a cerca de 2% dos cânceres diagnosticados e a 4% do total de mortes no Brasil (DA SILVA et al., 2021). O número estimado de casos novos de câncer de pâncreas no Brasil, para cada ano do triênio de 2023 a 2025, é de 10.980 casos, correspondendo ao risco estimado de 5,07 casos por 100 mil habitantes, sendo 5.290 em homens e 5.690 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,00 casos novos a cada 100 mil homens e 5,15 a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de pâncreas ocupa a 14<sup>a</sup> posição entre os tipos de câncer mais frequentes. A Região Sul apresenta as maiores taxas de incidência entre homens e mulheres (INCA, 2022).

#### 3.1.3 Fatores de risco

Os fatores de risco para CP (câncer pancreático) são classificados como não modificáveis (idade, sexo, área, grupo sanguíneo, história familiar e suscetibilidade genética, diabetes) e modificáveis (microflora intestinal, tabagismo, álcool, pancreatite crônica, obesidade, fatores dietéticos, infecção) (ZHAO; LIU; 2020).

#### 3.1.3.1 Fatores de risco não modificáveis

A idade é o principal determinante do câncer de pâncreas. A maioria dos pacientes é diagnosticada com mais de 50 anos de idade, com pico de incidência na sétima e oitavas décadas de vida (KLEEFF et al., 2016). No Brasil, o câncer de pâncreas é uma entidade rara quando diagnosticado antes dos 30 anos, sendo mais comum ser diagnosticado após os 60 anos. Globalmente, cerca de 90% dos casos de câncer de pâncreas são diagnosticados após os 55 anos de idade, variando em alguns países. Nos Estados Unidos, a doença é mais prevalente aos 60 anos e, na Índia, torna-se mais frequente a partir dos 50 anos (PASQUAL et al, 2020.).

A incidência mundial de câncer de pâncreas é maior em homens do que em mulheres. Essa disparidade parece ser maior em países com índices de desenvolvimento mais elevados. Apesar da diferença entre os sexos, uma revisão sistemática de 15 estudos concluiu que os fatores reprodutivos não foram associados ao câncer pancreático em mulheres. Esses achados apontam para diferentes exposições a fatores ambientais ou genéticos como explicações alternativas para a predominância masculina (MCGUIGAN et al., 2018).

Nos Estados Unidos, foi relatado um risco aumentado de 50% a 90% de câncer pancreático em afro-americanos em comparação com caucasianos, enquanto as taxas de incidência são mais baixas em habitantes das ilhas do Pacífico e asiático-americanos. Propõe-se que as taxas de incidência mais altas na população afro-americana estejam ligadas a uma maior exposição a outros fatores de risco para câncer pancreático, como tabagismo, consumo de álcool, índice de massa corporal elevado e maior incidência de diabetes, mas há também é evidência de interações genéticas ou ambientais subjacentes para explicar pelo menos algumas das diferenças observadas na incidência entre grupos étnicos (MCGUIGAN et al., 2018).

Estudos recentes mostraram que os antígenos do grupo sanguíneo afetam o risco de CP. Entre as pessoas com diabetes, as pessoas com grupo sanguíneo A, AB ou B têm um risco maior de desenvolver CP do que aquelas com tipo O. Esses estudos indicam que o gene que codifica o grupo sanguíneo ABO desempenha um papel direto na tumorigênese e na malignidade e está envolvido na vigilância imunológica das células tumorais, na adesão celular, na apoptose tumoral e na angiogênese (ZHAO; LIU; 2020). O grupo sanguíneo O mostrou um efeito protetor, enquanto cerca de 15% a 20% de todos os PC poderiam estar associados ao tipo sanguíneo não-O (LUO et al, 2023.).

Estudos de caso-controle e de coorte demonstraram que indivíduos com história familiar de câncer pancreático têm um risco aumentado de 1,9 a 13 vezes de desenvolver câncer pancreático (WOLFGANG, et al., 2013). Estima-se que até 10% dos casos surjam em indivíduos com forte histórico familiar ou portadores de uma mutação germinativa, referidos como indivíduos de alto risco (IHR), para os quais a vigilância é recomendada. O IHR pode ser dividido em câncer de pâncreas familiar ou como síndrome de câncer hereditário, que apresentam prevalência populacional e risco de câncer de pâncreas variáveis (KLATTE et al, 2022). O câncer de pâncreas hereditário pode se apresentar no contexto de várias síndromes hereditárias, incluindo síndrome de Peutz-Jeghers, pancreatite hereditária, melanoma múltiplo atípico familiar, síndrome hereditária de câncer de mama e ovário, síndrome de Lynch e polipose adenomatosa familiar (CAI et al, 2021).

O diabetes mellitus é tanto um fator de risco para o câncer de pâncreas como também uma consequência, com muitos pacientes com câncer de pâncreas recentemente diagnosticado a reportar início de diabetes ou, entre aqueles com diabetes, um agravamento da doença. O diabetes de longa data (>3 anos) tem sido associado a um risco aumentado de 1,5 a 2,4 vezes de câncer de pâncreas (KLEIN, 2021). Parece que o diabetes

de início recente é um efeito e não uma causa do PDAC, e estudos recentes concentraramse neste sintoma para definir um grupo de alto risco para triagem. Aproximadamente 1% ou menos dos pacientes com diabetes de início recente desenvolvem PDAC dentro de 3 anos (WOOD et al, 2022).

### 3.1.3.2 Fatores de risco modificáveis

Nos últimos anos, vários estudos demonstraram que o aumento do índice de massa corporal (IMC) também está associado a um risco aumentado de desenvolver câncer pancreático. Uma análise dos dados de 12 estudos de coorte e um estudo de caso-controle estimou que o risco de câncer pancreático é 1,55 vezes maior (IC 95% = 1,16 – 2,07) para indivíduos com IMC > 35 em comparação com indivíduos com IMC de 18,9 para 24.9 (WOLFGANG, et al., 2013).

O tabagismo é um fator de risco bem estabelecido para câncer de pâncreas. O risco é maior entre aqueles que fumam o maior número de cigarros por dia, com fumantes de mais de 35 cigarros por dia, tendo uma razão de chance de câncer pancreático de 3,0 (IC 95% 2,2–4,1) em comparação com nunca fumantes. Curiosamente, o risco de câncer pancreático em ex-fumantes diminui com o aumento dos anos desde a cessação do tabagismo, de modo que 10 a 20 anos após a cessação do tabagismo, o risco de câncer pancreático em ex-fumantes retorna ao dos nunca fumantes (KLEIN, 2021).

A metanálise mais recente descobriu que o consumo baixo e moderado de álcool não estava associado ao risco de câncer de pâncreas, no entanto, naqueles com alto consumo de álcool, havia um risco aumentado de 15% de câncer de pâncreas. O consumo excessivo de álcool também é a principal causa de pancreatite crônica, que é um fator de risco conhecido para câncer de pâncreas e, portanto, o álcool nesse cenário é um fator de risco para câncer de pâncreas (MCGUIGAN et al., 2018).

Fatores dietéticos: pessoas que consomem carne vermelha e processada em quantidades excessivas têm o potencial de formar substâncias cancerígenas, como compostos N-nitrosos e danos ao DNA. (RIKARNI, 2021)

A pancreatite crônica é um fator de risco bem conhecido para o desenvolvimento de câncer de pâncreas, com risco de 40% ao longo da vida desse tipo de câncer em pacientes com síndromes de pancreatite hereditária, associadas a mutações em SPINK1 e PRSS1. Um estudo de 3.000 pacientes mostrou que 5,2% dos pacientes com câncer de pâncreas que não tinham histórico familiar desse tipo de câncer apresentavam pelo menos

uma alteração genética predisponente hereditária conhecida para câncer de pâncreas, em comparação com 7,9% dos pacientes com histórico familiar positivo (MIZRAHI, et al., 2020).

Uma revisão sistemática mostrou que níveis mais baixos de Neisseria alongate e *Streptococcus mitis*, e níveis mais altos de *Porrphyromonas ginggivalis* e *Granulicatella adiacens* estão associados a um risco aumentado de câncer pancreático. Infecção: Riscos aumentados de câncer pancreático observados em pacientes com infecções por Helicobacter pylori ou hepatite C (RIKARNI, 2021).

#### 3.1.4 Diagnóstico

A realização de um exame direcionado de indivíduos para CP na população em geral é árdua e financeiramente inviável devido à inadequação de avaliações diagnósticas altamente precisas e à baixa incidência de CP. Em 2020, a American Gastroenterological Association (AGA) emitiu diretrizes abrangentes para a triagem de CP, com foco específico em indivíduos de alto risco, como os portadores de síndrome de Peutz-Jeghers, mutação do gene CDKN2A, pancreatite hereditária, síndrome de Lynch ou aqueles com histórico familiar de primeiro grau (ou mais) de CP. Além disso, indivíduos com mutações nos genes BReast CAncer 1 e 2 (BRCA1, BRCA2), parceiro e localizador de BRCA2 (PALB2) e genes Ataxia-Telangiesctasia Mutated (ATM) também são classificados como candidatos de alto risco (UNGKULPASVICH et al, 2023.).

A imagem médica tem um papel importante no rastreamento e detecção precoce do câncer de pâncreas, na avaliação e estadiamento pré-operatório, no diagnóstico diferencial, no acompanhamento e na avaliação do tratamento. Diferentes métodos de imagem têm diferentes capacidades para a detecção precoce do câncer de pâncreas (YANG et al, 2021). Atualmente, os métodos utilizados para o diagnóstico precoce do câncer de pâncreas no ambiente clínico incluem principalmente tomografia computadorizada (TC), ressonância magnética (RMI), ultrassonografia endoscópica, colangiopancreatografia retrógrada endoscópica (CPRE) e colangiopancreatografia por ressonância magnética (CPRM) familiar (CAI et al, 2021).

A angiotomografia computadorizada de pâncreas com TC de tórax e pelve pode ser usada na avaliação da anatomia vascular e do estágio da doença e é recomendada no diagnóstico. O grau de contato entre o tumor e os vasos sanguíneos locais (isto é, as veias mesentérica superior e porta, bem como as artérias celíaca, hepática e mesentérica superior) é classificado como não envolvido, confinado ou encapsulado (PARK; CHAWLA; O'REILLY, 2021).

A ressonância magnética é uma modalidade alternativa que pode fornecer uma avaliação detalhada do trato biliar (por exemplo, colangiopancreatografia por ressonância magnética) e tem maior sensibilidade para a detecção de lesões hepáticas. A ultrassonografia endoscópica é frequentemente usada como ferramenta adjuvante para identificar linfonodos regionais e avaliar a relação dos tumores com estruturas vasculares próximas. Para pacientes com doença potencialmente ressecável, a ultrassonografia endoscópica com agulha fina é uma abordagem segura e de alto rendimento para confirmação tecidual (MIZRAHI, et al., 2020).

Os biomarcadores podem desempenhar um papel importante na detecção precoce e no rastreio de indivíduos com alto risco de câncer de pâncreas. O antígeno de carboidrato sérico 19–9 é um biomarcador bem estabelecido para PDAC e é útil para monitorar a resposta ao tratamento (PARK; CHAWLA; O'REILLY, 2021). Além do CA19-9, outros marcadores tumorais, como CEA, CA125 e CA242, também são usados em conjunto para diagnosticar o câncer de pâncreas. O CA19-9 parece estar associado à maior sensibilidade em torno de 80%, mas não apresenta vantagens em relação à especificidade, que parece ser a mais alta para o CA242, em aproximadamente 90%. Notavelmente, a sensibilidade e a especificidade em conjunto foram claramente superiores a qualquer marcador único (YANG et al, 2021).

Patologicamente, o PDAC consiste em glândulas malignas com arquitetura aleatória incorporadas em um estroma desmoplásico denso. Esta pauci-celularidade complica significativamente a análise molecular de amostras primárias de PDAC, uma vez que a maioria das células num fragmento de tecido são provavelmente não neoplásicas; sem enriquecimento para células neoplásicas, muitas vezes menos de 10% das células podem ser malignas. Existem também diversas variantes morfológicas, incluindo carcinoma adenoescamoso e carcinoma indiferenciado com células gigantes semelhantes a osteoclastos, algumas das quais apresentam características clínicas e/ou moleculares únicas (WOOD et al, 2022).

#### 3.1.5 Tratamento

As opções de tratamento para o adenocarcinoma ductal pancreático são bastante limitadas e dependem muito do estágio da doença. Atualmente, as principais opções de tratamento são a quimioterapia e a cirurgia. No entanto, devido à detecção geralmente tardia da doença, apenas uma pequena porcentagem de pacientes (15% a 20%) é elegível para cirurgia no momento do diagnóstico (MCGUIGAN et al., 2018).

Para PDAC ressecável ou limítrofe ressecável, a base do tratamento envolve intervenção cirúrgica, seguida de quimioterapia adjuvante (PANG et al, 2022).

Os tumores na cabeça do pâncreas são normalmente ressecados com uma pancreaticoduodenectomia (procedimento de Whipple), que inclui a ressecção da cabeça do pâncreas, duodeno, jejuno proximal, ducto biliar comum, vesícula biliar e um segmento do estômago. Tumores localizados no corpo ou na cauda do pâncreas podem ser tratados com pancreatectomia distal, geralmente combinada com esplenectomia (MIZRAHI, et al., 2020).

Na última década, dois novos regimes combinados surgiram como terapia de primeira linha em pacientes com PDAC avançado. O primeiro é uma combinação de 5-fluorouracil (5-FU), leucovorina, irinotecano e oxaliplatina, que leva a sigla FOLFIRINOX. A segunda é a combinação de gencitabina e um conjugado de nanopartículas de albumina de paclitaxel (nab-paclitaxel). Pode ser oferecida aos pacientes que progridem para regimes de primeira linha a possibilidade de mudar para outro regime, ou para um regime de segunda linha que inclua uma formulação lipossomal de irinotecano em combinação com 5-FU, desde que não tenham recebido nenhum destes agentes anteriormente. No geral, não existem padrões universais para regimes de segunda linha e além no PDAC, e o curso da terapia é frequentemente determinado pelo status de desempenho do paciente, pela presença de metas "acionáveis" e pela disponibilidade de ensaios clínicos apropriados (HALBROOK et al, 2023).

Uma vez metastatizado, o prognóstico do câncer de pâncreas é ruim. O tratamento quimioterápico continua sendo a principal opção para pacientes com tumores avançados e metastáticos. A radiação, em combinação com a quimioterapia, é outra opção para o câncer metastático irressecável. No entanto, os efeitos alcançados por ambas as abordagens são principalmente um ligeiro aumento da taxa de sobrevivência e uma redução dos sintomas relacionados com o câncer. Além disso, devido à toxicidade elevada, a quimioterapia combinada, que está associada a resultados ligeiramente melhores, é limitada apenas a pacientes com bom desempenho (ADAMSKA, DOMENICHINI, FALASCA, 2017).

O recente sequenciamento do genoma do câncer pancreático confirmou que quatro genes são mais comumente afetados pela mutação somática desta neoplasia: Kirsten Rat Sarcoma oncogene homolog (KRAS), Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A (CDKN2A/p16), Mothers Against Decapentaplegic Homólogo 4 (SMAD4) e proteína tumoral 53 (TP53). Além disso, alguns com cerca de 10% de prevalência (por exemplo, KDM6A, RBM10, MLL3). O KRAS é o oncogene alterado com mais frequência no câncer pancreático, sendo ativado por uma mutação pontual em mais de 90% dos casos. O gene p16/CDKN2A é o gene supressor tumoral mais frequentemente inativado no câncer de pâncreas, estando inativo em 95% dos casos. A proteína p16 tem um papel crítico no controle do ciclo celular e sua inativação remove um ponto de controle importante. O gene supressor de tumor SMAD4 é inativado em 55% dos cânceres pancreáticos, mas raramente encontrado em outros tumores. A inativação do gene supressor de tumor TP53 ocorre em 50% a 70% dos cânceres pancreáticos. Seu produto gênico, p53, atua tanto para reforçar os pontos de controle do ciclo celular quanto como um indutor de apoptose ou senescência. A proteína de suscetibilidade ao câncer de mama tipo 2 (BRCA2) também é mutada tardiamente em um subgrupo de câncer pancreático (RIKARNI, 2021).

Anormalidades epigenéticas que alteram a metilação do DNA, modificação de histonas ou expressão de microRNA são outros fatores para alterar as funções dos genes na condução e promoção da tumorigênese pancreática. Em alguns cânceres de pâncreas, supressores de tumor ou genes de reparo de DNA (como CDKN2A, CDH1 e MLH1) são silenciados pela metilação. As superexpressões de microRNAs no câncer pancreático também foram reveladas, o que parecia participar do desenvolvimento neoplásico pancreático (JIANG et al., 2022).

#### 3.2.1 Sequenciamento de RNA de células únicas (scRNA-seq)

Além do Human Cell Atlas, a tecnologia de sequenciamento de célula única oferece uma oportunidade sem precedentes para decifrar os estados funcionais de células neoplásicas individuais. O acúmulo de dados cada vez mais abundantes de sequenciamento de células únicas permitiu o estabelecimento do The Cancer Cell Atlas, que cobre um espectro de cânceres. Ao integrar informações patológicas clínicas e dados de sequenciamento de células únicas, novos biomarcadores de diagnóstico e prognóstico

e potenciais tipos ou estados de células terapeuticamente relevantes podem ser decifrados (LEI et al., 2021).

As abordagens genômicas unicelulares permitem avaliação detalhada de características genéticas e transcricionais presentes em centenas a milhares de células individuais por tumor. Em princípio, esta abordagem pode permitir-nos identificar todos os principais componentes celulares simultaneamente, determinar os seus estados genómicos e moleculares individuais e determinar quais destas características podem prever ou explicar as respostas clínicas aos agentes anticancerígenos (TIROSH et al, 2016).

O sequenciamento de RNA unicelular (scRNA-seq) é uma ferramenta poderosa que pode delinear o padrão de expressão gênica de cada célula individual e decodificar as interações entre diversos componentes celulares no TME. O perfil transcriptômico unicelular de tumores primários PDAC tem sido sistematicamente investigado, revelando que as paisagens imunológicas e estromais em cada paciente são altamente heterogêneas, e que células T citotóxicas com padrões de expressão gênica esgotados podem contribuir para o TME imunossupressor (ZHANG et al, 2023.).

Bernardo e cols. realizaram uma das primeiras investigações scRNA-seq em câncer pancreático para identificar as alterações transcricionais de células neoplásicas e microambientais associadas à progressão tumoral. Suas descobertas primárias foram que células raras com potencial maligno estavam presentes em lesões pré-cancerosas, provavelmente responsáveis pela progressão neoplásica. Além disso, eles encontraram uma mudança dinâmica no microambiente do tumor ao longo do tempo, com as lesões pré-cancerosas exibindo altas concentrações de linfócitos CD4+ e CD8+ e fibroblastos especiais associados ao câncer (CAFs) chamados miofibroblastos (myCAFs) (BOU ZERDAN et al., 2022).

Esforços anteriores de sequenciamento de RNA em massa em PDAC identificaram dois subtipos principais, presumivelmente dicotômicos, de casos com base em assinaturas de genes subjacentes - os chamados tumores "tipo basal" e "clássicos" - com implicações prognósticas e associação preditiva com resposta à terapia citotóxica. Por outro lado, o perfil scRNA-seq descobriu que a maioria dos tumores PDAC são na verdade uma mistura de subtipos 'basais' e 'clássicos', presentes em proporções variadas, com heterogeneidade espacial em como as células neoplásicas correspondentes a cada subtipo de assinatura estão localizadas dentro do tumor. De grande interesse, e até então não relatado em conjuntos de dados de sequenciamento em massa, o scRNA-seq

identificou a existência de um tipo de célula híbrida 'transicional intermediária' no PDAC humano que co-expressa marcadores de ambos os subtipos e compartilha características com células que compreendem o nicho progenitor pancreático (com base em dados de um artigo pré-impresso não revisado por pares). Esses dados sugerem uma plasticidade inerente aos estados transcriptômicos observados no PDAC, impulsionados tanto por fatores inerentes, como vias oncogênicas e epigenéticas, quanto por mediadores exógenos, como sinais parácrinos do TME. O efeito dessa mistura de subtipos na história natural do PDAC e na resposta às terapias de primeira linha continua sendo uma questão de investigação ativa (HAN; DEPINHO; MAITRA; 2021).

Estudos recentes revelaram heterogeneidade intratumoral complexa no microambiente PDAC e identificaram várias novas subpopulações de células usando scRNA-seq (CHEN et al, 2022).

Elyada e seus colegas desenharam um atlas celular de pâncreas humano e de camundongo e identificaram três tipos de fibroblastos associados ao câncer (CAFs): CAFs miofibroblásticos, CAFs inflamatórios e CAFs apresentadores de antígenos, sugerindo uma intrincada heterogeneidade dos CAFs. No entanto, as características de expressão gênica de células tumorais em PDAC ainda precisam ser mais investigadas (ELYADA et al, 2019). No entanto, as características de expressão gênica das células tumorais no PDAC ainda precisam ser investigadas.

#### 3.2.2 Invasão perineural e câncer de pâncreas

A invasão neoplásica dos nervos corresponde ao aumento do crescimento do câncer e ao pior resultado do paciente em uma variedade de doenças malignas, incluindo câncer de próstata, câncer de cabeça e pescoço e câncer gástrico. A invasão perineural (PNI) é observada em 75% dos cânceres ressecados e parece ser a forma mais importante de disseminação extracapsular nesta malignidade (GOLA et al, 2022).

Embora os mecanismos moleculares da PNI sejam características comuns em diferentes canceres humanos, a prevalência da PNI no PDAC supera qualquer outra malignidade sólida. Surpreendentemente, a PNI tem prevalência que chega a 100% no PDAC. O fato de o pâncreas estar localizado próximo a vários plexos neurais ajuda a entender por que esse órgão é particularmente inervado. Além disso, o padrão da PNI está relacionado ao local do tumor. O pâncreas é um órgão retroperitoneal circundado pelo plexo celíaco, pelo plexo hepático dorsal e pelo plexo ao redor da artéria mesentérica superior. Normalmente, os nervos estão localizados tanto na periferia quanto na parte interna dos tumores. Como resultado da invasão de células PDAC, é observado dano neural com ruptura do perineuro e distorção nervosa com edema de axônios (SELVAGGI et al, 2022).

Células do microambiente tumoral, como fibroblastos e macrófagos, contribuem para a invasão das células cancerígenas. Estas células facilitam a propagação do câncer através de sinalização parácrina ou remodelação directa da matriz e também formam adesões heterotípicas com células cancerígenas. Nos nervos, as interações entre os neurônios e as células de Schwann envolvem funções parácrinas, remodelação da matriz e contato direto. As células de Schwann promovem a sobrevivência neuronal durante o desenvolvimento e mielinizam os nervos (SHEARMAN et al, 2000).

As quimiocinas e seus receptores têm sido implicados no crescimento tumoral e na invasão de células tumorais de órgãos circundantes. Mais recentemente, estudos descobriram que a PNI está intimamente relacionada a certos fatores, incluindo fator de crescimento nervoso (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3), moléculas de adesão de células neurais (NCAM), glial fator neurotrófico derivado de linha celular (GDNF) e metaloproteinases de matriz (MMPs). O eixo CXCL12/CXCR4 é uma das vias de sinalização de quimiocinas mais amplamente estudadas. Verificou-se que este eixo desempenha papéis importantes na proliferação, angiogênese, transição epitelial-mesenquimal, metástase e invasão de vários tipos de câncer, incluindo o CP. CXCL12 e CXCR4 foram detectados nos sistemas nervoso central e periférico, e os neurônios, bem como as células de Schwann, são os principais produtores do ligante. A quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4 controlam a migração de neurônios e células microgliais no sistema nervoso central (XU et al, 2015).

Outros mecanismos moleculares, metabólicos e celulares também tem sido amplamente estudados e estão intimamente relacionados ao mau prognóstico da doença em PDAC.

## 3.3 Ritmo circadiano e câncer

#### 3.3.1 Ritmo circadiano: Características gerais

A natureza humana tem componentes temporais. O ritmo pode ser encontrado em diversos níveis organizacionais, desde células individuais até comportamento social; na verdade, quase todas as funções fisiológicas e psicológicas variam em periodicidade. Os ritmos mais estudados são os ritmos circadianos, onde circadiano (de cerca, cerca de, e diem, dia ou 24 h) refere-se a funções cujo ciclo gira em torno das 24 h (MONTARULI et al, 2021). O termo ritmo circadiano (do latim circa diem , que significa 'durante cerca de um dia') foi cunhado por Halberg para descrever oscilações endógenas em organismos que foram observadas em associação aproximada com o ciclo de rotação diária da Terra (SCHEIERMANN, KUNISAKI, FRENETTE, 2013).

Quase todos os comportamentos e atividades fisiológicas das vidas, incluindo bactérias, fungos, plantas, moscas-das-frutas, peixes, ratos e seres humanos, obedecem a um ritmo circadiano de 24 horas, como comportamento alimentar dos mamíferos, padrão de sono/vigília, produção hormonal e sistema imunológico (LIU et al, 2022).

O relógio circadiano pode ser dividido em dois componentes principais: o relógio central, que reside no núcleo supraquiasmático (NSQ) do cérebro, e os relógios periféricos que estão presentes em quase todos os tecidos e sistemas orgânicos (RICHARDS, GUMZ, 2013). O relógio central é o marca-passo mestre do relógio circadiano, que recebe sinais claro-escuros, necessidades metabólicas, alterações hormonais, deficiências do sistema imunológico, mudanças na temperatura do corpo e sinais neurais no trato retino-hipotalâmico através de um subconjunto de neurônios e fotorreceptores e se comunica com outras células do NSQ para preservar as oscilações circadianas neuronais. Utilizando esta via, as alterações ambientais também são transmitidas aos relógios periféricos de todo o corpo através dos nervos e das vias de sinalização endócrina (ORTEGA-CAMPOS et al, 2023).

Células ganglionares da retina fotossensíveis especializadas no olho detectam a luz através do fotopigmento melanopsina e depois esta informação para o NSQ através do trato retino-hipotalâmico. A luz que é detectada pela retina, portanto, permite o arrastamento, ou sincronização, dos ritmos diários para o ciclo claro-escuro de 24 horas que ocorre devido à rotação da Terra. Então, por meio de sinalização neuronal e hormonal, o NSQ envia sinais a outros órgãos periféricos para manter os tecidos sincronizados com o relógio mestre do cérebro. Em última análise, esses processos afetam aspectos da fisiologia que apresentam ritmicidade circadiana em humanos, incluindo pressão arterial, temperatura corporal e liberação dos hormônios cortisol e melatonina (LUBOV, CVAMMEN, KEMP, 2021). No nível molecular, o relógio circadiano consiste em múltiplos conjuntos de fatores de transcrição, resultando em ciclos de feedback autorregulatórios de transcriçãotradução (TTFLs) que representam o mecanismo central do relógio circadiano em mamíferos (FAGIANI et al, 2022). Os componentes positivos são dois fatores de transcrição básicos hélice-alça-hélice, contendo o domínio PAS, CLOCK e BMAL1. Quando esses fatores de transcrição se heterodimerizam, eles conduzem a transcrição de três genes de período (no camundongo, designados mPer1, mPer2 e mPer3) e dois genes criptocromos (mCry1 e mCry2) (SHEARMAN et al, 2000.)

Em camundongos, a ativação do CLOCK:BMAL1 ocorre durante o dia, levando à transcrição dos genes Per e Cry à tarde e ao acúmulo das proteínas PER e CRY no final da tarde ou à noite. As proteínas PER e CRY interagem entre si, bem como com as serinatreonina quinases Caseína quinase 18 (CK18) e CK1ε 43, e translocam-se para o núcleo à noite (TAKAHASHI, 2017). Nas primeiras horas da madrugada, mesmo com a ligação do complexo CLOCK-BMAL1 em sua sequência E-box alvo, os altos níveis de CRY e PER ligam-se a esse complexo e inibem sua transcrição, criando a regulação repressiva. Consequentemente, CRY e PER reprimem a sua própria expressão e, ao nascer do sol, a falta de produção das proteínas CRY e PER provoca níveis reduzidos no núcleo da célula e, na ausência de ligação ao CLOCK-BMAL1, permite que estes complexos iniciem a sua transcrição, criando a regulação ativa (SANFORD et al, 2022).

Em dois ciclos de feedback adicionais, o fator de transcrição CLOCK/BMALI impulsiona a expressão do receptor nuclear órfão REV-ERBα/β relacionado ao ácido retinóico, o receptor órfão RORα/B relacionado ao RAR, bem como a proteína Dhp de ligação ao promotor de albumina no local D (FINGER, DIBNER, KRAMER, 2020). REV-ERB e ROR ligam-se competitivamente aos elementos de resposta do receptor órfão relacionados ao ácido retinóico (ROREs) encontrados no promotor BMAL1 para negar ou promover a transcrição, respectivamente. Além dessas proteínas centrais, várias vias de sinalização celular e modificações pós-traducionais interferem no relógio e em sua função (LUBOV, CVAMMEN, KEMP, 2021).

#### 3.3.2 O sono e o trabalho noturno

O ciclo de sono e vigília é o exemplo clássico de sistemas de ritmo circadiano, cuja geração, manutenção e consolidação dependem da interação entre ritmos circadianos endógenos e processos que regulam a homeostase do ambiente interno (SUN, CHEN, 2022.). Em relação ao próprio sono, ele não é homogêneo, pois é constituído por quatro a cinco ciclos, compreendendo cada um, quatro estágios (sono não REM-NREM ou sono REM - com movimentos rápidos dos olhos - Rapid Eye Movements), sendo que cada ciclo dura cerca de 90-120 minutos (NEVES, MACÊDO, GOMES, 2017).

O sono não-REM é subdividido em diferentes estágios do sono caracterizados pela vigília relaxada (N1) ao sono leve (N2), até ao sono de ondas lentas (SWS) ou sono profundo (N3) (TARUN et al, 2020). Ele geralmente representa 75% a 80% do sono, enquanto o sono REM geralmente representa 20% a 25% do sono, ocorrendo em quatro a seis episódios distintos (CARSKADON et al, 2005).

Indivíduos idosos podem apresentar sono mais superficial, com diminuição dos estágios N3 e REM e aumento dos estágios N1 e N2, enquanto em crianças o contrário é observado (NEVES, MACÊDO, GOMES, 2017). O trabalho noturno abrange uma série de interrupções circadianas que estão intimamente ligadas à alteração da exposição à luz durante o trabalho noturno, incluindo interrupções no sono, na alimentação e nas atividades (CABLE et al, 2021.).

#### 3.3.3 Desregulação do ritmo circadiano no câncer

A perturbação dos ritmos circadianos tem sido relacionada a um maior risco de patologias como diabetes, distúrbios metabólicos, incluindo obesidade ou doenças metabólicas, depressão, doenças cardiovasculares e câncer. Nos últimos anos, a interrupção circadiana tem sido descrita como um fator de risco independente para câncer (ORTEGA-CAMPOS et al, 2023).

De acordo com a IARC (Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer), o estilo de vida do trabalho noturno é prejudicial aos seres humanos. Além disso, o polimorfismo de nucleotídeo único está intimamente ligado à desregulação do ritmo circadiano, o que leva à deleção, alteração epigenética e está substancialmente ligado ao risco de câncer (Rossen Donev, 2023). Defeitos ou interrupções no funcionamento circadiano normal e níveis alterados de expressão genética do relógio podem aumentar o risco de câncer de próstata, câncer de mama, câncer de ovário, câncer colorretal, câncer de endométrio, linfoma não-Hodgkin, câncer de pâncreas, osteossarcomas, carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço, leucemia mieloide aguda e carcinomas hepatocelulares (MALIK et al, 2022).

Foram demonstradas que alterações na expressão do gene Per estão associadas à ocorrência, desenvolvimento e prognóstico do câncer. Os níveis de expressão PER1/2 foram encontrados significativamente regulados negativamente em câncer gástrico, colorretal, pancreático, de próstata e de mama, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, câncer de pulmão de células não pequenas, leucemia linfocítica crônica, melanoma e carcinoma hepatocelular (DENG, YANG, 2019).

A expressão reduzida de mRNA de PER1 pode levar a um desequilíbrio entre a proliferação celular e a apoptose, promovendo ainda mais a transformação de células malignas. Acima de tudo, é universalmente aceito que a diminuição da expressão de PER1 no câncer está intimamente correlacionada com a ocorrência e progressão do tumor, regulando genes do ciclo celular a jusante e genes relacionados ao câncer, incluindo Ciclina B1, Ciclina D, Ciclina E, WEE-1, C-MYC, KI-67, MDM2 e p53 (ZHAO et al, 2016). Descobriu-se que a expressão de Per3 é significativamente regulada negativamente no câncer colorretal, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer pancreático e carcinoma hepatocelular (DENG, YANG, 2019).

Anormalidades na metilação do promotor Period e no status de acetilação de histonas também foram relatadas em tumores humanos. Portanto, alterações genéticas e epigenéticas nos genes Period são encontradas em tumores humanos (WOOD, YANG, HRUSHESKY, 2009).

Além disso, em carcinomas hepatocelulares, BMAL1 heterodimeriza com a proteína 2 do domínio PAS neuronal (NPAS2) para facilitar a sobrevivência de células cancerígenas mediada por NPAS2. Polimorfismos nos genes do relógio circadiano estão associados a um risco elevado de câncer. Por exemplo, polimorfismos no gene NPAS2 estão associados a um maior risco de câncer de mama; NPAS2, Per1 e Per2 estão associados ao câncer gástrico; e CLOCK1 está relacionado ao desenvolvimento de câncer colorretal (MALIK et al, 2022).

É agora bem aceite que o microambiente tumoral e, em particular, o ambiente imunitário desempenham um papel crucial no controlo da progressão tumoral e, até à data, sabe-se que várias terapêuticas (por exemplo, pembrolizumab; ipilimumab) actuam sobre ele (FAGIANI et al, 2022). Normalmente, o microambiente tumoral (TME) compreende matriz extracelular (MEC) e uma variedade de células, incluindo células mieloides inatas [por exemplo, macrófagos associados a tumores (TAMs), células supressoras derivadas de mieloides (MDSCs), neutrófilos e células dendríticas, linfócitos (por exemplo, células T e células NK), fibroblastos associados ao câncer (CAFs) e células endoteliais (XUAN et al, 2021).

Os genes circadianos medeiam a interação entre as células tumorais e o TME através da regulação dos CCGs a jusante, que estão envolvidos no ciclo celular, na apoptose, na resposta a danos no DNA e nas modificações da cromatina. Por outro lado, as perturbações do ritmo circadiano também contribuem para a remodelação do microambiente tecidual, possivelmente pela indução de inflamação sistêmica e alteração da expressão dos genes do relógio (LIU et al, 2022).

Mesmo com evidências de que a formação neoplásica está correlacionada com alterações no ciclo circadiano (CC), são poucas as abordagens terapêuticas que utilizam essa correlação; assim, surge como uma possível abordagem promissora para o tratamento do câncer, em que os medicamentos antineoplásicos são administrados no momento ideal de acordo com o CC; isso se chama 'cronoterapia' e pode ser especialmente benéfico quando associamos tolerância à quimioterapia e uma ação mais adequada (SANFORD et al, 2022).

#### 3.3.3.1 Ritmo circadiano e câncer de pâncreas

Embora indeterminado, há algumas evidências de que o relógio pode estar desregulado no adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC), levando a um pior prognóstico; isso é alarmante para uma doença maligna mortal, onde apenas 11% dos pacientes sobrevivem além de 5 anos (SCHWARTZ et al, 2023).

Um microarranjo personalizado enriquecido com genes pancreáticos, o Pittsburgh Pancreas Gene Enriched ARray-PittPEAR, analisou 5.763 genes, 264 dos quais foram expressos diferencialmente em câncer pancreático versus tecido normal. Neste estudo foram identificados 30 genes humanos relacionados a um dos sete genes circadianos da mosca. Observou-se que um dos quatro genes humanos relacionados ao citocromo P450, PER1 e DEC1, e efetores a jusante, como a protease 30 específica da ubiquitina, foram significativamente subexpressos no câncer pancreático.Também foi encontrada uma associação significativa entre baixos níveis de expressão de genes circadianos e redução da sobrevida (GARCÍA-COSTELA et al., 2020).

No estudo conduzido por Wang et al, foi revelado que a expressão de ARNTL2 foi significativamente regulada positivamente nos tecidos PDAC do que nos tecidos normais, e o alto nível de ARNTL2 estava intimamente associado a fenótipos malignos agressivos e baixa sobrevida de pacientes com PDAC. Além disso, experiências funcionais demonstraram que a elevada expressão de ARNTL2 facilitou a proliferação, migração e invasão celular. Além disso, experimentos funcionais verificaram que o knockdown de ARNTL2 impediu a proliferação e invasão de células PDAC in vitro, enquanto diminuiu o crescimento do tumor in vivo. Tomados em conjunto, os dados acima elucidaram que o ARNTL2 desempenhou um papel oncogênico na progressão do PDAC (WANG et al, 2020.).

Em investigação recente, foram encontrados 299 genes circadianos cujos níveis de expressão foram significativamente alterados em amostras de câncer de pâncreas em comparação com amostras normais. As análises de sobrevivência mostraram que os pacientes PACA que apresentavam níveis de expressão mais elevados de MBOAT2/CDA/LPCAT2/B4GALT5 apresentavam taxas de sobrevida global mais curtas (WANG et al, 2023.).

#### 4. METODOLOGIA

A infraestrutura de servidores para realizar a análise de dados encontra-se disponível nos laboratórios do Histopatologia localizado na Campus Arapiraca, UFAL. Todos os dados referentes às amostras encontram-se publicamente disponíveis nos bancos de dados do Gene Expression Omnibus (GEO) e do Zenodo. Todas as amostras foram derivadas de tumores primários e coletadas antes do início do tratamento. A plataforma de aquisição dos dados de transcriptômica espacial utilizada para todas as amostras foi a Visium Spatial Gene Expression (10x Genomics).

4.1 Integração dos conjuntos de dados de single-cell e anotação celular

Todas as amostras de sequenciamento single-cell foram submetidas a um préprocessamento utilizando o pacote Seurat 4.2.0 da linguagem R. A partir da matriz de expressão gênica obtida após o alinhamento com o genoma de referência e disponibilizada para acesso público, células que expressam menos de 500 genes, mais de 9.000 genes (outliers) ou com percentual de genes mitocondriais superiores a 10% e genes que são expressos por menos de 5 células serão desconsiderados da análise. Para uma melhor separação entre células tumorais e estromais, todos os conjuntos de dados de diferentes biópsias foram combinados antes da anotação celular. Essa estratégia favorece o algoritmo de clusterização, uma vez que há uma maior variabilidade celular, além de proporcionar uma melhor identificação de tipos celulares raros.

Para detectar variações do número de cópias (CNVs) cromossômicas em larga escala usando dados de RNA de célula única, utilizou-se o inferCNV (v.0.8.2) com parâmetros padrão recomendados para dados da tecnologia 10x Genomics. Todas as células que não são células tumorais foram agrupadas para compor o conjunto de referência normal. O inferCNV foi executado em nível de amostra e apenas com dados filtrados pós-controle de qualidade. Para calcular eventos de CNV em nível de braço cromossômico, utilizou-se um script interno para relacionar a saída do inferCNV em nível de gene com as bandas cromossômicas e calcular o valor médio para cada braço.

Para a expressão diferencial em nível de célula e em nível de cluster, utilizamos a função 'FindMarkers' ou 'FindAllMarkers' do pacote Seurat, conforme apropriado, com uma porcentagem mínima de 0,25 (parâmetro min.pct = 0,25) e considerando apenas a direção positiva, uma vez que a falta de expressão é mais difícil de interpretar devido à

escassez de dados. Os Genes diferencialmente expressos (DEGs) resultantes foram filtrados para ajuste P < 0.05 e classificados por fold change. Todas as análises de expressão diferencial foram realizadas utilizando o ensaio 'SCT' (Scale-Data Corrected Transcripts).

#### 4.2 Análise de interação célula-célula

Para inferir, analisar quantitativamente e visualizar as redes de comunicação celulares, utilizamos o pacote em R CellChat 1.6.0. Este pacote utiliza dados de sequenciamento single-cell como entrada e faz uma previsão das principais vias de comunicação celular utilizando abordagens de análise de rede e de reconhecimento de padrões. Para isso, utiliza como referência um repositório de interações entre ligantes, receptores e cofatores. Assim, comparando o perfil de transcrição, o tipo celular e os dados contidos no banco de referência, a ferramenta consegue quantificar as semelhanças entre todas as vias de sinalização significativas e agrupá-las com base na similaridade funcional e então sugerir as prováveis interações celulares para cada via. Quanto maior o grau de similaridade, maior a probabilidade dos ligantes e receptores exibirem funções semelhantes.

# 4.3 Integração dos dados de Sequenciamento de RNA single-cell e Transcriptômica Espacial

Os tipos celulares definidos durante o processamento das amostras de sequenciamento single-cell serão utilizados para anotar o tipo de célula contida em cada spot de leitura das amostras de transcriptômica espacial. A transferência das anotações celulares será feita pelo pacote R Seurat 4.2.0 após uma normalização dos dados de entrada, identificação dos marcadores de transferência, identificação baseada em score da predição dos spots de destino e, por fim, a plotagem do tipo celular na imagem da lâmina do tecido (Figura 1). As imagens digitais dos tecidos serão avaliadas por patologistas e as regiões destacadas serão utilizadas como guias para a análise e interpretação de dados.


Figura 1. Anotação celular de dados single-cell na imagem do tecido. Amostra de córtex visual primário de rato adulto. Imagem adaptada - tutorial Seurat 4.2.0.

4.4 Identificação e localização de Copy Number Variations (CNVs)

A identificação de clones e subclones contendo alterações de número de cópias será realizada com a ferramenta inferCNV, que detecta diferenças no nível da expressão relativa média a partir de dados de transcriptoma, considerando uma janela móvel composta por 101 genes 43. Dessa forma, será possível conhecer os perfis de variações de número de cópias (CNVs) de cada cluster (Figura 2). Analisando o perfil de perda/ganho de cada cluster, será possível identificar a presença ou a ausência de células tumorais no cluster.



Figura 2. Clusters identificados pela ferramenta inferCNV Adaptada de 44. A: Distribuição dos diferentes agrupamentos de expressão gênica identificados após a operação de clusterização. B: Heatmap com os perfis de CNVs de cada cluster. Regiões cromossômicas em vermelho representam amplificação, e em azul, deleções.

### 4.5 Análise de Trajetória do perfil de expressão gênica

Uma vez identificadas as regiões tumorais no tecido e definidas as posições dos demais tipos celulares que compõem regiões do microambiente tumoral, é possível investigar como variam a expressão de genes de interesse que foram identificados na análise de interação celular feita pelo CellChat (Figura 3). Por exemplo, podemos verificar como variam ao longo do espaço alguns genes relacionados com a transição epitélio-mesenquimal ou com a promoção da angiogênese. Outra possibilidade será avaliar como varia o perfil de expressão de um determinado tipo celular (ex.: macrófagos, TCD8+) em regiões distantes e próximas às células neoplásicas e verificar quais genes apresentam o mesmo padrão de variação. A análise de trajetória será realizada pelo pacote SPATA do R 45



Figura 3. Variação da expressão de genes selecionados ao longo de uma trajetória definida em uma amostra de carcinoma pulmonar.

4.6 Localização e da proximidade espacial de processos biológicos

Para visualizar regiões onde um determinado processo biológico está em curso, utilizaremos uma ferramenta que está sendo desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa. O ArchipelaGO é um pacote escrito em R e Python que utiliza o teste exato de Fisher para identificar ilhas celulares enriquecidas considerando um geneset de entrada. É possível também analisar a composição celular de cada ilha e avaliar a distância entre ilhas e assim identificar a colocalização processos biológicos diferentes.

# 5.1 PRODUTO 1

# Single-cell and spatial transcriptomics reveal POSTN+ pancreatic stellate cells associated with perineural invasion in pancreatic adenocarcinoma

Catarina Rosa e Silva Santos<sup>1</sup>, Kayo Felipe Barbosa<sup>1</sup>, Gustavo Henrique Brasil Rodrigues<sup>1</sup>, Gabriel Victor Lucena da Silva<sup>1</sup>, Adriana Simizo<sup>2</sup>, Ana Kelly da SIlva Fernandes Duarte<sup>1</sup>, Jussara Almeida de Oliveira Baggio<sup>1</sup>, Amanda Karine Barros Ferreira Rodrigues<sup>1</sup>, Karol Fireman de Farias<sup>1</sup>, Elaine Virginia Martins de Souza Figueiredo<sup>1</sup>, Carolinne de Sales Marques<sup>1</sup>, Carlos Alberto de Carvalho Fraga<sup>\*1,2,3</sup>

- Universidade Federal de Alagoas, Campus Arapiraca, Centro de Ciências Médicas, Av. Manoel Severino Barbosa, Bom Sucesso, CEP 57309-005 Arapiraca, AL, Brazil.
- CRID Centro de Pesquisa em Doenças Inflamatórias. Av. Bandeirantes, R. Paineiras, 3900 - Casa 03 - Vila Monte Alegre, Ribeirão Preto - SP, 14049-900
- Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF), Universidade de São Paulo (USP), SP, Brazil

\*Corresponding author: carlos.fraga@arapiraca.ufal.br

#### Abstract

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is marked by its aggressive nature and poor prognosis, with perineural invasion (PNI) significantly contributing to its clinical severity. This study leverages single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) data to dissect the molecular intricacies of PNI in PDAC, focusing on the role of Pancreatic Stellate Cells (PSCs) and critical genes—SPP1, IGFBP3, PLAU, and POSTN. Analyzing intercellular communication networks through CellChat unveils a distinct signaling pattern in PNIpositive tumors, emphasizing the importance of PSCs and myeloid cells. Hierarchical, weighted gene co-expression network analysis (hdWGCNA) identifies modules associated with fundamental cellular processes, with Module M5 standing out for its involvement in antigen presentation and immune modulation. Essential genes within M5, including MDK, ITGB1, THY1, SFRP2, HLA-A, and DYNLL1, add complexity to our understanding, suggesting pivotal roles in shaping PSC behavior. Pseudotime analysis reveals dynamic temporal changes, highlighting increased cellular plasticity and inflammatory response pathways in PNI-positive samples. Essential genes exhibit distinct expression patterns: SPP1 underscores its role in PDAC's invasive phenotype, IGFBP3 hints at regulatory network contributions, PLAU implicates extracellular matrix remodeling, and POSTN suggests involvement in creating a favorable niche.

# Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) stands as a formidable malignancy, marked by a dismal 5-year survival rate of less than 10%. A defining characteristic contributing to its aggressive nature is perineural invasion (PNI), where tumor cells infiltrate along or within nerve fibers, leading to increased pain, local recurrence, and poor prognosis (1,2). The intricate molecular mechanisms orchestrating PNI in PDAC remain incompletely understood, with factors like inflammation, hypoxia, and extracellular matrix remodeling implicated in this complex process (3–5). Notably, various molecules, including nerve growth factor, semaphorins, plexins, neuropilins, and glial cell line-derived neurotrophic factor, play pivotal roles in guiding tumor cells toward nerves and modulating nerve responses to invasion (4).

In the context of PDAC, Pancreatic Ductal Cells (PSCs) take center stage as our analysis reveals a marked increase in their prevalence in perineural invasion-positive samples. This observation underscores a potential correlation between PSCs and the aggressive nature of perineural invasion (6,7). Exploring the temporal dynamics of PDAC samples through pseudotime analysis unveils the pivotal roles played by critical genes like SPP1, IGFBP3, PLAU, and POSTN in the context of PNI. These findings not only deepen our understanding of PDAC progression but also open avenues for targeted therapeutic interventions, offering hope for improved clinical outcomes in the face of this formidable malignancy (8,9).

The comprehensive exploration of cellular profiles extends to the stromal and immune landscape, revealing significant alterations in endothelial, myeloid, and T cells in perineural invasion-positive samples(10). These observations underscore the intricate interplay between tumor cells and the surrounding microenvironment during the invasive process. Integrating high-dimensional approaches, including hdWGCNA and pseudotime analysis, unravels distinct modules and gene expression patterns associated with perineural invasion. This provides a nuanced perspective on the molecular intricacies driving PDAC aggressiveness (10,11). As we delve into the spatial transcriptome, our analysis sheds light on the spatial organization of cell types, offering valuable insights into the spatial trajectories simulating the tumor process and further enhancing our understanding of the complex interplay within the tumor microenvironment (12).

This study unravels the multifaceted dynamics of perineural invasion in PDAC. Employing single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) data, we conduct an in-depth analysis to delineate distinctive cellular profiles and gene expression patterns in perineural invasion-positive and perineural invasion-negative PDAC samples. The focus extends to PSCs, exploring their potential correlation with perineural invasion. PSCs emerge as key players, with a conspicuous elevation in perineural invasion-positive models, suggesting a possible association with the invasive phenotype. Further investigation into PSC behavior involves advanced analytical approaches such as hierarchical, weighted gene co-expression network analysis (hdWGCNA) and pseudotime analysis, shedding light on the intricate molecular landscape underlying PNI.

#### Methods

#### Single cell RNA-seq Data

Processed scRNA-seq data and annotation tables were retrieved from the GEO database under the accession number (GSE242230), an integrative analysis of 24 human parenchymal PDAC samples generated by single-cell transcriptomic. The untreated samples were selected and examined to remove unnecessary factors. We comprehensively analyzed the scRNA-seq data of six negative and 18 positive perineural invasion PDAC samples. Separately, count matrices from the chosen samples were imported into R (4.3.2) and converted to a Seurat object using the Seurat package (4.4.0).

# **Cell–Cell Interaction Analysis**

CellChat R package provides a complete toolkit for analyzing and visualizing cell-cell communication networks in scRNA-seq data. CellChat R package offers robust tools for analyzing and visualizing cell-cell communication networks in scRNA-seq data. By following this methodology, researchers can gain new insights into the complex cellular interactions that underlie many biological processes (13).

#### High-dimensional WGCNA (hdWCNA)

The workflow for conducting high-dimensional Weighted Gene expression network Analysis (hdWCNA) in R was performed with the "hdWGCNA" package. Briefly, the hdWCNA pipeline involves the following steps: data preprocessing, gene network construction, module identification, module preservation analysis, and functional enrichment analysis. hdWGCNA is chosen for its high-dimensional analysis capabilities, allowing the identification of co-expression modules associated with perineural invasion. This method is well-suited for exploring molecular networks and pathways implicated in PNI, providing a systems-level understanding of the regulatory mechanisms within the PDAC microenvironment (14).

In the first step, gene expression data are preprocessed to remove noise and batch effects. In the second step, a gene co-expression network is constructed based on pairwise correlations among genes. In the third step, modules or clusters of highly correlated genes are identified, and the module eigengenes are computed. In the fourth step, module preservation analysis is performed to assess the robustness of the identified modules. Finally, in the fifth step, functional enrichment analysis is performed to determine the biological processes and pathways associated with the modules.

#### **Pseudotime analysis**

The pseudotime dynamics of endothelial cells and astrocytes in cerebral metastasis were analyzed using Monocle3, a state-of-the-art computational tool. Following acquiring the scRNA-seq dataset, Monocle3 was employed for trajectory inference and pseudotime estimation, bypassing preprocessing details. This computational tool is selected for its ability to infer developmental trajectories and identify significant gene expression changes over time. The analysis aims to shed light on the progression of PNI and the roles played by critical genes at different stages.

Leveraging the advanced algorithms within Monocle3, we elucidated the temporal progression of endothelial cells and astrocytes during cerebral metastasis. This methodology offers a comprehensive approach to uncovering the transcriptional dynamics and developmental trajectories within the microenvironment, shedding light on critical regulatory mechanisms and functional implications of these key cell types.

#### **Spatial Transcriptome**

Spatial transcriptome data was obtained from the GEO database (GSE). Cell Ranger imported into SPATA2 using function output was the import (SPATA2::initiateSpataObject\_10X). This function facilitated data integration and executed baseline sample processing using the recently described pipeline. To elucidate the dynamics of spatial trajectories, we utilized the SPATA2 toolbox (v2.0.4) to manually draw trajectories simulating the tumor process, carefully selecting spots within the trajectory width. To infer the spatial organization of cell types, we employed an advanced method designed to integrate spatial and single-cell data, implemented as an R package (semla, v.1.1.6, https://github.com/ludvigla/semla).

#### Results

To characterize the cellular composition and cell states associated with perineural invasion in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), we utilized single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) data obtained from skin biopsy specimens of perineural invasion-positive and perineural invasion-negative samples. The dataset comprises previously published information from five perineural invasion-positive and five perineural invasion-negative PDAC patients, along with normal tissue samples. After rigorous quality control and filtering procedures, we assembled a comprehensive dataset comprising 57,953 cells from 24 samples (Figure 1A). Data integration was performed using a batch effect correction algorithm, and subsequent analyses were carried out using a customized computational pipeline based on the Seurat package. Results were visualized through uniform manifold approximation and projection (Figure 1B).

We performed scRNA-seq analysis on PDAC samples, stratified by the presence or absence of perineural invasion, to elucidate distinctive cellular profiles that offer profound insights into the intricate molecular dynamics associated with each condition. Perineural invasion-positive samples showed a conspicuous elevation in Tumor cells (20,795) compared to perineural invasion-negative samples (5,807), implicating these cells in the invasive phenotype of PDAC. Moreover, perineural invasion-positive samples exhibited a marked increase in Pancreatic Stellate Cells (PSCs) (5,517) compared to the negligible presence in perineural invasion-negative samples (400), highlighting a potential correlation between PSCs and perineural invasion. The stromal and immune landscape in perineural invasion-positive samples was characterized by a significant rise in Endothelial cells (4,285) compared to perineural invasion-negative samples (1,097), implicating their involvement in the invasive process. Notably, Myeloid cells showed increased prevalence in perineural invasion-positive samples (4,101) compared to their counterparts in perineural invasion-negative samples (991), signifying an altered immune milieu associated with perineural invasion (Figure 1C).

Similarly, T cells demonstrated an elevated frequency in perineural invasionpositive samples (2,634) compared to perineural invasion-negative samples (369), indicating an active role of T cells in the invasive phenotype. Acinar cells were more abundant in perineural invasion-negative samples (1,415) than in perineural invasionpositive samples (198), suggesting potential alterations in acinar cell populations during perineural invasion. Beta Cells and Epsilon cells also exhibited decreased frequencies in perineural invasion-positive samples, implicating an impact on these cell types in the context of perineural invasion.

45



**Figure 1** - Profiling Cellular Diversity in PDAC samples through scRNAseq Analysis. A) Experimental approach. B) Visualization of 57,953 single cells. Cells are colored by cell type. C) Frequencies of single cells per sample type.

# Decoding CellChat and hdWCGNA Signaling Networks in Perineural Invasion-Positive PDAC

In our comprehensive exploration of PDAC tumors, we engaged in a meticulous CellChat analysis to unravel the intricate tapestry of cellular interactions. Recognizing the pivotal role of complex intercommunications among diverse cell components in driving tumor progression, our study focused on a comparative analysis using CellChat, specifically between perineural invasion-positive and perineural invasion-negative tumors. A strikingly distinct pattern emerged, with heightened significance in perineural invasion-positive tumors (Figure 2A).

Within this intricate network delineated by CellChat, a notable interaction unfolded, showcasing the synchronized production of ANXA1 by tumor cells and SPP1, IGFBP3, PLAU, and POSTN by PSCs. Remarkably, these signaling molecules found their primary recipients in myeloid cells, adorned with FPR1, CD44, and TEMEM219 receptors. This elaborate communication network was notably absent in perineural invasion-negative tumors, where signal production and reception dynamics were markedly reduced. The specificity of intercellular communication, as unveiled by CellChat analysis in perineural invasion-positive tumors, reveals a potentially unique cellular network integral to PDAC pathology. This revelation hints at a targeted modulation of signal transduction within the microenvironment of perineural invasionpositive tumors, potentially contributing to the distinctive invasive phenotype characterizing PDAC. The conspicuous expression of signal receptors in myeloid cells suggests a localized mechanism for signal regulation in these tumors, emphasizing the intricate crosstalk between tumor cells, PSCs, and myeloid cells in the broader context of PDAC (Figure 2B).

We applied an advanced analytical approach, hierarchical, weighted gene coexpression network analysis (hdWGCNA). This method identified ten distinct modules, among which M1, M5, and M8 significantly correlated with perineural invasion, shedding light on the intricate molecular landscape of PDAC progression. Module M1, characterized by hub genes associated with Cytoplasmic Translation, Peptide Biosynthetic Process, Macromolecule Biosynthetic Process, Translation, and Gene Expression, suggests an involvement in fundamental cellular processes, possibly indicative of heightened protein synthesis and cellular activity. Identifying these Α Negative Positive yeloid Incoming interaction strength Incoming interaction strength Endothelial 3 Count PDC Count Myeloid Endothelial 2 -100 100 Bcells PDC MS Bcells Tumor 150 150 2 Tcells MS Tumor 200 200 Tcells Acinar Acinai 1 250 250 Epsilon 1 Epsilon Beta Beta, 1.0 1.5 2.0 0.5 1.0 2.0 2.5 1.5 Outgoing interaction strength Outgoing interaction strength В Tumor ANXA1 CAFs PI AL Macrophages 0 0 0 0 TYROBP С PPS27 CHCHD2 KRT8 **Desmosome Organization** 1A2 **Elastic Fiber Assembly** RAMP2

pathways provides a foundation for understanding the molecular machinery underlying the behavior of PSCs in the context of perineural invasion (Figure 2C).

**Figure 2** - Cell–cell communications referenced by CellChat demonstrated notable alterations in receptors-ligands-mediated communications comparing negative and positive perineural invasion. A) Circle plots depicting the interaction numbers and interaction strength. B) Scatter plot showing the intensity of the outgoing and incoming interactions in two-dimensional manifold. The size of the circles suggests the numbers of significantly expressed receptor-ligand pathways of different cell populations. C) Schematic model representing the strongest signalings between cells. D) UMAP plot of the co-expression network. Each node represents a single gene, and edges represent co-expression links between genes and module hub genes.

Module M3 exhibits a notable enrichment in pathways related to Intracellular Oxygen Homeostasis, Regulation Of Oxidative Stress–Induced Neuron Intrinsic Apoptotic Signaling Pathway, Regulation Of Vascular Associated Smooth Muscle Cell Differentiation, and Regulation Of Vascular Wound Healing suggests a potential role in orchestrating responses to oxidative stress and contributing to vascular homeostasis. The involvement of these pathways emphasizes the multifaceted nature of cellular responses within the PDAC microenvironment.

Module M5 prominently stands out in association with perineural invasion. This module features hub genes related to Negative Regulation Of Protein Localization To Cell Surface, Positive Regulation Of Cellular Extravasation, Antigen Processing And Presentation Of Endogenous Peptide Antigen Via MHC Class I Via ER Pathway, Antigen Processing And Presentation Of Endogenous Peptide Antigen Via MHC Class I Via ER Pathway (TAP–independent), Antigen Processing And Presentation Of Endogenous Peptide Antigen Via MHC Class I Via ER Pathway (TAP–independent), Antigen Processing And Presentation Of Endogenous Peptide Antigen Via MHC Class I Via ER Pathway (TAP–independent), Antigen Processing And Presentation Of Peptide Antigen Via MHC Class Ib, Antigen Processing And Presentation Of Peptide Antigen Via MHC Class Ib, and Cotranslational Protein Targeting To Membrane. These findings strongly implicate processes related to antigen presentation, cellular communication, and immune response modulation in the context of perineural invasion.

Our investigation into Module M5 revealed an additional layer of complexity within its structure. Specifically, we identified three distinct modules intricately woven within the broader framework of M5. Their substantial enrichment for critical genes, including MDK, ITGB1, THY1, SFRP2, HLA-A, and DYNLL1, sets these modules apart. This unique molecular signature unveils a rich tapestry of gene expression intricacies that likely play a pivotal role in orchestrating the behavior of PSCs during perineural invasion.

The inclusion of MDK, recognized for its involvement in various cellular processes, suggests a multifaceted impact on PSCs within the intricate tumor microenvironment. Concurrently, ITGB1, an integral component of cell adhesion processes, and THY1, a marker associated with cell–cell interactions and signaling, further underscore the dynamic interplay within these modules. Additionally, the presence of SFRP2, known for its role in Wnt signaling, adds another layer of complexity, potentially implicating regulatory mechanisms associated with this crucial pathway.

Moreover, the enrichment of HLA-A within these modules highlights its potential involvement in immune-related processes. It raises intriguing questions about the interplay between immune responses and perineural invasion in PDAC. HLA-A, a crucial component in the antigen presentation, is pivotal in activating immune responses against aberrant cells. The significant representation of HLA-A in the identified modules suggests a potential link between immune surveillance and the regulation of perineural invasion, adding a layer of complexity to the understanding of PDAC progression.

Additionally, the presence of DYNLL1, intricately associated with dynein light chain function, introduces a fascinating dimension to our exploration of cellular transport and intracellular dynamics within the identified modules. Dynein light chains are integral components of the dynein motor complex, responsible for intracellular cargo transport along microtubules. The identification of DYNLL1 within these modules hints at potential regulatory roles in orchestrating cellular transport processes during perineural invasion. This discovery not only broadens our understanding of the molecular intricacies associated with PDAC but also underscores the need for further investigation into the specific contributions of DYNLL1 to the dynamic interplay within the tumor microenvironment, offering new avenues for targeted therapeutic interventions.

The intricate molecular signatures of these modules in Module M5 expand our understanding of the regulatory networks shaping PSC behavior and open avenues for more targeted investigations. Unraveling the specific roles these genes play in the intricate dance of molecular interactions during perineural invasion provides a nuanced perspective on the underlying biology of PDAC. This discovery prompts further exploration, suggesting that these genes may serve as potential targets for therapeutic interventions or as markers for refining diagnostic approaches in the complex landscape of pancreatic cancer.

# Pseudotime Analysis in PSCs: Contrasting Perineural Invasion in PDACs

To unravel the temporal dynamics underlying perineural invasion in PDAC, we conducted a pseudotime analysis using Monocle3 on integrated scRNA-seq data from samples categorized as negative and positive for perineural invasion. The study identified distinct pseudotime trajectories, illustrating significant gene expression changes as cells progressed through different stages of tumor development (Figure 3A).

A notable progression along the pseudotime trajectory was observed in samples positive for perineural invasion, reflecting increased cellular plasticity and invasive potential. Coordinated activation of pathways associated with inflammatory response and tumor microenvironment remodeling was evident. Specifically, genes related to nerve growth factor (NGF) signaling and neural-tumor cell interactions were overexpressed in later pseudotime stages. In contrast, samples negative for perineural invasion exhibited more stable pseudotime trajectories, indicating lower cellular plasticity and a less dynamic response throughout tumor development. Gene expression profiles in these samples suggested a more conserved regulation of cellular pathways associated with tissue homeostasis.

Our analysis of pseudotime dynamics in PDAC samples highlighted the significant involvement of critical genes in perineural invasion. SPP1, IGFBP3, PLAU, and POSTN exhibited distinct expression patterns along the pseudotime trajectory. SPP1 demonstrated increased expression in perineural invasion-positive samples, emphasizing its role in the invasive phenotype of PDAC (Figure 3B). IGFBP3, associated with growth factor signaling, displayed dynamic expression changes, suggesting its contribution to the regulatory network governing PDAC development. The encoding urokinase-type plasminogen activator PLAU showed elevated expression in later pseudotime stages in invasion-positive samples, implicating its role in extracellular matrix remodeling. POSTN, linked to the tumor microenvironment, exhibited dynamic expression, indicating its potential involvement in creating a favorable niche for tumor progression. Understanding the regulatory roles of these genes provides insights into the molecular mechanisms driving invasive phenotypes in PDAC, offering avenues for targeted therapeutic strategies (Figure 3C).



Figure 3 - Pseudotime analysis and gene set enrichment analysis (GSEA). A) Monocle3

analysis of pancreatic stellate cells, and the cells were ordered by pseudotime. B) Scatterplots for gene set enrichment analysis of pancreatic stellate cell DEGs. C) The heatmap for the expression patterns of the top significant genes (ranked by q value).

POSTN is a secreted extracellular matrix protein that was initially identified in cells from the mesenchymal lineage. It influences extracellular matrix remodeling, tissue repair, and the epithelial-mesenchymal transition, all of which can be related to tissue healing, development, and disease. Furthermore, POSTN is overexpressed in many solid tumors, mainly by stromal cells and, to a lesser extent, by tumor cells themselves. Both paracrine and autocrine signals can stimulate the expression of POSTN by stromal and tumor cells. Extracellularly secreted POSTN interacts with other extracellular matrix (ECM) proteins, such as collagens, tenascin C, and fibronectin, which produce a tumor-receptive ECM by modulating, for example, collagen cross-linking. In addition, POSTN interacts with integrin receptors present on the membrane of cancer cells, promoting cell proliferation, cell survival, epithelial-mesenchymal transition (EMT), and migration.

PLAU, is a serine protease generated by various cell types, including epithelial cells, monocytes, fibroblasts, neutrophils, and tumor cells. Its primary function lies in catalyzing the conversion of plasminogen into plasmin, thereby contributing to the proteolysis of proteins crucial for extracellular matrix (ECM) remodeling. Additionally, urokinase plays a role in the activation of growth factors. Given its significance as a critical proteolytic enzyme associated with ECM degradation, PLAU has been implicated in pivotal biological processes such as tissue remodeling, migration during development, and tumorigenesis.

# Spatial Transcriptome (ST) Profiling in PDAC tumors

Spatial transcriptomics (ST) analysis was performed on four PDAC samples. The A-FF donor cohort primarily consists of invasive carcinoma surrounded by immune, stromal, and vascular components. Despite sharing a single pathology compartment, the two tumor clusters exhibit distinct transcriptional profiles across all four replicates. In contrast, the A-FFPE donor cohort is characterized by dominance in stroma and immune components, alongside TAN. Notably, despite the significant presence of tumor-adjacent normal tissue (TAN), the transcriptional analysis resolves islets of Langerhans, small structures, containing PPY, INS, and other hallmark genes. Additionally, malignant tissue, albeit a minor portion of these sections, is distinctly resolved.





**Figure 4** - Spatial analysis of PDAC donor B. A) Cluster's distribution across tissue showing the trajectory drawn. B) Inferred gene expression changes along the trajectory. C) Cell type deconvolution performed by semla R package. D) Spatial dimension of the sample and colors the surface according to the expression of POSTN, COL3A1, COL1A1, ITGAV, SPP1and CD44 genes.

The B donor section, profiled using FFPE-probes-ST, reveals tumor invasion into the small intestine, with major structures resolved including intestinal epithelium, muscularis propria, and Brunner's glands. Similarly, the C donor section, profiled using FFPE-probes-ST, exhibits a gradient of compartments spanning vasculature, stroma, immune, TAN, and tumor compartments. Tumor tissue remains a minority, sandwiched between macrophage- and fibroblast-enriched bands. Transcriptional characterization aligns with pathology annotation. The A-FF cohort predominantly shows epithelium and stroma dominance in appropriate clusters. In contrast, the A-FFPE cohort comprises mainly exocrine, ductal, and stromal tissue, with few epithelial clusters. The B section demonstrates epithelium correspondence to both tumor and intestinal epithelium regions but not the muscularis mucosa. In the C section, minority epithelium corresponds to the tumor band, while the rest of the tissue is classified as stroma, ducts, and vascular structures. Overall, these findings suggest that ST can effectively capture both major and minor tissue compartments and their corresponding gene expression profiles across various tumor structures (Figure 4A, 5A).



**Figure 5** - Spatial analysis of PDAC donor C. A) Cluster's distribution across tissue showing the trajectory drawn. B) Inferred gene expression changes along the trajectory. C) Cell type deconvolution performed by semla R package. D) Spatial dimension of the sample and colors the surface according to the expression of POSTN, COL3A1, COL1A1, ITGAV, SPP1and CD44 genes.

In this study, we focused on investigating the expression profiles of key genes— POSTN, COL3A1, COL1A1, ITGAV, SPP1, and CD44—across PDAC samples (Figure 4B, 5B). The analysis revealed a significant presence of POSTN, along with the other identified genes, within the pancreatic stellate cells. This finding not only confirms the results obtained from single-cell RNA sequencing (scRNA) analysis but also sheds light on the molecular landscape of PDAC.

### Discussion

Pancreatic ductal adenocarcinoma remains a formidable challenge in the realm of cancer, characterized by its aggressive nature and dismal prognosis, with perineural invasion standing out as a significant contributor to its clinical severity. The exploration unveils a comprehensive view of the molecular landscape intricately associated with perineural invasion, shedding light on cellular composition and gene expression patterns that play a pivotal role in PDAC aggressiveness (6,7).

Our analytical efforts unravel distinct cellular profiles, notably showcasing an upsurge in Pancreatic Stellate Cells (PSCs) within PNI-positive samples, a marked contrast to their minimal presence in PNI-negative counterparts. This observation suggests a potential correlation between PSCs and PNI, emphasizing the pivotal significance of these cells in the invasion process. Further probing into the temporal dynamics of PDAC samples through pseudotime analysis reveals a captivating narrative, elucidating the crucial roles of critical genes in the context of PNI (15,16). SPP1, IGFBP3, PLAU, and POSTN exhibit unique expression patterns along the pseudotime trajectory, unraveling the intricate molecular ballet underpinning the invasive nature of PDAC. The fluctuating expression of IGFBP3 throughout pseudotime signifies its involvement in the complex regulatory network dictating PDAC development (17,18). Notably, escalated PLAU expression in later pseudotime stages within invasion-positive samples implicates its contribution to extracellular matrix remodeling, highlighting its potential as a critical player in invasive mechanisms. Moreover, the dynamic expression of POSTN signifies its probable engagement in establishing a conducive niche for tumor progression. This comprehensive analysis of temporal gene expression provides a deeper understanding of the molecular dynamics orchestrating perineural invasion in PDAC, offering valuable insights for targeted therapeutic strategies (19).

SPP1 takes center stage in this molecular drama, demonstrating increased expression in PNI-positive samples, underscoring its integral role in fostering the invasive phenotype of PDAC (17). Dynamic expression changes in IGFBP3, intricately associated with growth factor signaling, hint at its involvement in the regulatory network governing PDAC development. Moreover, the elevated expression of PLAU, responsible for encoding urokinase-type plasminogen activator, in PNI-positive samples suggests its potential as a promising therapeutic target, holding the key to innovative intervention strategies. Additionally, POSTN, encoding periostin, emerges as a noteworthy player, exhibiting overexpression in PNI-positive samples and implicating its intricate role in

orchestrating the tumor microenvironment, further contributing to the aggressive nature of PDAC (1,20).

Another critical factor in PNI in PDAC is the secreted phosphoprotein 1 (SPP1), also known as osteopontin (OPN). This multifunctional cytokine and extracellular matrix protein, overexpressed in PDAC, correlates with tumor stage, grade, and PNI. SPP1's interaction with various cell surface receptors activates signaling pathways that regulate cell survival, migration, and invasion, potentially facilitating PNI by modulating interactions between tumor cells, nerve cells, and stromal cells (4,5,21). SPP1 induces nerve growth factor expression and its receptor TrkA, enhancing chemotactic responses to nerve-derived cues. Furthermore, SPP1 stimulates the production of matrix metalloproteinases and other proteases, facilitating tumor cell penetration of the nerve sheath. Additionally, SPP1 inhibits PDAC cell apoptosis, increasing resistance to chemotherapy and radiotherapy and suggesting its potential as a therapeutic target (1,2,4,5).

Several strategies, including neutralizing antibodies, antisense oligonucleotides, small interfering RNAs, and small molecule inhibitors, have been proposed to block SPP1 function, showing promise in preclinical PDAC models by reducing tumor growth, PNI, and metastasis (1–3,20). However, the safety and efficacy of these agents require evaluation in clinical trials. In conclusion, PNI significantly contributes to the aggressiveness and poor outcomes of PDAC. Understanding the molecular mechanisms may lead to innovative therapeutic strategies for preventing or treating PNI, ultimately improving the quality of life and survival of PDAC patients (10,17).

Our comprehensive findings suggest that PNI-positive samples manifest a more dynamic response throughout the intricate journey of tumor development, marked by heightened cellular plasticity and invasive potential. Moreover, identifying critical genes associated with PNI unveils promising therapeutic targets, presenting potential avenues for novel and innovative interventions. However, the intricate roles these genes play in the context of PNI necessitate further in-depth studies to unveil precise underlying mechanisms. These outcomes promise to pave the way for developing innovative therapeutic strategies, mitigating the inherent aggressiveness of PDAC, and ushering in an era of improved clinical outcomes for patients grappling with this formidable malignancy.

In conclusion, our study reveals the complex molecular landscape of PNI in PDAC, highlighting the critical roles of PSCs, dynamic cellular interactions, and intricate

signaling networks. Essential genes, including SPP1, IGFBP3, PLAU, and POSTN, emerge as central players in regulating PDAC progression. These findings deepen our understanding of the molecular mechanisms underpinning PNI and open promising avenues for targeted therapeutic interventions. In the intricate landscape of pancreatic cancer, identifying these genes enhances the potential for refining diagnostic approaches and developing precision therapies, offering a beacon of hope for improved clinical outcomes in the face of this malignancy.

### References

- 1. Bapat AA, Hostetter G, Von Hoff DD, Han H. Perineural invasion and associated pain in pancreatic cancer. Nature Reviews Cancer Nature Publishing Group; 2011 p. 695–707.
- 2. Azam SH, Pecot C V. Cancer's got nerve: Schwann cells drive perineural invasion. Journal of Clinical Investigation. 2016.
- 3. Fagan JJ, Collins B, Barnes L, D'Amico F, Myers EN, Johnson JT. Perineural invasion in squamous cell carcinoma of the head and neck. Archives of Otolaryngology Head and Neck Surgery. 1998;
- 4. Marchesi F, Piemonti L, Mantovani A, Allavena P. Molecular mechanisms of perineural invasion, a forgotten pathway of dissemination and metastasis. Cytokine Growth Factor Rev. 2010;21(1):77–82.
- 5. Harnden P, Shelley MD, Clements H, Coles B, Tyndale-Biscoe RS, Naylor B, et al. The prognostic significance of perineural invasion in prostatic cancer biopsies: A systematic review. Cancer. 2007.
- 6. Garcia PE, Adoumie M, Kim EC, Zhang Y, Scales MK, El-Tawil YS, et al. Differential Contribution of Pancreatic Fibroblast Subsets to the Pancreatic Cancer Stroma. Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 2020 Jan 1;10(3):581–99.
- Park W, Chawla A, O'Reilly EM. Pancreatic Cancer: A Review. JAMA [Internet]. 2021 Sep 7 [cited 2024 Feb 6];326(9):851–62. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34547082/
- 8. Gao F, Liu J, Gan H. The expression of POSTN and immune cell infiltration are prognostic factors of lung adenocarcinoma. Medicine [Internet]. 2022 Aug 8 [cited 2024 Feb 6];101(34):E30187. Available from: /pmc/articles/PMC9410651/
- Chen C, Guo Q, Liu Y, Hou Q, Liao M, Guo Y, et al. Single-cell and spatial transcriptomics reveal POSTN + cancer-associated fibroblasts correlated with immune suppression and tumour progression in non-small cell lung cancer. Clin Transl Med [Internet]. 2023 Dec [cited 2024 Feb 6];13(12). Available from: /pmc/articles/PMC10731139/
- Dong W, Zhao H, Xiao S, Zheng L, Fan T, Wang L, et al. Single-cell RNA-seq analyses inform necroptosis-associated myeloid lineages influence the immune landscape of pancreas cancer. Front Immunol [Internet]. 2023 [cited 2024 Feb 6];14. Available from: /pmc/articles/PMC10749962/
- 11. Gubin MM, Esaulova E, Ward JP, Malkova ON, Runci D, Wong P, et al. High-Dimensional Analysis Delineates Myeloid and Lymphoid Compartment Remodeling during Successful Immune-Checkpoint Cancer Therapy. Cell [Internet]. 2018 Nov 1

[cited 2024 Jan 14];175(4):1014-1030.e19. Available from: http://www.cell.com/article/S009286741831242X/fulltext

- 12. Gatenby RA, Gillies RJ. A microenvironmental model of carcinogenesis. Nature Reviews Cancer. 2008.
- Jin S, Guerrero-Juarez CF, Zhang L, Chang I, Ramos R, Kuan CH, et al. Inference and analysis of cell-cell communication using CellChat. Nature Communications 2021 12:1 [Internet]. 2021 Feb 17 [cited 2023 Dec 18];12(1):1–20. Available from: https://www.nature.com/articles/s41467-021-21246-9
- Morabito S, Reese F, Rahimzadeh N, Miyoshi E, Swarup V. hdWGCNA identifies coexpression networks in high-dimensional transcriptomics data. Cell Reports Methods [Internet]. 2023 Jun 26 [cited 2023 Dec 18];3(6). Available from: http://www.cell.com/article/S2667237523001273/fulltext
- 15. Sherman MH, Beatty GL. Tumor Microenvironment in Pancreatic Cancer Pathogenesis and Therapeutic Resistance. Annu Rev Pathol [Internet]. 2023 Jan 24 [cited 2024 Feb 6];18:123–48. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36130070/
- Wood LD, Canto MI, Jaffee EM, Simeone DM. Pancreatic Cancer: Pathogenesis, Screening, Diagnosis, and Treatment. Gastroenterology [Internet]. 2022 Aug 1 [cited 2024 Feb 6];163(2):386-402.e1. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35398344/
- Nallasamy P, Nimmakayala RK, Karmakar S, Leon F, Seshacharyulu P, Lakshmanan I, et al. Pancreatic Tumor Microenvironment Factor Promotes Cancer Stemness via SPP1–CD44 Axis. Gastroenterology [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Dec 19];161(6):1998-2013.e7. Available from: http://www.gastroiournal.org/orticle/S0016508521024028/fulltaxt

http://www.gastrojournal.org/article/S0016508521034028/fulltext

- Liu X, Sun Y, Li H, Li Y, Li M, Yuan Y, et al. Effect of Spp1 on nerve degeneration and regeneration after rat sciatic nerve injury. BMC Neurosci [Internet]. 2017 Mar 7 [cited 2023 Dec 19];18(1). Available from: /pmc/articles/PMC5341472/
- 19. Ahima RS, Prabakaran D, Flier JS. Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. Journal of Clinical Investigation. 1998;
- 20. Functions of chemokines in the perineural invasion of tumors (Review) [Internet]. [cited 2023 Dec 19]. Available from: https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2018.4311#
- Chinn SB, Spector ME, Bellile EL, McHugh JB, Gernon TJ, Bradford CR, et al. Impact of perineural invasion in the pathologically N0 neck in oral cavity squamous cell carcinoma. Otolaryngology - Head and Neck Surgery (United States). 2013;149(6):893– 9.

#### 5.2 PRODUTO 2

# Myeloid Cell Responses to Circadian Changes in Pancreatic Cancer Animal Model

Catarina Rosa e Silva Santos<sup>1</sup>, Gustavo Henrique Brasil Rodrigues<sup>1</sup>, Kayo Felipe Barbosa<sup>1</sup>, Gabriel Victor Lucena da Silva<sup>1</sup>, Adriana Simizo<sup>2</sup>, Ana Kelly da Silva Fernandes Duarte<sup>1</sup>, Jussara Almeida de Oliveira Baggio<sup>1</sup>, Amanda Karine Barros Ferreira Rodrigues<sup>1</sup>, Karol Fireman de Farias<sup>1</sup>, Elaine Virginia Martins de Souza Figueiredo<sup>1</sup>, Carolinne de Sales Marques<sup>1</sup>, Carlos Alberto de Carvalho Fraga<sup>\*1,2,3</sup>

- Universidade Federal de Alagoas, Campus Arapiraca, Centro de Ciências Médicas, Av. Manoel Severino Barbosa, Bom Sucesso, CEP 57309-005 Arapiraca, AL, Brazil.
- CRID Centro de Pesquisa em Doenças Inflamatórias. Av. Bandeirantes, R. Paineiras, 3900 - Casa 03 - Vila Monte Alegre, Ribeirão Preto - SP, 14049-900
- Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF), Universidade de São Paulo (USP), SP, Brazil

\*Corresponding author: carlos.fraga@arapiraca.ufal.br

### Abstract

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is a challenging cancer with poor survival rates and unclear molecular mechanisms. Recent research suggests that myeloid cells play a role in PDAC, especially under conditions of circadian disruption. This study delves into the effects of chronic jet lag on PDAC development using single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) data. The analysis reveals substantial alterations in cellular composition, interactions, and gene expression patterns in PDAC samples under normal circadian conditions compared to chronic jet lag. Notably, there is a noticeable increase in acinar and myeloid cells under chronic jet lag, indicating potential implications for tumor microenvironment dynamics. CellChat analysis unveils a distinct cytokine production profile in myeloid cells, particularly marked by the upregulation of genes associated with chemokine receptors like *Cxcl12*. This finding suggests the establishment of a specialized communication network within the tumor milieu under chronic jet lag conditions, influencing immune responses and tumor progression. High-dimensional

Weighted Gene Co-expression Network Analysis (hdWGCNA) identifies modules enriched in macrophages linked with chronic jet lag, emphasizing disrupted circadian rhythms' impact on the tumor microenvironment. Pseudotime analysis highlights specific gene expression patterns in myeloid cells under chronic jet lag, notably upregulating *Hsp90aa1*, *Hsp90ab1*, *Hsp90b1*, *Hspa5*, and *Hspa8*, indicating a cellular response to circadian disruption. These findings offer novel insights into immune dysregulation mechanisms in PDAC, including the role of chemokines like *Cxcl12* and *Ccl2*, and present potential therapeutic targets for further investigation.

**Keywords:** Pancreatic ductal adenocarcinoma, chronic jet lag, single-cell RNA sequencing, cell-to-cell interactions, gene expression patterns, immune dysregulation,

# Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) presents a formidable challenge in oncology, boasting a disheartening 5-year survival rate of less than 10%. Despite substantial research efforts, the intricate molecular mechanisms underlying PDAC development and progression remain largely elusive (Park et al., 2021; Schnittert et al., 2019; Wood et al., 2022). However, recent studies have shed light on the significant role of myeloid cells in the context of PDAC. These immune cells have emerged as key players, with their prevalence showing marked differences in PDAC samples under normal circadian conditions and those exposed to chronic jet lag (Schwartz et al., 2021, 2023).

Exploring the temporal dynamics of PDAC samples through pseudotime analysis has revealed the pivotal roles played by myeloid cells in the context of circadian disruption (Arjona et al., 2012; Gery & Koeffler, 2010; Zhu & Zee, 2012). Notably, the analysis has unveiled a distinctive pattern of cytokine production by myeloid cells under conditions of chronic jet lag, indicating a potential association between circadian disruption and immune dysregulation within the tumor microenvironment (Buhr & Takahashi, 2013; Dunlap, 1999; Rana & Mahmood, 2010; Zee et al., 2013). Moreover, the upregulation of heat shock proteins in myeloid cells under chronic jet lag conditions suggests a concerted effort by these cells to mitigate cellular damage and maintain functional integrity in the face of circadian disruption (Schwartz et al., 2021, 2023).

The comprehensive exploration of cellular profiles extends to the stromal and immune landscape, revealing significant alterations in myeloid cells, endothelial cells, and T cells in PDAC samples exposed to chronic jet lag (Schwartz et al., 2021, 2023). These observations underscore the intricate interplay between immune cells and the surrounding microenvironment during tumor development and progression, particularly under conditions of circadian disruption. Integrating high-dimensional approaches, including hdWGCNA and pseudotime analysis, unravels distinct modules and gene expression patterns associated with immune dysregulation induced by circadian disruption. This provides a nuanced perspective on the molecular intricacies driving PDAC aggressiveness under conditions of altered circadian rhythms (Cao et al., 2019; Hughes et al., 2020; Rusu et al., 2023; Schwartz et al., 2021, 2023).

This study unravels the multifaceted dynamics of immune dysregulation in PDAC under the influence of circadian disruption. Employing single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) data, we conduct an in-depth analysis to delineate distinctive cellular profiles and gene expression patterns in PDAC samples under normal circadian conditions and those exposed to chronic jet lag. The focus extends to myeloid cells, exploring their potential correlation with immune dysregulation induced by circadian disruption. Further investigation into myeloid cell behavior involves advanced analytical approaches such as hierarchical, weighted gene co-expression network analysis (hdWGCNA) and pseudotime analysis, shedding light on the intricate molecular landscape underlying immune dysregulation induced by circadian disruption.

#### Methods

### Single cell RNA-seq Data

Processed scRNA-seq data and annotation tables were downloaded from the GEO database. We performed an extensive analysis of the scRNA-seq data of animal models for chronic jet lag. To test the hypothesis that circadian misalignment by chronic jet lag accelerates tumor initiation and development of PDAC, the authors elected to utilize the LSL-KrasG12D/+, Pdx1-Cre (KC) mouse model - a well-characterized PDAC development model - and assessed the burden of neoplastic lesions and PDAC. From 4-6 weeks of age, the KC mice underwent two distinct lighting conditions: a standard 12hour light/12-hour dark (LD) cycle representing normal circadian rhythms and a chronic jet lag model designed to disrupt circadian patterns, simulating environmental disturbances seen in humans. The CJ regimen involved a 12-hour LD cycle shifted forward by 4 hours every 2-3 days. These conditions persisted until the mice reached 5 and 9 months of age, marking the study's conclusion. At 5 months, KC mice typically develop early pre-cancerous lesions while retaining mostly normal pancreatic tissue, making this timeframe ideal for evaluating tumor initiation acceleration due to circadian misalignment. Assessments involved gauging the degree of pancreatic involvement by neoplastic lesions and fibroinflammatory infiltrates. As the fibroinflammatory infiltrates progression becomes less relevant by 9 months, the focus shifts towards higher-grade neoplastic lesions, reflecting pre-cancerous lesions evolving into cancer (Schwartz et al., 2021).

#### **Cell-Cell Interaction Analysis**

CellChat R package provides a comprehensive toolkit for analyzing and visualizing cell-cell communication networks in scRNA-seq data. CellChat R package provides a powerful set of tools for analyzing and visualizing cell-cell communication networks in scRNA-seq data. By following this methodology, researchers can gain new insights into the complex cellular interactions that underlie many biological processes (Jin et al., 2021).

#### High-dimensional WGCNA (hdWGCNA)

The workflow for conducting high-dimensional Weighted Gene expression network Analysis (hdWGCNA) in R was performed with the "hdWGCNA" package. Briefly, the hdWGCNA pipeline involves the following steps: data preprocessing, gene network construction, module identification, module preservation analysis, and functional enrichment analysis. In the first step, gene expression data are preprocessed to remove noise and batch effects. In the second step, a gene co-expression network is constructed based on pairwise correlations among genes. In the third step, modules or clusters of highly correlated genes are identified, and the module eigengenes are calculated. In the fourth step, module preservation analysis is performed to assess the robustness of the identified modules. Finally, in the fifth step, functional enrichment analysis is carried out to identify the biological processes and pathways that are associated with the modules [19]. hdWGCNA utilized the R package enrichR [20](version 3.0) to conduct enrichment analysis on the top 100 genes within each module, ranked by kME. This analysis incorporated the following databases: GO\_Biological\_Process\_2023, GO Cellular Component 2023, and GO Molecular Function 2023 (Morabito et al., 2023).

#### **Pseudotime analysis**

The pseudotime dynamics of myeloid cells was analyzed using Monocle3, a stateof-the-art computational tool. Following the acquisition of the scRNA-seq dataset, Monocle3 was employed for trajectory inference and pseudotime estimation, bypassing preprocessing details. Leveraging the advanced algorithms within Monocle3, we elucidated the temporal progression of myeloid cells during chronic jet lag. This methodology offers a comprehensive approach to uncovering the transcriptional dynamics and developmental trajectories within the microenvironment, shedding light on critical regulatory mechanisms and functional implications of these key cell types [21]. Gene set enrichment analysis (GSEA) was performed by Bioconductor package, clusterProfiler 4.0 (Wu et al., 2021).

#### Results

#### Profiling the cellular composition

To characterize the cellular composition and cell-state in pancreatic adenocarcinoma, We performed single-cell RNA sequencing (scRNAseq) analysis on pancreatic samples (1 male/female) collected from both normal circadian and chronic jet lag KC mice at 5 and 9 months. It is noteworthy that male and female mice were pooled together due to the consistent absence of sex-specific effects observed within either the normal circadian or chronic jet lag group of KC mice at 5 months or 9 months. Following filtration and dimensionality reduction, we identified a total of eight distinct heterogeneous cell types using the ScType package, comprising 42,791 cells.

The analysis uncovered significant differences in the frequency of various cell types, shedding light on the intricate cellular dynamics associated with each state. Notably, during the chronic jet lag, there was a higher prevalence of acinar (4,995) and myeloid cells (6,623), suggesting a potential role for these cell types during this physiological condition. Conversely, in the normal circadian, there was a higher frequency of pancreatic stellate (3,500) and mast cells (701), indicating a distinct cellular landscape under normal conditions. These findings underscore the dynamic nature of cellular compositions in different physiological states, providing valuable insights into the intricate cellular dynamics associated with each condition.



**Figure 1** - Profiling Cellular Diversity in PDAC samples through scRNAseq Analysis. A) Experimental approach. B) Visualization of 42,791 single cells. Cells are colored by cell type. C) Frequencies of single cells per sample type.

# Jet Lag Effects on Cell Interactions in Pancreatic Adenocarcinoma Development

Given the complex intercommunications among cell components crucial in pancreatic adenocarcinoma, CellChat analysis was conducted to evaluate the interactions between cells. In our comparative analysis using CellChat between normal circadian and chronic jet lag samples, a distinctive pattern emerged, particularly in the chronic jet lag group. Through CellChat, we discerned a pronounced interaction where immune cells, including leukocytes and myeloid cells, exhibited a cytokine-producing profile. Notably, these cytokines were observed to be selectively captured by genes associated with chemokine receptors, such as *Cxcl12* and *Ccl2*, expressed in the myeloid cells of the chronic jet lag sample. This interaction was notably absent in both normal circadian tissue and the chronic jet lag sample, where the expression of these genes was not observed.

The specific capture of immune cell-derived cytokines by myeloid cells, as indicated by the expression of *Cxcl12* and its receptors in the chronic jet lag sample, underscores a potentially unique intercellular communication network in pancreatic adenocarcinoma pathology. This finding implies a targeted modulation of cytokine signaling within the chronic jet lag pancreatic adenocarcinoma microenvironment, potentially contributing to the distinct immunological responses observed in pancreatic adenocarcinoma lesions. The exclusive expression of genes associated with chemokine receptors in myeloid cells suggests a localized mechanism for cytokine regulation in the chronic jet lag sample, highlighting the intricate crosstalk between immune cells and myeloid cells in pancreatic adenocarcinoma development. Further exploration of this molecular interaction may unveil novel insights into the immunopathogenesis of pancreatic adenocarcinoma and provide avenues for targeted therapeutic interventions aimed at modulating this specific intercellular communication network in pancreatic adenocarcinoma-affected tissues.

The hdWGCNA analysis, a powerful tool for exploring gene expression patterns and co-expression networks, provided comprehensive insights into the molecular landscape of pancreatic adenocarcinoma. The recommended approach for hdWGCNA is to choose the minimum soft power threshold that yields a Scale-Free Topology Model Fit greater than or equal to 0.8. Therefore, in this instance, our soft power threshold would be set at 12. Through this analysis, 10 distinct modules were delineated, offering a structured framework to decipher the intricate interplay of genes and biological processes underlying PDAC development and progression. Notably, among these modules, modules M3, M5, M6, M7, and M10 emerged as particularly enriched in macrophages associated with chronic jet lag, suggesting a potential link between disrupted circadian rhythms and the tumor microenvironment in PDAC.



**Figure 2** - Cell–cell communications referenced by CellChat demonstrated notable alterations in receptors-ligands-mediated communications comparing normal and disrupted circadian rhythm. A) Circle plots depicting the interaction numbers and interaction strength. B) Scatter plot showing the intensity of the outgoing and incoming interactions in two-dimensional manifold. The size of the circles suggests the numbers of significantly expressed receptor-ligand pathways of different cell populations. C) Schematic model representing the strongest signalings between cells. D) UMAP plot of the co-expression network. Each node represents a single gene, and edges represent co-expression links between genes and module hub genes.

Additionally, the analysis of enrichment demonstrated that modules 3, 5, and 7 are closely associated with pathways related to immune responses, particularly those involving interleukins. This discovery emphasizes the significant role of the immune system in shaping the microenvironment of pancreatic adenocarcinoma (PDAC) and influencing tumor progression. By uncovering the molecular mechanisms underlying immune dysregulation in PDAC, these enriched modules present promising targets for therapeutic intervention and potential biomarkers for patient stratification. Moreover, the integration of hdWGCNA analysis with insights into the immune landscape of PDAC provides a thorough understanding of the disease's complexity and reveals new avenues for precision medicine approaches.

### Integrated trajectory analysis of disease-associated myeloid cells

In our exploration of pseudotime dynamics within myeloid cells and their comparison between chronic jet lag and normal circadian conditions, we delved into the intricacies of cellular behavior over developmental trajectories. Despite rigorous analysis, we didn't observe significant variations in pseudotime across the different conditions examined. However, what emerged prominently were certain genes – Hsp90aa1, Hsp90ab1, Hsp90b1, Hspa5, and Hspa8 – which exhibited specificity to the pseudotime of chronic jet lag. This specificity suggests a unique molecular response or adaptation of myeloid cells to the prolonged disruptions in circadian rhythms characteristic of chronic jet lag.



**Figure 3** - Pseudotime analysis and gene set enrichment analysis (GSEA). A) Monocle3 analysis of pancreatic stellate cells, and the cells were ordered by pseudotime. B)

Scatterplots for gene set enrichment analysis of Hspa8 in myeloid cells. C) The heatmap for the expression patterns of the top significant genes (ranked by q value)

Following this observation, we extended our analysis to explore the broader molecular landscape using Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) focused on myeloid cells. Here, we uncovered the enrichment of pathways associated with heat shock proteins, indicating a notable cellular response to the stress induced by chronic jet lag. Heat shock proteins are known for their crucial roles in cellular homeostasis and response to various stressors. Their upregulation in myeloid cells under chronic jet lag conditions suggests a concerted effort by these cells to mitigate cellular damage and maintain functional integrity in the face of circadian disruption.

This revelation underscores the intricate interplay between circadian rhythms and the immune system, particularly within myeloid cell populations. Circadian disruptions can profoundly affect immune function, leading to dysregulated responses and potential implications for overall health. Understanding how myeloid cells adapt to these disruptions sheds light on the broader mechanisms governing immune homeostasis and the pathophysiology of circadian-related disorders. Moving forward, further exploration of these molecular pathways holds promise for uncovering novel therapeutic targets aimed at mitigating the adverse effects of circadian disruption on immune function. By elucidating the molecular underpinnings of myeloid cell dynamics in response to circadian disruption, we gain valuable insights into potential avenues for therapeutic intervention and disease management.
## Discussion

The investigation into the impact of chronic jet lag on pancreatic cancer delves into a multifaceted interplay between immune cell dynamics and the intricate molecular pathways that propel tumor development (Schwartz et al., 2021). By employing single-cell RNA sequencing techniques, researchers have uncovered nuanced differences in the cellular landscape of pancreatic cancer between individuals subjected to chronic jet lag and those maintaining normal circadian rhythms (Gery & Koeffler, 2010; Zee et al., 2013). Within the chronic jet lag group, a notable increase in the prevalence of acinar and myeloid cells emerged, hinting at the potential involvement of these cellular subsets in responding to the altered physiological conditions induced by disrupted sleep-wake cycles. This shift in cellular composition underscores the adaptive nature of the pancreatic tumor microenvironment in response to external circadian disruptions (Leung et al., 2016; Niu et al., 2015).

Moreover, an in-depth analysis of cell-to-cell interactions unveiled a distinctive cytokine production profile among immune cells, particularly marked by the upregulation of genes associated with chemokine receptors in myeloid cells. This observation suggests the establishment of a specialized intercellular communication network within the tumor milieu under chronic jet lag conditions (Schwartz et al., 2021, 2023). Such communication pathways may play pivotal roles in shaping the inflammatory response and influencing tumor progression dynamics.

Furthermore, through gene co-expression analysis, specific modules enriched in macrophages were identified, particularly associated with chronic jet lag. This enrichment implies a potential connection between perturbed circadian rhythms and the modulation of macrophage-mediated responses within the pancreatic tumor microenvironment. These findings shed light on the intricate interplay between circadian disruption and the immune landscape of pancreatic cancer, offering valuable insights into the underlying mechanisms driving disease progression.

Cytokines, a diverse group of active proteins released by the immune system, have long been recognized as regulators of immune response and inflammation. Recent research has uncovered their involvement in tumor initiation and progression, with heightened levels of specific cytokines linked to these processes (Marchesi et al., 2010). Chemokines, another class of small, secreted proteins structurally related to cytokines, play a crucial role in inflammation, immunity, and cancer-related inflammation. Classified into four subclasses based on conserved cysteine residues in their structure, chemokines and their receptors are intricately regulated by the circadian clock, influencing various aspects of innate immunity and inflammatory gene expression (Bozek et al., 2009; Marchesi et al., 2010; Mazzoccoli et al., 2012).

Among the chemokines, *Cxcl12*, a subfamily of CC chemokines, stands out for its influence on cancer metastasis. *Cxcl12* binds to receptors such as CCR2 and CCR5, modulating the activity of cancerous tumors by recruiting M2 macrophages and impacting immune system processes (Malik et al., 2022). In breast cancer, tumor-associated macrophages are primary sources of *Cxcl12* production. The interplay between *Cxcl12* and SIGLEC1 (Sialic Acid Binding Ig Like Lectin 1) establishes a regulatory loop involving tumor cells and TAMs, facilitated by TNF- $\alpha$ , leading to increased tumor cell motility. Additionally, elevated levels of TNF- $\alpha$  further support *Cxcl12* production within the tumor microenvironment (Roy et al., 2014a; Sleightholm et al., 2017).

In breast cancer, tumor-associated macrophages play a pivotal role in the production of *Cxcl12*. This chemokine establishes a regulatory loop with tumor cells and TAMs through its interaction with SIGLEC1, facilitated by TNF- $\alpha$ , thereby amplifying their expression and enhancing tumor cell motility (Roy et al., 2014a, 2014b; Sleightholm et al., 2017). In turn, both cancer cells and TAMs release substantial levels of TNF- $\alpha$ , further supporting *Cxcl12* production within the tumor microenvironment. Importantly, the presence of *Cxcl12* stimulates cancer cells to increase their production of colony stimulating factor 1 (*Csf1*), a critical factor for macrophage survival and proliferation, thus intensifying the self-stimulating loop (Malik et al., 2022; Roy et al., 2014a; Sleightholm et al., 2017).

The elevated levels of *Cxcl12* play a multifaceted role within the tumor microenvironment. Firstly, *Cxcl12* facilitates intricate communication channels between cancer cells and tumor-associated macrophages, contributing to the dynamic interplay between these cellular components (Malik et al., 2022; Roy et al., 2014a). This communication network fueled by *Cxcl12* enables the exchange of signaling molecules and promotes the progression of breast cancer by enhancing tumor cell motility and invasiveness. Furthermore, *Cxcl12* acts as a potent chemoattractant for monocytes, orchestrating the recruitment of immune cells to the tumor site (Malik et al., 2022; Roy et al., 2014a; Sleightholm et al., 2017). This recruitment process mediated by *Cxcl12* is crucial for shaping the immune landscape within breast tumors and modulating the local immune response against cancer cells. Remarkably, in murine models of metastatic breast

cancer, *Cxcl12* demonstrates an additional function by recruiting regulatory T cells (Tregs) through the chemokine receptor CCR5. This recruitment mechanism highlights the immunomodulatory properties of *Cxcl12* and its ability to influence the balance between pro-tumorigenic and anti-tumorigenic immune responses (Roy et al., 2014b; Shi et al., 2020; Sleightholm et al., 2017).

The interplay between heat shock proteins (HSPs) and disruptions in the circadian rhythm reveals an intricate relationship that affects cellular responses and molecular mechanisms essential for maintaining the body's balance. HSPs, a group of proteins crucial for shielding and repairing cells under stress, are closely linked with the body's internal clock, which regulates various physiological functions throughout the day (Hoter et al., 2018; Morán Luengo et al., 2019). When the circadian rhythm is disturbed due to factors such as irregular sleep patterns or exposure to artificial light at night, it can disrupt the normal expression and activity of HSPs. Research indicates that different types of HSPs exhibit fluctuations in their production levels throughout the day, peaking at specific times. Any disruptions to this daily rhythm can impair cells' ability to effectively respond to stressors and safeguard essential cellular processes. Furthermore, disturbances in the circadian rhythm may compromise the effectiveness of HSPs in managing cellular stress. Inadequate sleep or prolonged exposure to artificial light during nighttime hours can undermine the ability of HSPs to adequately cope with stress, rendering cells more susceptible to damage and dysfunction. This imbalance in HSP regulation could potentially elevate the risk of developing metabolic disorders, neurodegenerative conditions, and even cancer (Hoter et al., 2018).

HSPs are classified according to their molecular mass, where Hsp90 for instance means a subset of HSPs having a molecular weight of 90-kDa. Hsp90 facilitates the progression of the cell cycle and triggers signaling kinases through interactions with the Cdc37 co-chaperone, which are pivotal for activating anti-apoptotic and proliferative pathways crucial to carcinogenesis1. Neoplastic cells develop a dependence on chaperones, forming a vicious cycle where the heightened demand for Hsps results in an increase in mutated proteins. This, in turn, drives the induction of Hsps, leading to elevated translational processes and protein expression, ultimately contributing to cellular transformation. In mammalian cells, HSP90 has 4 subtypes, two of them located in cytoplasm: heat shock protein 90 alpha family class A member 1 (HSP90AB1) (Hoter et al., 2018).

HSP90AA1 and HSP90AB1 exhibit the ability to concurrently enhance the phosphorylation of necrosome components, including RIPK1, RIPK3, and MLKL. This activation, in turn, triggers various necroptosis pathways such as MLP, the mitochondrial membrane potential, and mitochondrial fission3. The process of mitochondrial fission contributes to the proliferation, metastasis, and drug resistance of cancer cells. Despite their role in promoting necroptosis, HSP90AA1 and HSP90AB1 also function as upstream regulators of endosomal sorting complexes required for transport-III (ESCRT-III). This regulatory action helps preserve membrane integrity during the initiation of necroptosis, ultimately promoting cell survival (Hoter et al., 2018; Morán Luengo et al., 2019).

A comprehensive analysis of cellular composition, interactions, and molecular pathways in pancreatic adenocarcinoma, particularly under conditions of chronic jet lag, reveals intricate dynamics within the tumor microenvironment. The distinct cellular profiles observed between normal circadian and chronic jet lag conditions underscore the influence of disrupted circadian rhythms on tumor microenvironment heterogeneity. Moreover, the identification of unique intercellular communication networks and molecular responses in chronic jet lag samples highlights the complex interplay between circadian disruption, immune function, and tumor progression. These findings provide valuable insights into potential therapeutic targets and precision medicine approaches for mitigating the adverse effects of circadian disruption on immune function and disease outcome in pancreatic adenocarcinoma.

## References

- Arjona, A., Silver, A. C., Walker, W. E., & Fikrig, E. (2012). Immunity's fourth dimension: Approaching the circadian-immune connection. In *Trends in Immunology*. https://doi.org/10.1016/j.it.2012.08.007
- Bozek, K., Relógio, A., Kielbasa, S. M., Heine, M., Dame, C., Kramer, A., & Herzel, H. (2009). Regulation of clock-controlled genes in mammals. *PLoS ONE*. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004882
- Buhr, E. D., & Takahashi, J. S. (2013). Molecular components of the Mammalian circadian clock. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 217(217), 3–27. https://doi.org/10.1007/978-3-642-25950-0\_1
- Cao, J., Spielmann, M., Qiu, X., Huang, X., Ibrahim, D. M., Hill, A. J., Zhang, F., Mundlos, S., Christiansen, L., Steemers, F. J., Trapnell, C., & Shendure, J. (2019). The single-cell transcriptional landscape of mammalian organogenesis. *Nature 2019 566:7745*, 566(7745), 496–502. https://doi.org/10.1038/s41586-019-0969-x
- Dunlap, J. C. (1999). Molecular Bases for Circadian Clocks. *Cell*, 96(2), 271–290. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80566-8

- Gery, S., & Koeffler, H. P. (2010). Circadian rhythms and cancer. In *Cell Cycle*. https://doi.org/10.4161/cc.9.6.11046
- Hoter, A., El-Sabban, M. E., & Naim, H. Y. (2018). The HSP90 Family: Structure, Regulation, Function, and Implications in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9). https://doi.org/10.3390/IJMS19092560
- Hughes, T. K., Wadsworth, M. H., Gierahn, T. M., Do, T., Weiss, D., Andrade, P. R., Ma, F., de Andrade Silva, B. J., Shao, S., Tsoi, L. C., Ordovas-Montanes, J., Gudjonsson, J. E., Modlin, R. L., Love, J. C., & Shalek, A. K. (2020). Second-Strand Synthesis-Based Massively Parallel scRNA-Seq Reveals Cellular States and Molecular Features of Human Inflammatory Skin Pathologies. *Immunity*, 53(4), 878-894.e7. https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2020.09.015
- Jin, S., Guerrero-Juarez, C. F., Zhang, L., Chang, I., Ramos, R., Kuan, C. H., Myung, P., Plikus, M. V., & Nie, Q. (2021). Inference and analysis of cell-cell communication using CellChat. *Nature Communications 2021 12:1*, *12*(1), 1–20. https://doi.org/10.1038/s41467-021-21246-9
- Leung, M., Tranmer, J., Hung, E., Korsiak, J., Day, A. G., & Aronson, K. J. (2016). Shift work, chronotype, and melatonin patterns among female hospital employees on day and night shifts. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-1178
- Malik, S., Westcott, J. M., Brekken, R. A., & Burrows, F. J. (2022). CXCL12 in Pancreatic Cancer: Its Function and Potential as a Therapeutic Drug Target. *Cancers*, 14(1). https://doi.org/10.3390/CANCERS14010086
- Marchesi, F., Piemonti, L., Mantovani, A., & Allavena, P. (2010). Molecular mechanisms of perineural invasion, a forgotten pathway of dissemination and metastasis. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 21(1), 77–82. https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.11.001
- Mazzoccoli, G., Pazienza, V., & Vinciguerra, M. (2012). Clock genes and clock-controlled genes in the regulation of metabolic rhythms. In *Chronobiology International*. https://doi.org/10.3109/07420528.2012.658127
- Morabito, S., Reese, F., Rahimzadeh, N., Miyoshi, E., & Swarup, V. (2023). hdWGCNA identifies co-expression networks in high-dimensional transcriptomics data. *Cell Reports Methods*, *3*(6). https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2023.100498
- Morán Luengo, T., Mayer, M. P., & Rüdiger, S. G. D. (2019). The Hsp70–Hsp90 Chaperone Cascade in Protein Folding. *Trends in Cell Biology*, 29(2), 164–177. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.10.004
- Niu, S. F., Chung, M. H., Chu, H., Tsai, J. C., Lin, C. C., Liao, Y. M., Ou, K. L., O'Brien, A. P., & Chou, K. R. (2015). Differences in cortisol profiles and circadian adjustment time between nurses working night shifts and regular day shifts: A prospective longitudinal study. *International Journal of Nursing Studies*. https://doi.org/10.1016/j.ijnurstu.2015.04.001
- Park, W., Chawla, A., & O'Reilly, E. M. (2021). Pancreatic Cancer: A Review. *JAMA*, 326(9), 851–862. https://doi.org/10.1001/JAMA.2021.13027
- Rana, S., & Mahmood, S. (2010). Circadian rhythm and its role in malignancy. In *Journal of Circadian Rhythms*. https://doi.org/10.1186/1740-3391-8-3
- Roy, I., Zimmerman, N. P., Mackinnon, A. C., Tsai, S., Evans, D. B., & Dwinell, M. B. (2014a). CXCL12 Chemokine Expression Suppresses Human Pancreatic Cancer Growth and Metastasis. *PLOS ONE*, 9(3), e90400. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0090400
- Roy, I., Zimmerman, N. P., Mackinnon, A. C., Tsai, S., Evans, D. B., & Dwinell, M. B. (2014b). CXCL12 Chemokine Expression Suppresses Human Pancreatic Cancer

Growth and Metastasis. PLOS ONE, 9(3), e90400.

- https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0090400
- Rusu, B., Kukreja, B., Wu, T., Dan, S. J., Feng, M. Y., & Kalish, B. T. (2023). Single-Nucleus Profiling Identifies Accelerated Oligodendrocyte Precursor Cell Senescence in a Mouse Model of Down Syndrome. *ENeuro*, 10(8). https://doi.org/10.1523/ENEURO.0147-23.2023
- Schnittert, J., Bansal, R., & Prakash, J. (2019). Targeting Pancreatic Stellate Cells in Cancer. *Trends in Cancer*, 5(2), 128–142. https://doi.org/10.1016/J.TRECAN.2019.01.001
- Schwartz, P. B., Walcheck, M. T., Berres, M., Nukaya, M., Wu, G., Carrillo, N. D., Matkowskyj, K. A., & Ronnekleiv-Kelly, S. M. (2021). Chronic jetlag-induced alterations in pancreatic diurnal gene expression. *Physiological Genomics*, 53(8), 319– 335. https://doi.org/10.1152/PHYSIOLGENOMICS.00022.2021
- Schwartz, P. B., Walcheck, M. T., Nukaya, M., Pavelec, D. M., Matkowskyj, K. A., & Ronnekleiv-Kelly, S. M. (2023). Chronic jetlag accelerates pancreatic neoplasia in conditional Kras-mutant mice. *Chronobiology International*, 40(4), 417–437. https://doi.org/10.1080/07420528.2023.2186122
- Shi, Y., Riese, D. J., & Shen, J. (2020). The Role of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 Chemokine Axis in Cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 11. https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.574667
- Sleightholm, R. L., Neilsen, B. K., Li, J., Steele, M. M., Singh, R. K., Hollingsworth, M. A., & Oupicky, D. (2017). Emerging roles of the CXCL12/CXCR4 axis in pancreatic cancer progression and therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 179, 158–170. https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2017.05.012
- Wood, L. D., Canto, M. I., Jaffee, E. M., & Simeone, D. M. (2022). Pancreatic Cancer: Pathogenesis, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Gastroenterology*, 163(2), 386-402.e1. https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2022.03.056
- Wu, T., Hu, E., Xu, S., Chen, M., Guo, P., Dai, Z., Feng, T., Zhou, L., Tang, W., Zhan, L., Fu, X., Liu, S., Bo, X., & Yu, G. (2021). clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *The Innovation*, 2(3), 100141. https://doi.org/10.1016/J.XINN.2021.100141

Zee, P. C., Attarian, H., & Videnovic, A. (2013). Circadian rhythm abnormalities. In CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology. https://doi.org/10.1212/01.CON.0000427209.21177.aa

Zhu, L., & Zee, P. C. (2012). Circadian Rhythm Sleep Disorders. In *Neurologic Clinics*. https://doi.org/10.1016/j.ncl.2012.08.011

No primeiro estudo sobre o carcinoma ductal pancreático (PDAC) revelou descobertas importantes. Primeiramente, observou-se um aumento marcante na prevalência das Células Estelares Pancreáticas (PSC) em amostras positivas para invasão perineural, sugerindo uma possível associação entre as PSCs e a natureza agressiva da invasão perineural no PDAC. Além disso, a análise de pseudotempo revelou a progressão temporal de amostras de PDAC, indicando maior plasticidade celular e potencial invasivo em amostras positivas para invasão perineural. A análise de interação célula-célula identificou padrões distintos de redes de comunicação intercelular entre tumores positivos e negativos para invasão perineural, enquanto a análise de rede de co-expressão gênica destacou módulos específicos significativamente correlacionados com a invasão perineural, fornecendo insights sobre a paisagem molecular intricada que impulsiona a progressão do PDAC. Além disso, a análise do transcriptoma espacial revelou perfis transcripcionais distintos em diferentes compartimentos teciduais, destacando a complexidade do microambiente tumoral. No entanto, limitações, como o tamanho da amostra e a complexidade biológica do PDAC, devem ser consideradas, e são necessárias pesquisas adicionais para validar as descobertas e traduzi-las em estratégias terapêuticas eficazes.

O segundo estudo revela insights significativos sobre os mecanismos moleculares e as interações celulares subjacentes à disfunção imunológica em PDAC sob a influência da perturbação circadiana. A identificação de padrões distintos de expressão gênica, interações celulares e adaptações celulares em resposta ao jet lag crônico fornece uma compreensão mais profunda da complexidade do microambiente tumoral e das respostas imunológicas associadas. Essas descobertas destacam a importância crítica das células mieloides e de sua interação com outros componentes celulares na progressão do PDAC, especialmente em contextos de perturbação circadiana.

Entretanto, algumas limitações devem ser consideradas ao interpretar os resultados deste estudo. Primeiramente, a utilização de modelos animais pode não refletir completamente a complexidade da fisiopatologia do PDAC em humanos, limitando a generalização dos achados. Além disso, a análise baseada em RNA de célula única, embora poderosa, pode apresentar vieses devido à variabilidade na captura de células e na sensibilidade de detecção de expressão gênica. Portanto, estudos complementares em modelos in vitro e em amostras clínicas de pacientes são necessários para validar e

expandir as conclusões deste estudo. Ademais, a natureza observacional do estudo impede a inferência de causalidade entre a disfunção circadiana, a resposta imune e a progressão do PDAC, sugerindo a necessidade de estudos longitudinais e intervenções experimentais para elucidar completamente essas relações. Em última análise, essas limitações destacam a importância contínua da pesquisa translacional e da colaboração interdisciplinar para avançar nosso entendimento da biologia do PDAC e identificar estratégias terapêuticas mais eficazes.

## REFERÊNCIAS

ADAMSKA, Aleksandra; DOMENICHINI, Alice; FALASCA, Marco. Pancreatic ductal adenocarcinoma: current and evolving therapies. International journal of molecular sciences, v. 18, n. 7, p. 1338, 2017.

ALBUQUERQUE, Tânia Cristina de Oliveira. **Regulação dos genes circadianos Per1 e Per2 pelo estradiol em células epiteliais do Plexo Coróide**. 2014. Tese de Doutorado.

BOU ZERDAN, Maroun et al. Single Cell RNA Sequencing: A New Frontier in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Cancers, v. 14, n. 19, p. 4589, 2022.

CABLE, Jennifer et al. Sleep and circadian rhythms: Pillars of health—A Keystone Symposia report. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 1506, n. 1, p. 18-34, 2021.

CAI, Jie et al. Advances in the epidemiology of pancreatic cancer: Trends, risk factors, screening, and prognosis. Cancer letters, v. 520, p. 1-11, 2021.

CARSKADON, Mary A. et al. Sono humano normal: uma visão geral. Princípios e prática da medicina do sono, v. 4, n. 1, pág. 13-23, 2005.

CHEN, Kai et al. Development and validation of prognostic and diagnostic model for pancreatic ductal adenocarcinoma based on scRNA-seq and bulk-seq datasets. Human Molecular Genetics, v. 31, n. 10, p. 1705-1719, 2022.

DA SILVA, Wanessa Cristina Farias et al. Perfil clínico-epidemiológico e sobrevida global em pacientes com adenocarcinoma de pâncreas em um hospital de referência em Oncologia. Revista Brasileira de Cancerologia, v. 67, n. 1, 2021.

DENG, Fan; YANG, Kai. Current status of research on the period family of clock genes in the occurrence and development of cancer. Journal of Cancer, v. 10, n. 5, p. 1117, 2019. DIBNER, Charna; SCHIBLER, Ueli; ALBRECHT, Urs. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. **Annual review of physiology**, v. 72, p. 517-549, 2010.

DRAGER, Luciano F.; KRIEGER, Eduardo M. Mecanismos de controle da pressão arterial no sono. **Rev. bras. hipertens**, v. 16, p. 169-173, 2009.

ELYADA, Ela et al. Cross-species single-cell analysis of pancreatic ductal adenocarcinoma reveals antigen-presenting cancer-associated fibroblasts. Cancer discovery, v. 9, n. 8, p. 1102-1123, 2019.

FAGIANI, Francesca et al. Molecular regulations of circadian rhythm and implications for physiology and diseases. Signal Transduction and Targeted Therapy, v. 7, n. 1, p. 41, 2022.

FINGER, Anna-Marie; DIBNER, Charna; KRAMER, Achim. Coupled network of the circadian clocks: a driving force of rhythmic physiology. FEBS letters, v. 594, n. 17, p. 2734-2769, 2020.

FISHBEIN, Anna B. et al. Circadian disruption and human health. **The Journal of clinical investigation**, v. 131, n. 19, 2021.

GARCÍA-COSTELA, María et al. Circadian genes as therapeutic targets in pancreatic cancer. Frontiers in Endocrinology, v. 11, p. 638, 2020.

GOLA, Michał et al. Neural component of the tumor microenvironment in pancreatic ductal adenocarcinoma. Cancers, v. 14, n. 21, p. 5246, 2022.

GOLOMBEK, Diego A.; ROSENSTEIN, Ruth E. Physiology of circadian entrainment. **Physiological reviews**, v. 90, n. 3, p. 1063-1102, 2010.

HALBROOK, Christopher J. et al. Pancreatic cancer: Advances and challenges. Cell, v. 186, n. 8, p. 1729-1754, 2023.

HAN, Jincheng; DEPINHO, Ronald A.; MAITRA, Anirban. Single-cell RNA sequencing in pancreatic cancer. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, v. 18, n. 7, p. 451-452, 2021.

HU, Jian-Xiong et al. Pancreatic cancer: A review of epidemiology, trend, and risk factors. World journal of gastroenterology, v. 27, n. 27, p. 4298, 2021.

HUANG, Wenyu et al. Circadian rhythms, sleep, and metabolism. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 6, p. 2133-2141, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil.Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2023.pdf

JIANG, Shan et al. A comprehensive review of pancreatic cancer and its therapeutic challenges. Aging (Albany NY), v. 14, n. 18, p. 7635, 2022.

KLATTE, Derk CF et al. Hereditary pancreatic cancer. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, v. 58, p. 101783, 2022.

KLEEFF, Jorg et al. Pancreatic cancer. Nature reviews Disease primers, v. 2, n. 1, p. 1-22, 2016.

KLEIN, Alison P. Pancreatic cancer epidemiology: understanding the role of lifestyle and inherited risk factors. Nature reviews Gastroenterology & hepatology, v. 18, n. 7, p. 493-502, 2021.

LEI, Yalan et al. Applications of single-cell sequencing in cancer research: progress and perspectives. Journal of hematology & oncology, v. 14, n. 1, p. 91, 2021.

LI, Ya et al. Melatonin for the prevention and treatment of cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 24, p. 39896, 2017.

LIU, Huiwen et al. The role of circadian clocks in cancer: Mechanisms and clinical implications. Genes & Diseases, 2022.

LUBOV, Janet E.; CVAMMEN, William; KEMP, Michael G. The impact of the circadian clock on skin physiology and cancer development. International Journal of Molecular Sciences, v. 22, n. 11, p. 6112, 2021.

LUO, Wenhao et al. Epidemiologia do câncer de pâncreas: nova versão, nova visão. Revista Chinesa de Pesquisa do Câncer, v. 5, pág. 438, 2023.

MALIK, Shalie et al. Understanding the significance of biological clock and its impact on cancer incidence. Cancer Letters, v. 527, p. 80-94, 2022.

MINEGISHI, Saika et al. Circadian clock disruption by selective removal of endogenous carbon monoxide. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2018.

MCGUIGAN, Andrew et al. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. World journal of gastroenterology, v. 24, n. 43, p. 4846, 2018.

MIZRAHI, Jonathan D. et al. Pancreatic cancer. The Lancet, v. 395, n. 10242, p. 2008-2020, 2020.

MONTARULI, Angela et al. Biological rhythm and chronotype: new perspectives in health. Biomolecules, v. 11, n. 4, p. 487, 2021.

NEVES, G. S. M. L.; MACÊDO, P. J. O. M.; GOMES, Marleide da Mota. Transtornos do sono: atualização (1/2). Revista Brasileira de Neurologia, v. 53, n. 3, p. 19-30, 2017.

NIRVANI, Minou et al. Circadian clock and oral cancer. **Molecular and clinical oncology**, v. 8, n. 2, p. 219-226, 2018.

ORTEGA-CAMPOS, Sara M. et al. Interactions of circadian clock genes with the hallmarks of cancer. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, p. 188900, 2023.

PANG, Kevin H. et al. Pancreatic Cancer: Review of the Current and Investigational Drug Landscape. Journal of Hematology Oncology Pharmacy, v. 12, n. 6, 2022. PARK, Wungki; CHAWLA, Akhil; O'REILLY, Eileen M. Pancreatic cancer: a review. Jama, v. 326, n. 9, p. 851-862, 2021.

PASQUAL, Henrique Mezzomo et al. Epidemiological surveillance of pancreatic cancer in the North region of the state of Rio Grande do Sul. Brazilian Journal of Oncology, v. 16, p. 1-11, 2020.

PENG, Junya et al. Single-cell RNA-seq highlights intra-tumoral heterogeneity and malignant progression in pancreatic ductal adenocarcinoma. Cell research, v. 29, n. 9, p. 725-738, 2019.

RICHARDS, Jacob; GUMZ, Michelle L. Mecanismo do relógio circadiano em fisiologia. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v. 12, pág. R1053-R1064, 2013.

RIKARNI, Rikarni. Pancreatic Cancer: Pathogenesis, Diagnosis, and Laboratory Tests. INDONESIAN JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY AND MEDICAL LABORATORY, v. 27, n. 3, p. 333-340, 2021.

Rossen Donev. Circadian System in the Advances in Protein Chemistry and Structural Biology, Volume 137. – cap 5. UniElsevier, 13 de set. de 2023. Disponível em: https://books.google.com.br/books?id=okvAEAAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=pt-BR&source=gbs\_ge\_summary\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

SANFORD, Ana Beatriz Aguiar et al. Circadian rhythm dysregulation and leukemia development: the role of clock genes as promising biomarkers. International Journal of Molecular Sciences, v. 23, n. 15, p. 8212, 2022.

SHEARMAN, Lauren P. et al. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. Science, v. 288, n. 5468, p. 1013-1019, 2000.

SCHEIERMANN, Christoph; KUNISAKI, Yuya; FRENETTE, Paul S. Circadian control of the immune system. Nature Reviews Immunology, v. 13, n. 3, p. 190-198, 2013.

SELVAGGI, Federico et al. Perineural invasion in pancreatic ductal adenocarcinoma: From molecules towards drugs of clinical relevance. Cancers, v. 14, n. 23, p. 5793, 2022. STEELE, Tyler A. et al. Circadian rhythm sleep–wake disorders: a contemporary review of neurobiology, treatment, and dysregulation in neurodegenerative disease. Neurotherapeutics, v. 18, n. 1, p. 53-74, 2021.

SUN, Shi-Yu; CHEN, Gui-Hai. Treatment of Circadian Rhythm Sleep–Wake Disorders. Current Neuropharmacology, v. 20, n. 6, p. 1022, 2022.

TAKAHASHI, Joseph S. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. Nature Reviews Genetics, v. 18, n. 3, p. 164-179, 2017. TARUN, A. et al. NREM sleep stages specifically alter dynamical integration of largescale brain networks. iScience, 24 (1), Article 101923. 2020.

TIROSH, Itay et al. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. Science, v. 352, n. 6282, p. 189-196, 2016.

UNGKULPASVICH, Umbhorn et al. Câncer de pâncreas e métodos de detecção. Biomedicamentos, v. 11, n. 9, pág. 2557, 2023.

WANG, Qingqing et al. Circadian Genes MBOAT2/CDA/LPCAT2/B4GALT5 in the Metabolic Pathway Serve as New Biomarkers of PACA Prognosis and Immune Infiltration. Life, v. 13, n. 5, p. 1116, 2023.

WANG, Zhifang et al. ARNTL2 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma progression through TGF/BETA pathway and is regulated by miR-26a-5p. Cell death & disease, v. 11, n. 8, p. 692, 2020.

WOLFGANG, Christopher L. et al. Recent progress in pancreatic cancer. CA: a cancer journal for clinicians, v. 63, n. 5, p. 318-348, 2013.

WOOD, Patricia A.; YANG, Xiaoming; HRUSHESKY, William JM. Clock genes and cancer. Integrative cancer therapies, v. 8, n. 4, p. 303-308, 2009.

WOOD, Laura D. et al. Pancreatic cancer: pathogenesis, screening, diagnosis, and treatment. Gastroenterology, v. 163, n. 2, p. 386-402. e1, 2022.

XU, Qinhong et al. Stromal-derived factor-1α/CXCL12-CXCR4 chemotactic pathway promotes perineural invasion in pancreatic cancer. Oncotarget, v. 6, n. 7, p. 4717, 2015.

XUAN, Wenjing et al. Circadian regulation of cancer cell and tumor microenvironment crosstalk. Trends in Cell Biology, v. 31, n. 11, p. 940-950, 2021.

YANG, Jinshou et al. Estratégias precoces de rastreamento e diagnóstico do câncer de pâncreas: uma revisão abrangente. Comunicações sobre o Câncer, v. 12, pág. 1257-1274, 2021.

ZHANG, Shu et al. Single cell transcriptomic analyses implicate an immunosuppressive tumor microenvironment in pancreatic cancer liver metastasis. Nature Communications, v. 14, n. 1, p. 5123, 2023.

ZHAO, Qin et al. The clock gene PER1 plays an important role in regulating the clock gene network in human oral squamous cell carcinoma cells. Oncotarget, v. 7, n. 43, p. 70290, 2016.

ZHAO, ZhiYu; LIU, Wei. Pancreatic cancer: a review of risk factors, diagnosis, and treatment. Technology in cancer research & treatment, v. 19, p. 1533033820962117, 2020.

ZHOU, Li et al. Ritmos circadianos e cancros: as ligações intrínsecas e os potenciais terapêuticos. Revista de Hematologia e Oncologia , v. 1, pág. 31/01/2022.