

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO
Curso de Biomedicina
IC-09

Allan dos Anjos Monteiro

**Desvendando a Diversidade Celular do Hipotálamo Lateral: O Papel do
Hormônio Concentrador de Melanina em Dados de Transcriptômica de
Célula Única**

São Paulo
2025

Allan dos Anjos Monteiro

**Mapeamento da Diversidade Celular da Área Hipotalâmica Lateral por
Transcriptômica de Célula Única: o papel do Hormônio do Concentrador
de Melanina**

Projeto de pesquisa apresentado ao
curso de Graduação em
Biomedicina do Centro Universitário
São Camilo, orientado pelo Profº
Fábio Mitsuo Lima, como requisito
parcial para a obtenção de título de
biomédico

São Paulo

2025

Introdução

O hipotálamo é uma região de controle fundamental de um amplo espectro de funções no organismo. O que mais me fascina em relação a essa região é sua diversidade em termos de estrutura, topologia e função. Entender como essa dinâmica se dá permite não somente a descrição de muitos fenômenos, mas a possibilidade de ter o hipotálamo como centro de tratamento para diferentes condições. Além disso, na minha jornada na biomedicina, tive contato com o papel de neuropeptídeos como Vasopressina, Oxitocina, Hormônio Concentrador de Melanina ao longo de projetos de pesquisa que me trouxeram cada vez mais para próximo do entendimento das funções hipotalâmicas. Essa aproximação se intensificou à medida que compreendi como circuitos neuronais hipotalâmicos, muitas vezes compostos por populações celulares específicas e altamente especializadas, são capazes de integrar sinais endócrinos, autonômicos e ambientais para orquestrar respostas fisiológicas complexas. A plasticidade funcional dessa região, assim como sua conexão íntima com aspectos comportamentais, metabólicos, reprodutivos e emocionais, amplia ainda mais meu interesse. Investigar o hipotálamo é, para mim, um caminho para integrar o conhecimento molecular ao funcionamento do organismo como um todo, e vislumbrar possibilidades terapêuticas inovadoras que partem do centro regulador para alcançar sistemas periféricos. Por fim, ter criado o interesse por bioinformática e entender como posso aplicar os conhecimentos obtidos em relação a esse campo do conhecimento para o hipotálamo me anima pela obtenção de novas descobertas e possibilidades em termos de dados de alta dimensão, com a utilização de técnicas que hoje são o estado da arte da ciência.

Contexto do Projeto

A área hipotalâmica lateral (LHA) é a maior sub-região do hipotálamo, abrigando diversas populações celulares ao longo de sua extensão. Este projeto visa aplicar técnicas aprendidas e realizar o manejo de dados de transcriptoma de célula única para analisar perfis de expressão de neuropeptídeos e receptores característicos da LHA. Como foco inicial, busca-se gerar dados preliminares sobre o papel do hormônio concentrador de melanina (MCH), um dos principais neuropeptídeos produzidos nessa região.

Objetivos

- Revisar a literatura recente sobre hipotálamo, área hipotalâmica lateral e hormônio concentrador de melanina.
- Identificar e caracterizar populações celulares da área hipotalâmica lateral (LHA) a partir de dados de transcriptoma de célula única.
- Analisar os perfis de expressão dos principais neuropeptídeos e seus receptores na LHA.
- Investigar a distribuição e o papel do hormônio concentrador de melanina (MCH) em diferentes subpopulações celulares da região.
- Aplicar ferramentas de bioinformática para o processamento, análise e visualização de dados de alta dimensão.
- Gerar resultados preliminares que contribuam para o entendimento funcional da LHA e suas implicações fisiológicas.

Etapa 1: Levantamento bibliográfico acerca do hormônio concentrador de melanina (MCH) e área hipotalâmica lateral, mecanismos de ação, vias de sinalização e circuitaria neural.

1.1 Objetivo:

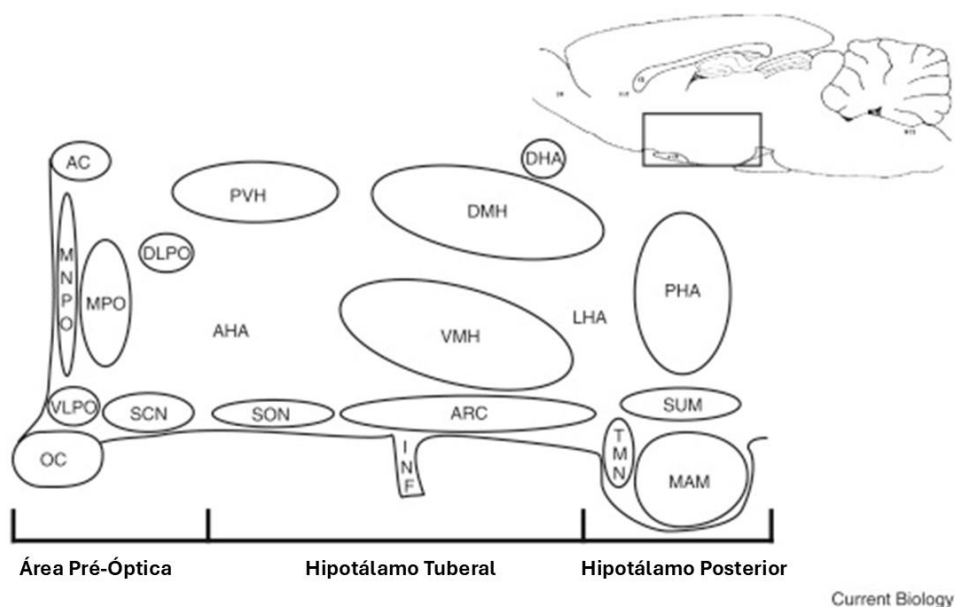
Caracterizar o hipotálamo, seus aspectos anatômicos, regiões hipotalâmicas e aspectos funcionais, descrição do papel do hormônio concentrador de melanina e mecanismos de regulação da área hipotalâmica lateral.

1.2 Desenvolvimento:

A neuroendocrinologia compreende uma intersecção de grandes sistemas fisiológicos do corpo humano, em especial, o sistema endócrino e o sistema nervoso, e permite avaliar como o ambiente influencia ambos, demonstrando sua complexidade intrínseca. Anatomicamente, define-se o hipotálamo pela superfície ventral do cérebro, anteriormente pelo quiasma óptico, lateralmente pelo trato óptico e posteriormente pelo corpo mamilar, sendo uma região altamente vascularizada (1).

Três regiões caracterizam o hipotálamo (em sentido rostral-caudal), sendo elas: porção rostral, porção tuberal hipotalâmica e porção posterior, sendo cada uma dessas regiões desempenhando papéis de controle em funções como controle de balanço energético, osmorregulação, comportamento sexual, comportamento inato, resposta ao estresse e muitas outras, sendo filogeneticamente conservado em diferentes espécies (2), sendo rico em fibras nervosas com uma série de conglomerados de corpos nucleares heterogêneos à nível de função (3).

Figura 1: Núcleos Hipotalâmicos por Região Anatômica



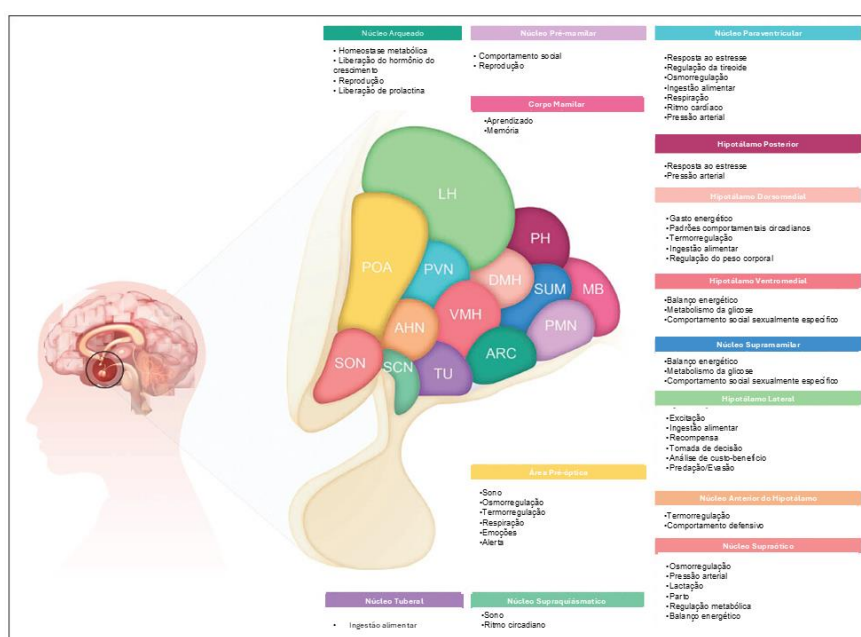
Fonte: adaptado de (4)

Aspectos funcionais caracterizam o hipotálamo como o centro integrativo de estímulo motores e sensoriais e regulador da homeostase do organismo, na medida que regula aspectos endócrinos, autonômicos e de comportamento somático (5). Nesse aspecto, é necessário discutir

de forma mais profunda o papel central da região que apresenta uma série de diferentes núcleos, com um total de 14 núcleos/regiões hipotalâmicas, projetando-se para diferentes porções do cérebro, como hipocampo (HPC), córtex pré-frontal (PFC), tronco encefálico (TE), núcleo accumbens (NAc), área periaquedutal cinza (PAG) refletindo-se em uma extensa gama de efeitos centrais e periféricos (6).

Em outras palavras, pode-se definir as funções hipotalâmicas como um sistema coordenado altamente diferenciado, no qual a integração da atividade de diversos núcleos ocorre por meio de circuitos neuronais específicos e sistemas de neurotransmissores distintos (7). Essa organização complexa permite a regulação precisa de funções essenciais à homeostase, como o controle neuroendócrino, a modulação do comportamento alimentar, a regulação do sono e da temperatura corporal, além da resposta ao estresse e ao equilíbrio energético (8).

Figura 2: Conectividade dos núcleos hipotalâmicos e características funcionais relatadas na literatura.



Fonte: Adaptado de (9)

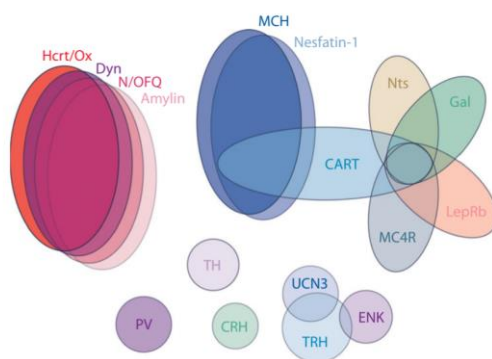
A literatura relata uma extensa gama de neuropeptídeos produzidos em territórios hipotalâmicos como envolvidos em diferentes processos de controle, dentre eles: Vasopressina, (AVP), Oxitocina (OXT), Hormônio Concentrador de Melanina [MCH] (10–12). Além disso, a área hipotalâmica lateral (LHA) é a região majoritária na produção de hipocretina/orexina e do hormônio concentrador de melanina, apresentando expressão contínua independente do sexo (13). Sua estrutura anatômica apresenta-se topologicamente bem-organizada e diferenciada, com os maiores conjuntos de neurônios do hipotálamo. O território recebe aferências de regiões como o nucleus accumbens (NAc), amígdala (AMY), hipocampo (HPC), núcleo do trato solitário (NTS) e o núcleo paraventricular (PVN), e os neurônios hipotalâmicos projetam para áreas como eminência mediana (ME), formação hipocampal (HF), córtex pré-frontal (PFC), substância cinzenta periaquedutal (PAG), pars lateralis do núcleo mamilar medial (ML), concha do núcleo accumbens (AcbSh) e o núcleo septal medial (MS) (14).

Outrossim, subpopulações de neurônios na LHA foram caracterizadas, evidenciando a complexidade e a relação dessa região com diferentes eventos fisiológicos. No entanto, os mecanismos básicos envolvidos na função da circuitaria da LHA ainda são pouco compreendidos, o que se deve, em grande parte, à alta heterogeneidade de suas subpopulações

neurônios (15). A expressão de marcadores específicos é o principal parâmetro para a identificação dessas subpopulações; entretanto, a complexidade das conexões neuronais na região indica a necessidade de abordagens amplas para a compreensão do papel funcional dessas populações celulares.

Nesse sentido, duas populações neuronais são bem caracterizadas na LHA: os neurônios produtores de hipocretina/orexina (Hcrt/Ox) e os neurônios produtores do hormônio concentrador de melanina (MCH)(15). A população Hcrt/Ox apresenta sobreposição significativa com outras moléculas sinalizadoras, como dinorfina (Dyn), nociceptina/orfanina FQ (N/OFQ) e amilina, enquanto a população MCH compartilha marcadores com nesfatina e o transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART). Além dessas, há uma terceira subpopulação mista, que inclui neurônios que expressam diferentes combinações de marcadores, como o receptor de leptina de longa isoforma (LepRb), neurotensina (Nts), receptor de melanocortina 4 (MC4R), CART e galanina (Gal). Outras subpopulações menos caracterizadas também estão presentes na LHA, incluindo aquelas que expressam urocortina-3 (UCN3), hormônio liberador de tireotropina (TRH), encefalina (Enk), tirosina hidroxilase (TH), hormônio liberador de corticotropina (CRH) e parvalbumina (PV) (Figura 3).

Figura 3: Diversidade neuroquímica de populações neuronais na LHA.



Fonte: (16)

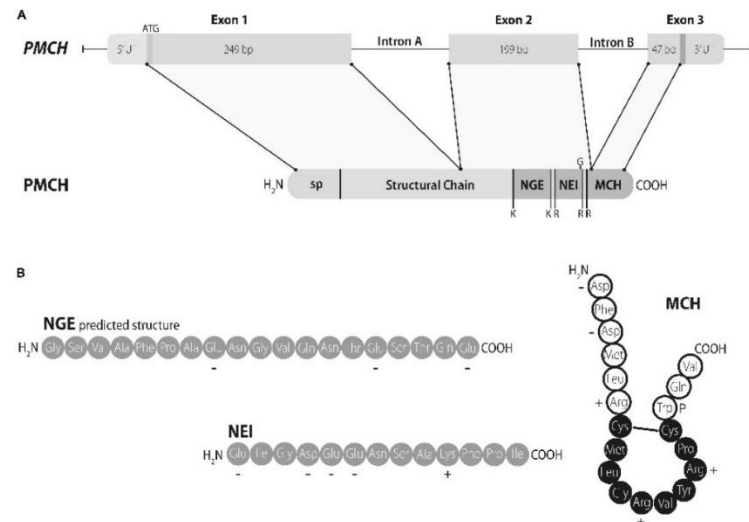
Além da diversidade neuroquímica, essas subpopulações neuronais na LHA são predominantemente neuropeptidérgicas, mas também apresentam a maquinaria necessária para a liberação de neurotransmissores de ação rápida, como GABA e glutamato. No entanto, o grau em que essas três populações principais e outras podem ser caracterizadas funcionalmente como GABAérgicas ou Glutamatérgicas ainda é um tema em debate e requer investigações adicionais para elucidar sua organização funcional dentro da circuitaria hipotalâmica.

A nível do sistema neuropeptidérgico da LHA, o hormônio concentrador de melanina (MCH) destaca-se como um neuropeptídeo de grande interesse. O MCH é codificado pelo gene PMCH, cuja organização e processamento molecular refletem sua complexidade funcional e diversidade de ações no sistema nervoso central. O gene PMCH em mamíferos é composto por três exons e dois introns, cujas dimensões variam entre espécies. No caso do humano, o transcrito do PMCH gera um produto que inclui cinco componentes principais: (i) um peptídeo sinal (SP), codificado no Exon 1; (ii) uma cadeia estrutural, formada por sequências dos Exons 1 e 2; (iii) dois peptídeos relacionados ao gene MCH (MGRPs), denominados neuropeptídeo G-E (NGE) e neuropeptídeo E-I (NEI), ambos codificados no Exon 2; e (iv) o MCH maduro, cujos primeiros três resíduos N-terminais derivam do Exon 2, enquanto o restante da sequência é codificado por uma combinação entre os Exons 2 e 3 (16).

O hormônio concentrador de melanina (MCH) é um neuropeptídeo cíclico de 19 aminoácidos produzido, em sua maioria, na área hipotalâmica lateral (LHA), seguido pela área incerto-hipotalâmica (IH), zona incerta dorsolateral (ZIdl) e área pré-óptica medial (MPOA),

sendo a última, de forma transitória apenas no período de lactação (17–19). Outras funções do MCH, assim como a ativação de seus receptores (*MCHR1*, *MCHR2*) foram descritos, correlacionando-se com uma série de eventos de mediação neuroendócrina, como homeostase energética, regulação do sono, comportamento sexual, emoções, resposta ao estresse e controle da lactação e comportamento materno (20).

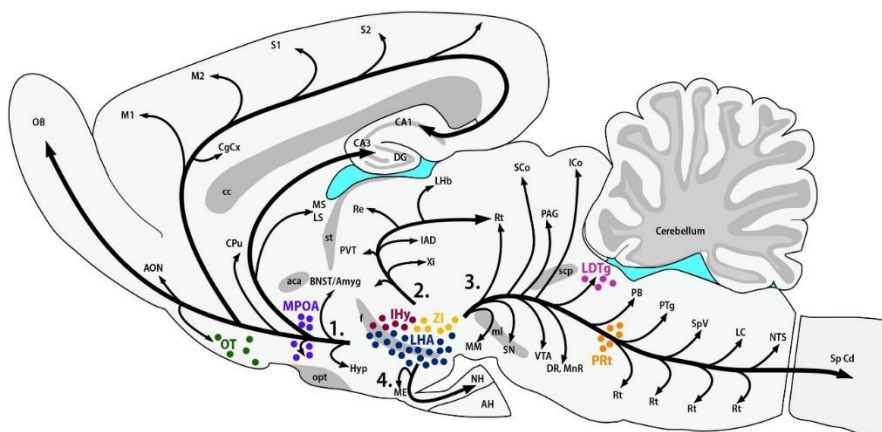
Figura 4: Esquema do processamento do gene *Pmch* e produção do hormônio MCH.



Fonte: (16)

No nível funcional, o MCH é um neuropeptídeo inibitório que exerce seus efeitos ao ativar os receptores *MCHR1* e *MCHR2*, acoplados à proteína Gi. Essa ativação leva ao recrutamento de diferentes cascatas intracelulares, influenciando processos como regulação do comportamento alimentar, metabolismo energético, sono e estados emocionais, em paralelo aos eventos, as fibras imunorreativas dos neurônios MCH se distribuem de maneira esparsa para diferentes regiões encefálicas, o que se reflete na gama de funções já descritas e relacionadas ao neuropeptídeo (21).

Figura 5: Representação esquemática das vias eferentes dos neurônios MCH localizados na LHA.



Fonte: (22)

1.3 Considerações e reflexões:

Em vista disso, é interessante observar como o hipotálamo, uma estrutura relativamente pequena desempenha um papel tão fundamental no controle de diversas funções e integra o

controle endócrino e neurológico do corpo. Além disso, as projeções dos diferentes territórios hipotalâmicos refletem a complexidade do sistema, na medida que a literatura científica avançar em tentar compreender como os neuropeptídeos, hormônios e outros elementos interagem para permitir as diferentes respostas somáticas e autonômicas. Além disso, o papel do MCH atuando como um elemento central no maior território hipotalâmico e seu papel refletido numa gama diversa de fenômenos de mediação neuroendócrina demonstra a importância e possível alvo terapêutico para um amplo espectro de doenças.

Etapas 2: Levantamento bibliográfico acerca das técnicas de sequenciamento de célula única (sc-RNA-seq) e principais metodologias de análise de dados ômicos

2.1 Objetivo: Revisar a literatura sobre a evolução, os princípios e as aplicações das técnicas de sequenciamento de RNA em célula única (scRNA-seq), bem como identificar e descrever as principais abordagens bioinformáticas utilizadas na análise de dados ômicos, com ênfase na análise de transcriptomas de célula única, incluindo etapas como pré-processamento, normalização, redução de dimensionalidade, identificação de clusters, análise de expressão diferencial e visualização.

2.2 Desenvolvimento:

A técnica de sequenciamento de célula única é um método robusto de análise de subpopulações celulares em diferentes tecidos e tem sido amplamente utilizado ao redor do mundo, permitindo elucidar mecanismos em diferentes níveis. Cada abordagem permite elucidar eventos importantes de cunho genômico, epigenômico e transcriptômico (23). Este último tem sido utilizado para compreensão de doenças, como câncer, doenças neurodegenerativas e outras diversas condições patológicas. Nesse sentido, o perfil de expressão gênica dos subgrupos celulares permite identificar padrões de respostas, estado e funcionamento celular, revelando a alta heterogeneidade celular e possíveis novos alvos terapêuticos (24). Abaixo, descreve-se as principais etapas relativas ao processamento a análise do sc-RNA-seq.

2.2.1 Preparação da Amostra:

A preparação da amostra biológica é uma etapa essencial para o sucesso de experimentos de transcriptômica de célula única. A escolha do tipo de tecido ou população celular a ser analisada deve estar alinhada com a pergunta biológica do estudo. Para tecidos sólidos, como fígado, pulmão ou músculo, é necessário realizar dissociação mecânica (geralmente por trituração ou homogeneização) seguida de dissociação enzimática (com enzimas como collagenase, tripsina ou papainase) para gerar uma suspensão celular viável. É fundamental otimizar o tempo e a temperatura de digestão para minimizar a morte celular e preservar a integridade do RNA.

No caso de tecidos mais complexos ou sensíveis, como o cérebro adulto, onde a dissociação pode induzir artefatos transcripcionais ou resultar em baixa viabilidade celular, a abordagem de sequenciamento de núcleos isolados (single-nucleus RNA-seq, snRNA-seq) é frequentemente preferida. Esse método permite a extração de núcleos intactos, evitando a degradação do RNA citoplasmático e viabilizando o estudo de tecidos preservados (como amostras congeladas). Além disso, o snRNA-seq é vantajoso para estudar células grandes ou com morfologia complexa, como neurônios.

2.2.2 Isolamento e Captura de Células Únicas:

O isolamento eficiente de células ou núcleos individuais é essencial para garantir a resolução de célula única e a fidelidade dos dados obtidos. Atualmente, as tecnologias mais utilizadas incluem abordagens baseadas em microfluídica, micropoços e métodos emergentes.

A plataforma 10x Genomics Chromium, por exemplo, utiliza microfluídica para encapsular células em emulsões de óleo, formando gotículas (droplets), cada uma contendo uma célula, enzimas de lise, oligonucleotídeos com código de barras celulares e identificadores moleculares únicos (UMIs), além de reagentes para a transcrição reversa. Essa tecnologia permite o processamento simultâneo de dezenas de milhares de células com alto rendimento e baixo custo por célula.

Já as tecnologias baseadas em micropoços, como o Smart-seq2, utilizam placas de 96 ou 384 poços para isolar células individualmente, frequentemente com auxílio de citometria de fluxo (FACS). Apesar de serem mais trabalhosas e com menor escalabilidade, proporcionam uma cobertura mais completa do transcriptoma, permitindo o sequenciamento full-length de mRNAs, sendo ideais para estudos de isoformas e splicing alternativo. Outras abordagens emergentes incluem microarrays de captura espacial (Spatial Transcriptomics), métodos baseados em microválvulas ou eletroforese, além de sistemas como Seq-Well e Drop-Seq, cada um com suas vantagens específicas em termos de custo, escalabilidade e resolução.

2.2.3 Lise Celular e Transcrição Reversa:

Após a captura, as células ou núcleos são lisados quimicamente para liberar seu conteúdo de RNA. O protocolo de lise deve ser otimizado para evitar degradação e perda de RNA, utilizando inibidores de RNase e tampões apropriados. A transcrição reversa converte o RNA em cDNA, processo catalisado por enzimas como transcriptase reversa derivada do vírus da Moloney murine leukemia (M-MLV RT). Durante essa etapa, os códigos de barras celulares (cell barcodes) e os identificadores moleculares únicos (UMIs) são incorporados ao cDNA. Essa codificação permite rastrear a origem celular de cada transcrito e distinguir entre moléculas únicas e cópias derivadas de PCR, corrigindo assim artefatos de amplificação. Essa precisão é crítica para análises quantitativas de expressão gênica em célula única.

2.2.4 Amplificação do cDNA e Preparação da Biblioteca:

Como a quantidade de cDNA obtida por célula é muito pequena, é necessário amplificá-lo por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Essa amplificação pode ser feita de forma linear (via IVT, in vitro transcription) ou exponencial (PCR), dependendo do protocolo utilizado (por exemplo, CEL-Seq usa IVT, enquanto 10x usa PCR). Após amplificação, o cDNA passa por fragmentação controlada (com enzimas ou sonicação) e é adaptado com sequências específicas (adaptadores de sequenciamento) para compatibilidade com plataformas NGS. Um controle rigoroso de qualidade é realizado por bioanalisadores ou eletroforese capilar para garantir o tamanho adequado e a complexidade da biblioteca. A biblioteca final contém todos os elementos necessários: adaptadores, índices de amostras (para multiplexação), UMIs e sequências representando o transcriptoma de cada célula.

2.2.5 Sequenciamento de Alto Rendimento:

As bibliotecas são sequenciadas em plataformas de sequenciamento de nova geração (NGS), como Illumina NovaSeq, NextSeq ou HiSeq, que geram milhões de leituras de RNA por célula. O pareamento entre os códigos de barras e as sequências permite reconstruir o perfil de expressão gênica de cada célula ou núcleo individualmente. A profundidade do sequenciamento deve ser ajustada ao tipo de célula, ao protocolo e à complexidade do transcriptoma: por exemplo, 20.000–50.000 leituras por célula são comuns para análises de expressão gênica geral, enquanto estudos que investigam isoformas ou splicing podem requerer maior cobertura. O resultado final é uma matriz de contagem gênica (gene-cell matrix), que servirá como entrada para as análises bioinformáticas subsequentes, como normalização, redução de dimensionalidade, agrupamento (clustering), identificação de tipos celulares e inferência de trajetórias celulares.

2.2.6 Análise de Bioinformática:

A análise bioinformática desempenha um papel central no processamento e interpretação dos dados gerados pelo scRNA-seq. Ferramentas como o pacote Seurat (R) são amplamente utilizadas para filtragem, normalização, redução de dimensionalidade, agrupamento e análise diferencial, permitindo a identificação de padrões de expressão gênica e a caracterização de diferentes tipos celulares. Scanpy (Python) oferece funcionalidades similares com alta eficiência computacional, enquanto métodos de aprendizado profundo, como scVI, são aplicados para integração de dados e correção de efeitos de lote, especialmente em dados heterogêneos(25).

A qualidade dos dados é crucial no scRNA-seq, exigindo a remoção de células de baixa qualidade e a correção de ruídos. A normalização dos dados, como a transformação logarítmica deslocada $\log(y+1)$, garante a comparabilidade dos perfis celulares, enquanto métodos como Scran minimizam a variação entre diferentes tipos celulares e a aproximação analítica dos resíduos de Pearson é adequada para a seleção de genes biologicamente variáveis (26). A remoção de variáveis de confusão, como efeitos de lote e ciclo celular, é essencial para a análise precisa. Métodos como Harmony e scANVI são eficazes na integração de dados de diferentes lotes, enquanto a correção do ciclo celular pode ser realizada com funções em Scanpy ou Seurat (24,27,28).

A seleção de genes informativos e a redução de dimensionalidade, utilizando Análise de Componentes Principais (PCA) e UMAP, facilitam a análise e visualização dos dados, permitindo a identificação de padrões biológicos relevantes. A identificação de clusters, utilizando algoritmos como Leiden, permite agrupar células com perfis de expressão similares, enquanto a anotação de clusters, manual ou automática, atribui identidades celulares aos clusters, utilizando marcadores genéticos e referências externas(29). A modelagem de perturbações, utilizando métodos como Mixscape e scGen, permite analisar o impacto de intervenções experimentais, enquanto a inferência da comunicação celular, com ferramentas como CellChat e LIANA, revela interações entre células(30,31). Em resumo, o scRNA-seq representa uma ferramenta poderosa para a análise da heterogeneidade celular e a elucidação de mecanismos biológicos complexos, com aplicações crescentes em diversas áreas da pesquisa biomédica.

Nos últimos anos, avanços em na técnica de transcriptômica de célula única (scRNA-seq) e abordagens de transcriptômica espacial (ST) elucidaram a compreensão da heterogeneidade celular no hipotálamo, revelando subpopulações neuronais funcionalmente e molecularmente distintas, como no caso de LHA, refletindo-se em eventos de controle do apetite, motivação e comportamento parental(32). Nos últimos anos, avanços em na técnica de transcriptômica de célula única (scRNA-seq) e abordagens de transcriptômica espacial (ST) elucidaram a compreensão da heterogeneidade celular no hipotálamo, revelando subpopulações neuronais funcionalmente e molecularmente distintas, como no caso de LHA e MPOA, refletindo-se em eventos de controle do apetite, motivação e comportamento parental (32–34). Outrossim, iniciativas como o Molecular Atlas of the Adult Mouse Brain (35) demonstram que a transcriptômica espacial pode revelar a organização molecular de sub-regiões cerebrais com alta resolução, permitindo uma classificação sistemática baseada na expressão gênica.

2.3 Considerações e reflexões:

A técnica de sequenciamento de célula única é uma ferramenta robusta para a avaliar e descrever diferentes respostas de conjuntos celulares e é fascinante a forma como a técnica avançou a ponto de se caracterizar célula-a-célula o perfil de expressão gênica. Além disso, as diferentes plataformas de análises e pacotes de Bioinformática enriquecem o campo diariamente, demonstrando novas possibilidades relativas ao avanço da técnica e permitindo novas compreensão de fenômenos e mecanismos pouco elucidados. Esse progresso tem possibilitado, por exemplo, a identificação de populações celulares raras, a reconstrução de trajetórias de diferenciação celular e a integração com outras abordagens ômicas, como epigenômica e

proteômica, ampliando ainda mais o escopo e a resolução das investigações em biologia celular e molecular.

Etapas 3: Importação e processamento de dados de sequenciamento de célula única da área hipotalâmica lateral (LHA)

3.1 Objetivo da etapa: Revisar a literatura e buscar por estudos que disponibilizaram dados de single-cell sobre LHA em banco de dados públicos e processamento de dados via Seurat v5.

3.2 Desenvolvimento:

Até o presente momento, poucos estudos foram conduzidos na tentativa de elucidar os perfis de expressão das subpopulações celulares da LHA. Nessa linha, utilizando-se da abordagem de sequenciamento de RNA de célula única baseada em microgotas, Mickelsen et al. (36) realizaram um censo molecular detalhado dos tipos celulares presentes na área hipotalâmica lateral (LHA) de camundongos (disponível em GSE125065). A análise revelou a existência de 15 populações neuronais glutamatérgicas (LHAGlut) e 15 gabaérgicas (LHAGABA), cada uma caracterizada por perfis específicos de expressão gênica, incluindo neurotransmissores rápidos, neuropeptídeos e fatores de transcrição. Essa caracterização permitiu a identificação de subpopulações previamente conhecidas, como os neurônios Hcrt⁺ e Pmch⁺, bem como a descoberta de novas populações, como os neurônios Sst⁺ glutamatérgicos.

Outrossim, Rossi et al. (37) demonstraram que a obesidade modifica profundamente o estado transcricional e a atividade funcional de neurônios glutamatérgicos da área hipotalâmica lateral (LHAVglut2), que atuam como um freio fisiológico sobre o comportamento alimentar. Utilizando uma combinação de scRNA-seq (disponível em GSE130597) e imagem de cálcio in vivo por dois fótons, os autores mostraram que, em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (HFD), os neurônios LHAVglut2 apresentaram alterações significativas na expressão de genes relacionados à excitabilidade neuronal, atividade sináptica e sinalização intracelular. Além disso, esses neurônios exibiram respostas atenuadas a recompensas calóricas, especialmente após a indução da obesidade, sugerindo um comprometimento funcional progressivo. Trajetórias pseudotemporais indicaram que a exposição crônica à HFD leva esses neurônios a um estado transcricional distinto, associado à perda de responsividade à saciedade.

Por fim, Rossi et al. (38) realizaram uma análise abrangente da heterogeneidade funcional dos neurônios glutamatérgicos da área hipotalâmica lateral (LHAVglut2), revelando que subpopulações distintas projetam-se preferencialmente para a habenula lateral (LHb) ou para a área tegmental ventral (VTA). Através de rastreamento viral retrógrado, sequenciamento de RNA de célula única e eletrofisiologia in vitro, os autores demonstraram que essas projeções são anatomicamente, transcricionalmente e funcionalmente divergentes.

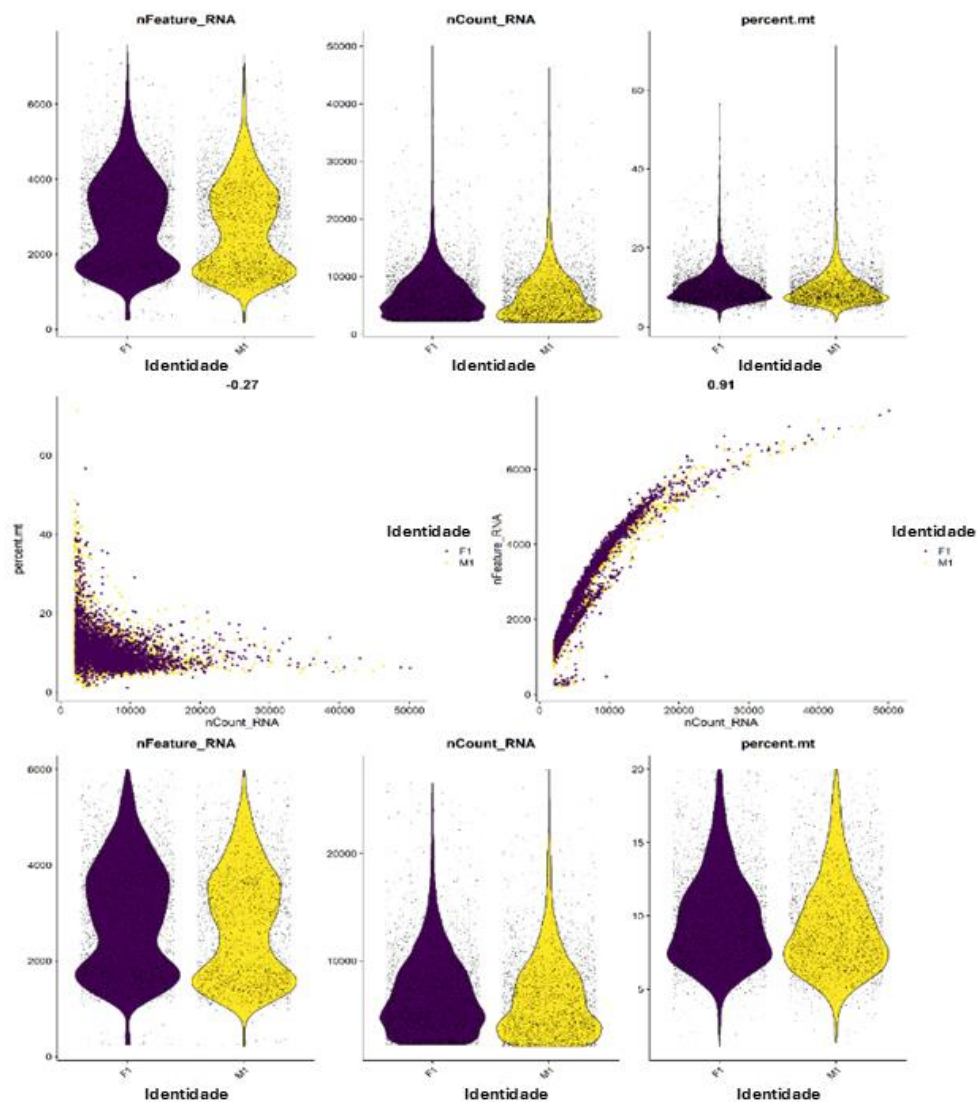
Essa gama de evidências demonstra e lança luz na heterogeneidade da LHA e como diferentes perfis. Durante a revisão da literatura, foram identificados estudos relevantes que mapearam com alta resolução a diversidade celular da LHA utilizando scRNA-seq. Dentre eles, destaca-se o trabalho de Mickelsen et al. (2019), que realizou uma caracterização abrangente de subpopulações neuronais e não-neuronais da LHA em camundongos adultos, revelando 30 populações distintas de neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos com perfis moleculares específicos. Os dados produzidos neste estudo foram disponibilizados publicamente no repositório Gene Expression Omnibus (GEO), permitindo o reuso desses dados para análises secundárias.

Foram selecionadas para esta análise duas amostras desse estudo, com códigos de acesso GSM3562050 (AJ17001) e GSM3562051 (AJ17002). As amostras estão disponíveis no formato Matrix Market (.mtx), acompanhadas de arquivos auxiliares contendo os nomes dos

genes (genes.tsv) e os barcodes das células (barcodes.tsv). Esses arquivos foram baixados e importados para o ambiente de programação R utilizando a função `ReadMtx()` do pacote Seurat, uma das ferramentas mais amplamente utilizadas para análise de dados de transcriptoma de célula única. Após a importação, cada amostra foi convertida em um objeto `SeuratObject`, nomeado de acordo com sua origem experimental (M1- Macho e F1 - Fêmea). Em seguida, os dois objetos foram integrados utilizando a função `merge()`, consolidando as informações em um único objeto analítico contendo todas as células das duas amostras, permitindo com que as análises comparativas e o estudo da heterogeneidade celular da LHA em um conjunto de dados unificado.

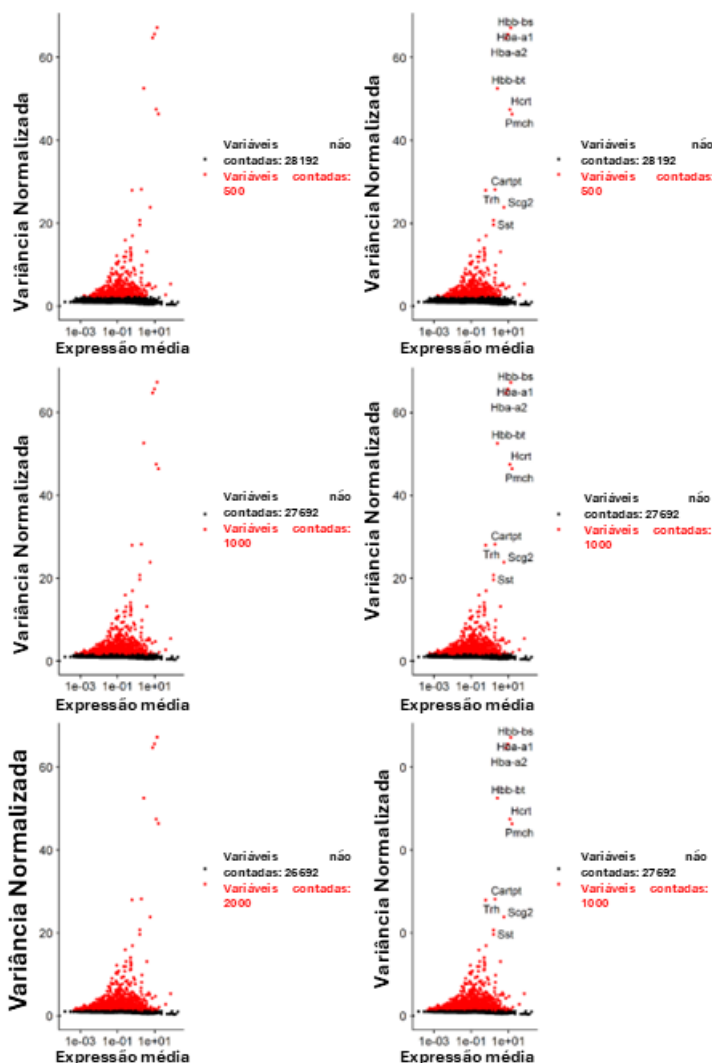
O objeto *Seurat* consolidado foi salvo como *seurat_obj_LHA.rds*, servindo como ponto de partida para todas as análises posteriores. A partir dele, foram realizadas as etapas de controle de qualidade, onde células com baixa contagem gênica, alta porcentagem de RNA mitocondrial ou possíveis artefatos foram removidas, garantindo maior confiabilidade nos dados.

Figura 6: Controle de qualidade das amostras integradas (M1 e F1) no objeto Seurat consolidado da LHA.



Fonte: Autoria Própria

Figura 7: Impacto da seleção do número de genes altamente variáveis (500, 1000 e 2000) na estrutura dos agrupamentos celulares da LHA.

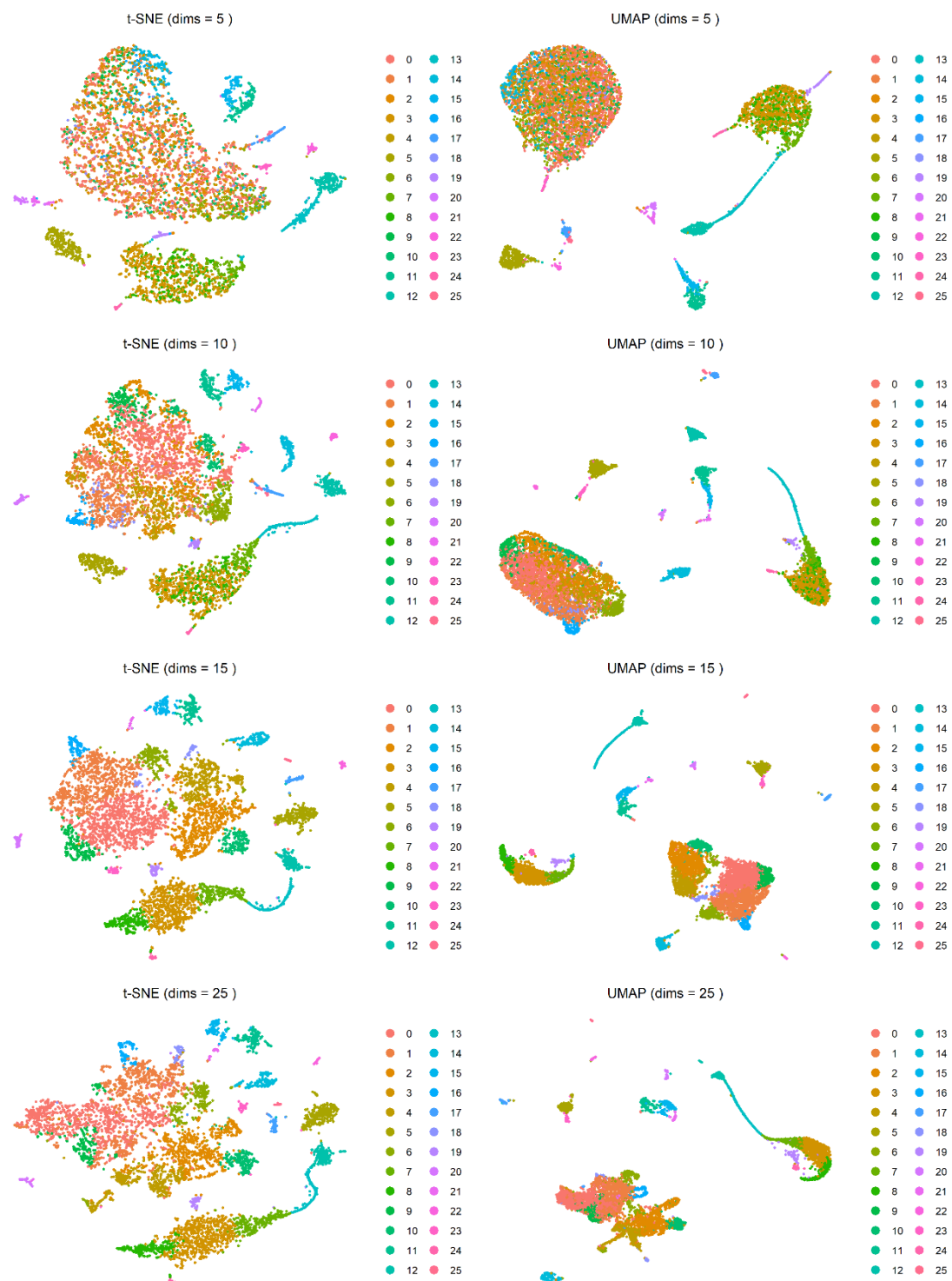


Fonte: Autoria Própria

Em seguida, os dados foram normalizados para corrigir variações técnicas e os genes mais variáveis foram identificados, fornecendo as bases para a redução de dimensionalidade, realizada por PCA, t-SNE e UMAP. A escolha do número de Componentes Principais é essencial para efeitos de clusterização dos conjuntos celulares, na medida que, pelo número de PCs, explica-se em maior ou menor grau a variância dos dados de expressão gênica.

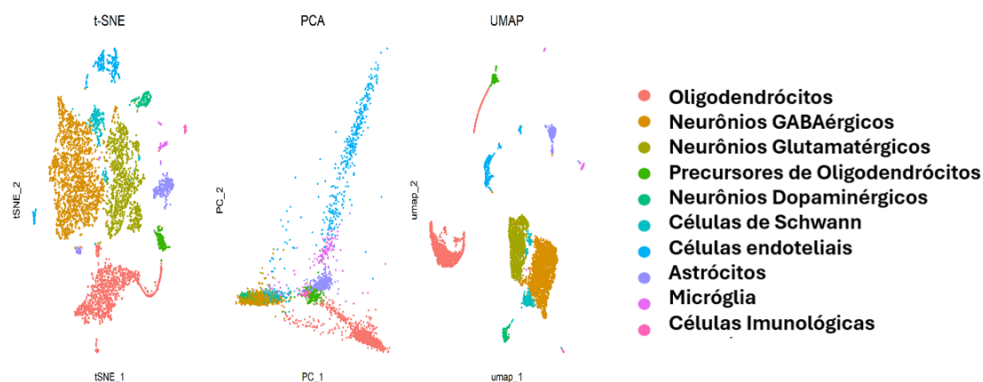
Essas projeções facilitaram a visualização da estrutura celular e a identificação de agrupamentos celulares (clusters) com perfis transcricionais semelhantes. A utilização de dados públicos de alta qualidade, como os de Mickelsen et al. (2019), permite a reanálise de experimentos robustos com custos reduzidos, promovendo a reprodutibilidade científica e possibilitando novas interpretações sobre a heterogeneidade celular da LHA.

Figura 8: Avaliação da influência do número de Componentes Principais (PCs) na definição dos agrupamentos celulares da LHA.



Fonte: Autoria Própria

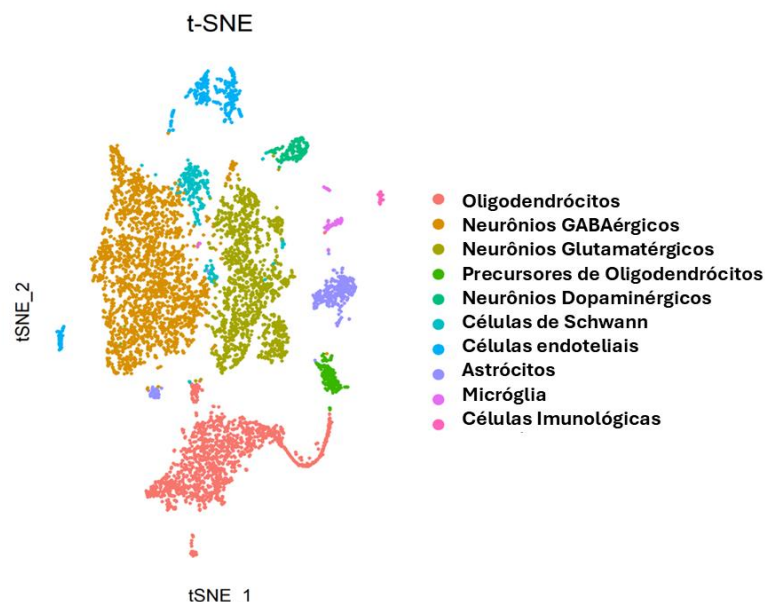
Figura 9: Comparação entre diferentes métodos de redução de dimensionalidade (PCA, t-SNE e UMAP) aplicados aos dados de expressão gênica da LHA.



Fonte: Autoria Própria

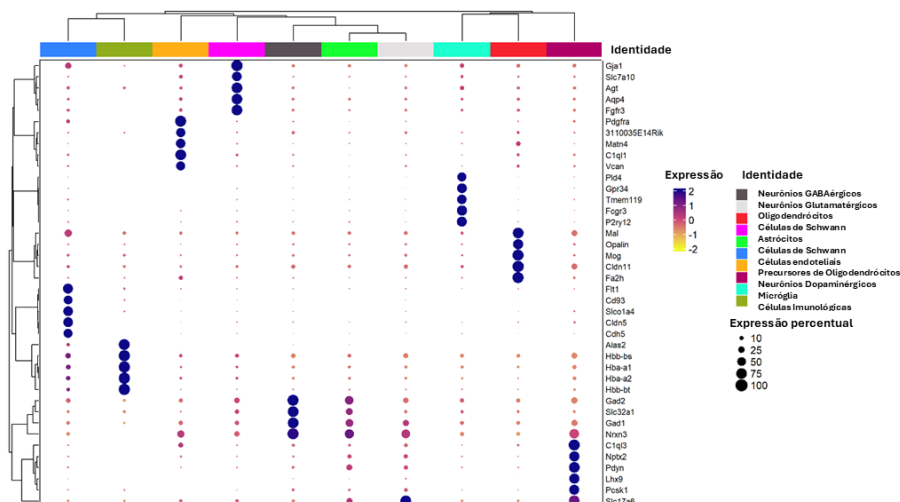
Após a definição dos agrupamentos celulares, foi realizada a anotação automatizada dos clusters utilizando o pacote ScType, que compara os perfis de expressão dos grupos com bancos de dados curados de genes marcadores específicos por tecido (39). Utilizou-se o banco “Brain” da base ScTypeDB, permitindo identificar subtipos neuronais da LHA com base em assinaturas transcricionais positivas e negativas. A classificação foi incorporada ao objeto Seurat e visualizada em uma projeção t-SNE, com os clusters rotulados por sua identidade celular predita. Clusters com baixa confiança na pontuação foram classificados como “Unknown”.

Figura 10: Projeção T-SNE dos clusters celulares da LHA anotados pelo ScType, utilizando o banco de dados “Brain” da ScTypeDB.



Fonte: Autoria Própria

Figura 11: ClusteredPlot demonstrando os marcadores celulares específicos por meio de clusterização hierárquica.



Fonte: Autoria Própria

Considerações e reflexões:

A crescente aplicação de tecnologias de transcriptômica de célula única no estudo da área hipotalâmica lateral (LHA) tem promovido uma verdadeira revolução na compreensão da diversidade celular e funcional dessa região, tradicionalmente associada à regulação do comportamento alimentar, do estado de vigília e da motivação. Os estudos de Mickelsen et al. (2019) e Rossi et al. (2019, 2021) ilustram como o avanço metodológico – aliado a estratégias complementares, como rastreamento viral, imagem funcional e eletrofisiologia – tem permitido uma caracterização mais refinada dos circuitos neuronais da LHA, evidenciando subpopulações com assinaturas moleculares e propriedades fisiológicas específicas. Em seguida, conduzir uma análise partindo do dado bruto de expressão de LHA é uma experiência que permite identificar os padrões distintos das subpopulações das células na LHA e permite a autonomia de avaliar diferentes parâmetros de construção do objeto Seurat. Isso enriquece e traz à tona a importância de cada etapa de processamento de dados advindo de sc-RNA seq para um resultado acurado.

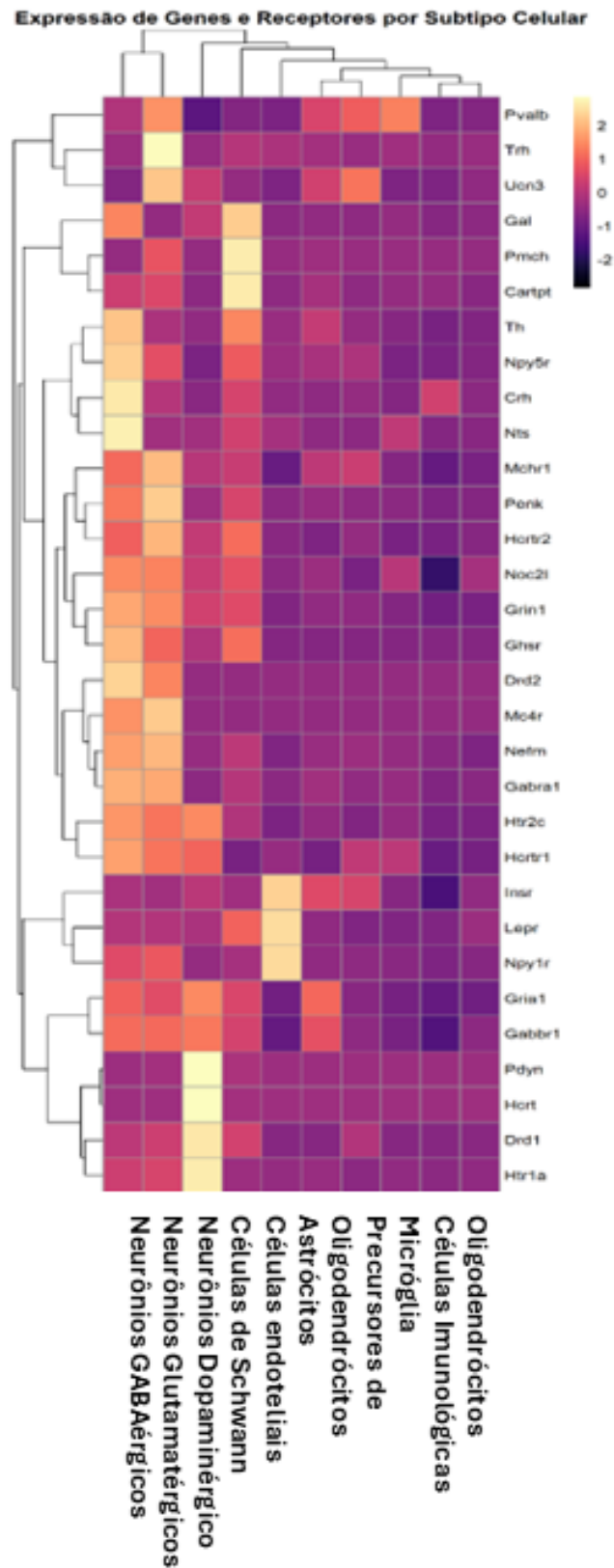
Etapas 4 – Visualização da expressão gênica e caracterização funcional das subpopulações neuronais

4.1 Objetivo: Selecionar com base na literatura os principais neuropeptídeos e receptores já descritos na LHA e visualizar a expressão via Seurat v5.

4.2 Desenvolvimento

Além disso, foi gerada uma matriz de expressão média por subtipo celular para genes previamente associados à LHA, como Hcrt, Pmch, Lepr, Mc4r, Ucn3 e Crh, bem como para receptores relevantes, incluindo os de dopamina (Drd1, Drd2), serotonina (Htr1a, Htr2c), orexina (Hcrtr1, Hcrtr2), grelina (Ghsr), insulina (Insr) (40–48). Essa matriz foi representada em heatmaps, destaca os padrões de expressão gênica por subtipo celular. Essa abordagem permitiu confirmar a identidade funcional dos agrupamentos e explorar a diversidade molecular dos neurônios presentes na LHA.

Figura 12: Heatmap de expressão gênica média por subtipo celular na LHA para genes associados à identidade funcional e receptores neuroendócrinos relevantes.

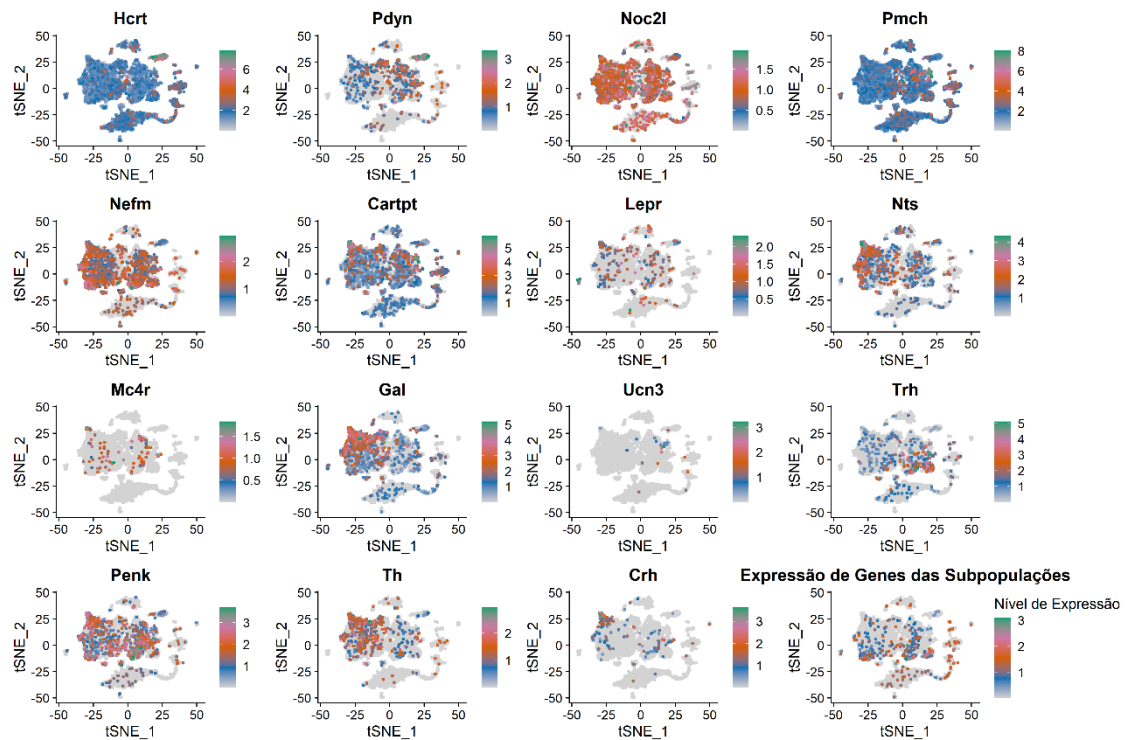


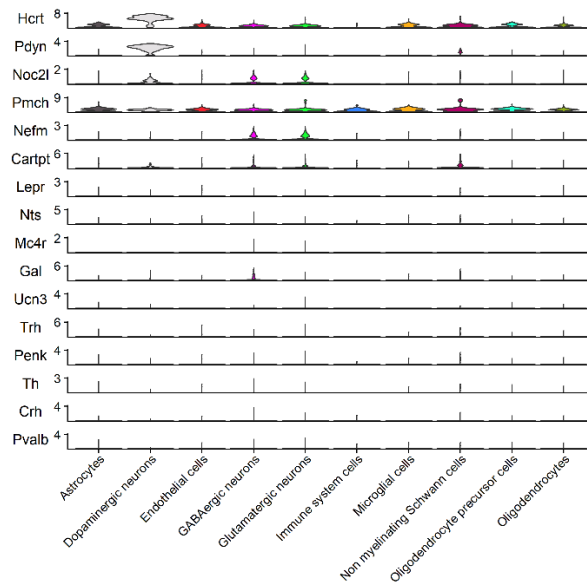
Fonte: Autoria Própria

Com as subpopulações neuronais da LHA anotadas, foram realizadas análises de visualização da expressão de genes marcadores e de receptores relevantes por meio de diferentes abordagens gráficas, utilizando projeções t-SNE e gráficos violin plot. Foram definidos

grupos de genes associados a subpopulações previamente descritas, como neurônios orexinérgicos (Hcrt, Pdyn, Pmch), MCH⁺, Lepr⁺/Mc4r⁺, entre outros. Também foram incluídos genes codificadores de receptores de neurotransmissores e neuropeptídeos como dopamina, serotonina, orexina, grelina, insulina e GABA. A visualização da expressão espacial foi feita por meio da função FeaturePlot_scCustom, gerando mapas de expressão sobre projeções t-SNE. Para análise comparativa entre subtipos celulares, foram gerados gráficos violínados empilhados (Stacked Violin Plots), permitindo observar o padrão de expressão por classe celular anotada via ScType. Complementarmente, foi criado um dotplot hierarquicamente agrupado com os genes marcadores mais expressos por subtipo, identificados com base na diferença percentual de expressão em relação aos demais grupos.

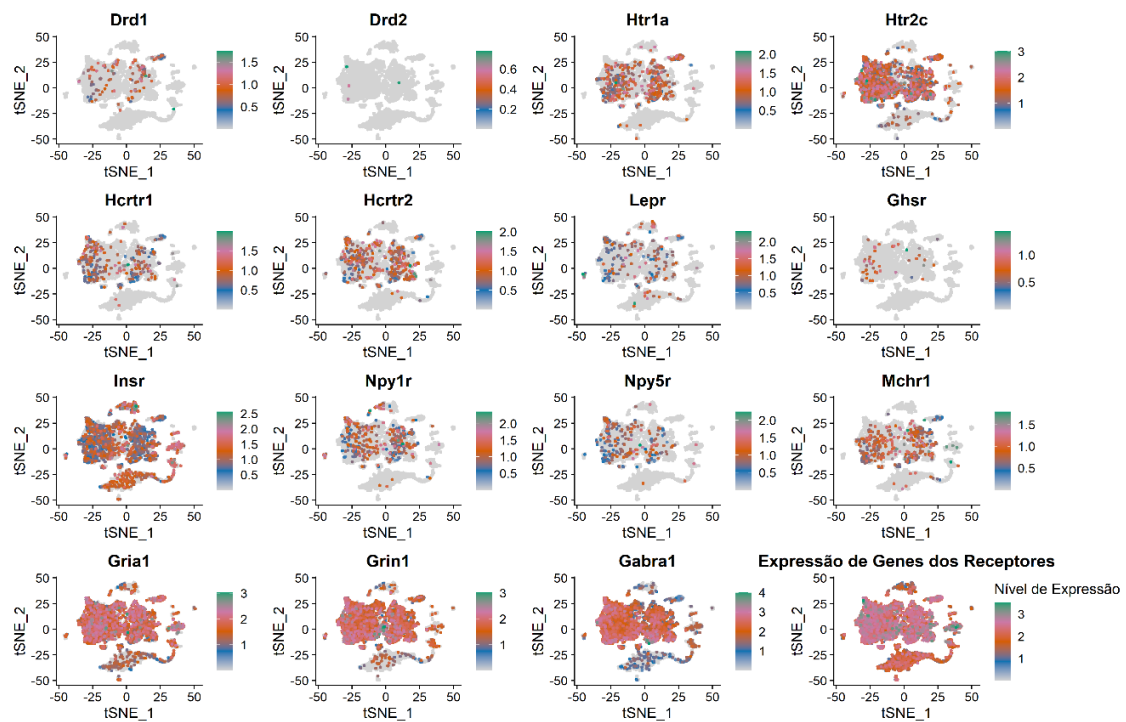
Figura 13: Visualização da expressão gênica de marcadores neuronais e receptores relevantes em subpopulações da LHA, utilizando projeções t-SNE, e violin plots empilhados.

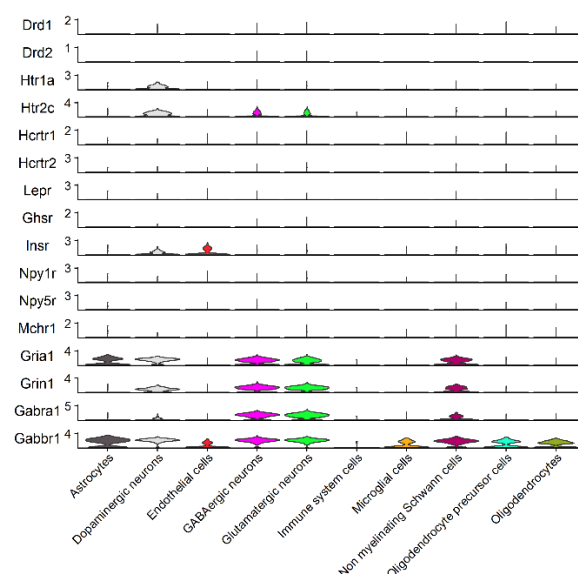




Fonte: Autoria Própria

Figura 14: Expressão espacial e diferencial de genes codificadores de receptores de neurotransmissores e neuropeptídeos (dopamina, serotonina, orexina, grelina, insulina, GABA) nas subpopulações neuronais da LHA.





Fonte: Autoria Própria

4.3 Considerações

As análises realizadas nesta etapa evidenciam o poder da transcriptômica de célula única aliada a ferramentas de visualização gráfica para a compreensão da complexa heterogeneidade neuronal da área hipotalâmica lateral (LHA). A identificação e caracterização de subpopulações neuronais com base na expressão de genes marcadores e receptores neuroendócrinos permitiram validar a anotação celular e confirmar a presença de agrupamentos funcionalmente relevantes, como neurônios orexinérgicos, MCH^+ , $Lepr^+/Mc4r^+$, entre outros. A integração de diferentes formas de visualização, como projeções t-SNE, violin plots empilhados e heatmaps, ofereceu uma perspectiva abrangente sobre os padrões de expressão gênica, facilitando a interpretação biológica dos dados.

Além de reforçar achados previamente descritos na literatura, esta abordagem também demonstrou a aplicabilidade das ferramentas computacionais no refinamento da identidade celular, servindo como base para análises funcionais subsequentes. Essa etapa representa, portanto, um elo crucial entre a análise exploratória de dados ômicos e a formulação de hipóteses sobre a atuação funcional de subtipos neuronais específicos da LHA.

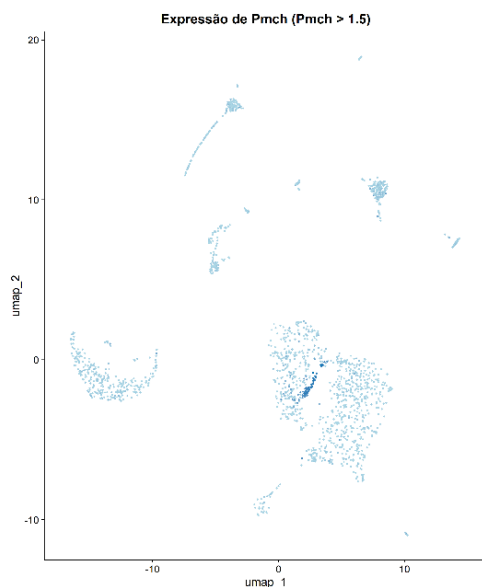
Etapa 5 – Análise de enriquecimento funcional por Ontologia Gênica (GO) em células $Pmch^+$

5.1 Objetivo: Comparar as diferenças estatísticas relativas ao sexo entre os datasets e avaliar as vias de enriquecimentos relacionadas ao subset de células que expressam $PMCH > 1.5$ Fold Change (FC)

5.2 Desenvolvimento:

Buscando compreender a assinatura funcional de subpopulações específicas, foram isoladas células com alta expressão de *Pmch* (expressão > 1.5), característica de neurônios MCH^+ . Essas células foram comparadas entre os grupos experimentais (“M1” e “F1”) com o objetivo de identificar genes diferencialmente expressos (DEGs). A seguir, os genes identificados foram submetidos a uma análise de enriquecimento funcional (Gene Ontology) nas três ontologias principais: Processos Biológicos (BP), Função Molecular (MF) e Componente Celular (CC)(49) .

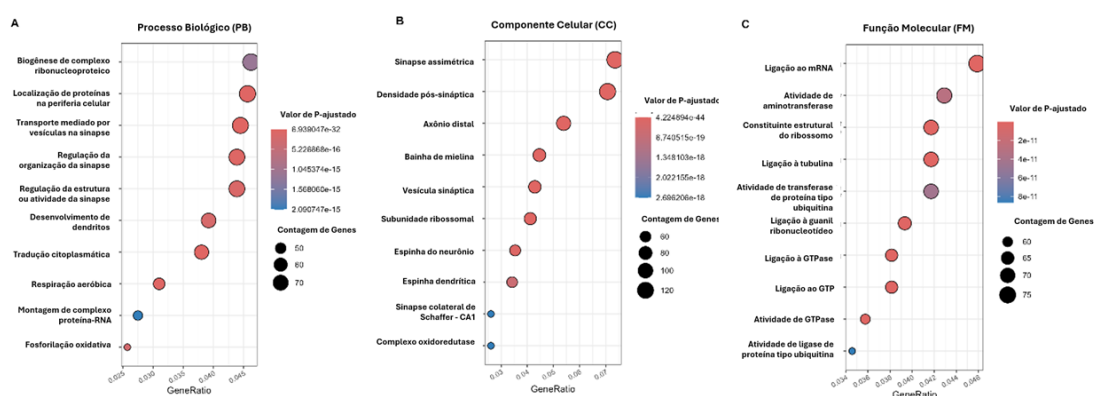
Figura 15: Projeções UMAP e t-SNE destacando células com expressão de *Pmch* superior a 1.5, evidenciando a distribuição espacial de neurônios MCH⁺ na LHA.



Fonte: Autoria Própria

A análise foi realizada com o pacote **clusterProfiler**, utilizando o banco de dados do org.Mm.eg.db. Para cada ontologia, foram gerados gráficos do tipo dotplot, representando visualmente os principais termos enriquecidos e as relações entre genes e processos (50). Essa abordagem permitiu identificar funções celulares e vias moleculares envolvidas nas subpopulações MCH⁺, contribuindo para a compreensão dos papéis funcionais dessas células na LHA.

Figura 16: Análise de enriquecimento funcional (Gene Ontology) de genes diferencialmente expressos em neurônios MCH⁺ (*Pmch* > 1.5), destacando vias associadas a processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares nos grupos “M1” e “F1”.



Fonte: Autoria Própria

5.4 Considerações e reflexões:

A análise funcional dos neurônios MCH⁺ destacou a complexidade molecular dessa subpopulação na LHA, revelando vias associadas à sinalização sináptica, atividade neuropeptidérgica e regulação celular. As diferenças observadas entre os grupos “M1” e “F1”

sugerem a existência de um dimorfismo sexual funcional, apontando para a importância de se considerar o sexo como uma variável biológica relevante em estudos da neurobiologia hipotalâmica. Esses achados reforçam o papel dos neurônios MCH⁺ na integração de sinais homeostáticos e no controle de comportamentos essenciais. A análise de enriquecimento funcional revelou que essas diferenças transcendem a simples expressão gênica, envolvendo vias moleculares específicas associadas à atividade sináptica, sinalização neuropeptídica, metabolismo energético e estrutura celular. A identificação de termos como “modulação da transmissão sináptica”, “atividade do canal iônico” e “componente da membrana plasmática” reforça a ideia de que os neurônios MCH⁺ participam ativamente da regulação de respostas fisiológicas e comportamentais complexas.

5.5 Conclusão

O presente portfólio reforça o potencial das abordagens de transcriptômica de célula única para a caracterização da heterogeneidade celular da área hipotalâmica lateral (LHA), região-chave na regulação de comportamentos como alimentação, sono e motivação. A utilização de ferramentas bioinformáticas de ponta, como o Seurat e o ScType, permitiu não apenas identificar e anotar com precisão subpopulações neuronais com base em assinaturas transcricionais específicas, como também explorar a expressão de neuropeptídeos e receptores fundamentais para a fisiologia hipotalâmica. A análise focada nos neurônios MCH⁺ evidenciou a complexidade funcional dessa população, destacando vias enriquecidas associadas à atividade sináptica, sinalização neuroendócrina e regulação celular. Além disso, a identificação de diferenças moleculares entre os grupos experimentais sugere um possível dimorfismo sexual funcional, abrindo caminhos para investigações futuras com foco em diferenças biológicas entre machos e fêmeas. De forma geral, os resultados obtidos demonstram como o cruzamento entre técnicas moleculares avançadas e ferramentas de ciência de dados pode promover descobertas significativas no campo da neurociência, com implicações tanto básicas quanto translacionais. Investigando a LHA com essa abordagem integrativa, amplia-se a compreensão sobre sua diversidade celular e funcional, e consolida-se o interesse em seu potencial como alvo terapêutico para condições neurológicas e metabólicas.

6 Agradecimentos

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todos que, de alguma forma, contribuíram para minha formação pessoal, acadêmica e profissional ao longo dos últimos anos. Este Trabalho de Conclusão de Curso é fruto de muito esforço, aprendizado e, principalmente, do apoio incondicional de pessoas que caminharam comigo em diferentes momentos. Em especial, quero agradecer nominalmente a todos os orientadores que tive ao longo do meu percurso de aprendizado, que foram fundamentais em diferentes etapas da minha trajetória: Prof. Dr. Sandro Soares Almeida, Profa. Dra. Karina Leziovitz Mandelbaum, Profa. Dra. Cláudia Malheiro Coutinho, Prof. Dr. André de Souza Mecawi e Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt, Profa. Leide de Almeida Praxedes e Prof. Dr. Fábio Mitsuo Lima. Sou grato por cada instituição que abriu as portas para mim e me permitiu conhecer um pouco da diversidade e opiniões que me formaram como indivíduo. A cada um, meu sincero reconhecimento pelo conhecimento compartilhado, pela orientação cuidadosa e pelo incentivo constante. Agradeço à minha família, base de tudo, por todo o amor, compreensão e suporte, mesmo nos momentos mais difíceis. À minha mãe, Lucia Regina Novais dos Anjos, que sempre acreditou no meu potencial e me ensinou, com exemplo, o valor do comprometimento e da honestidade. Àqueles que me acompanharam nos bastidores, torcendo silenciosamente, mas com o coração cheio de esperança. Aos amigos, que foram abrigo nos dias difíceis e celebração nas conquistas. Agradeço pelos cafés, pelas conversas, pelos conselhos, pela escuta atenta e por me ajudarem a manter tudo firme. Cada demonstração de carinho, cada palavra de incentivo, foi combustível

para continuar. A todas as pessoas próximas, colegas de curso, professores, técnicos de laboratório e profissionais que cruzaram meu caminho, meu muito obrigado. Cada colaboração, ensinamento e gesto de generosidade fizeram diferença nessa jornada. Este trabalho é, acima de tudo, coletivo. Levo comigo um pouco de cada um de vocês. É o primeiro passo de uma jornada longa, e sou grato a tudo que está por vir.

7 Referências

1. Leng G. The Heart of the Brain: The Hypothalamus and Its Hormones. The Heart of the Brain [Internet]. 31 de julho de 2018 [citado 10 de abril de 2025]; Disponível em: <https://direct.mit.edu/books/monograph/4511/The-Heart-of-the-BrainThe-Hypothalamus-and-Its>
2. Lechan RM, Toni R. Functional Anatomy of the Hypothalamus and Pituitary. Oxford Textbook of Endocrinology and Diabetes 3e [Internet]. 28 de novembro de 2016 [citado 8 de abril de 2025];111–22. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279126/>
3. Arimura A. Hypothalamic Hormones. Neuroendocrinology in Physiology and Medicine [Internet]. 2000 [citado 10 de abril de 2025];41–58. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-59259-707-9_3
4. Saper CB, Lowell BB. The hypothalamus. Current Biology. 1º de dezembro de 2014;24(23):R1111–6.
5. Fink G, Pfaff D, Levine J. Handbook of Neuroendocrinology. Handbook of Neuroendocrinology. 2012;

6. Wilkinson M, Brown RE. An introduction to neuroendocrinology, second edition. An Introduction to Neuroendocrinology, Second Edition [Internet]. 1º de janeiro de 2015 [citado 10 de abril de 2025];1–479. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/books/an-introduction-to-neuroendocrinology/C988ABF8E5B25B4BCAB77B6BD94E5B3B>
7. Dudás B. Atlas of the Human Hypothalamus: Anatomy, Blood Supply, Myelo-, and Cytoarchitecture. Atlas of the Human Hypothalamus: Anatomy, Blood Supply, Myelo-, and Cytoarchitecture [Internet]. 1º de janeiro de 2021 [citado 10 de abril de 2025];1–302. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com:5070/book/9780128220511/atlas-of-the-human-hypothalamus>
8. Goel M, Mittal A, Jain VR, Bharadwaj A, Modi S, Ahuja G, et al. Integrative Functions of the Hypothalamus: Linking Cognition, Emotion and Physiology for Well-being and Adaptability. Ann Neurosci [Internet]. 2024 [citado 10 de abril de 2025]; Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/09727531241255492>
9. Seoane-Collazo P, Fernø J, Gonzalez F, Diéguez C, Leis R, Nogueiras R, et al. Hypothalamic-autonomic control of energy homeostasis. Endocrine [Internet]. 1º de novembro de 2015 [citado 10 de abril de 2025];50(2):276–91. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26089260/>
10. Islam MT, Rumpf F, Tsuno Y, Kodani S, Sakurai T, Matsui A, et al. Vasopressin neurons in the paraventricular hypothalamus promote wakefulness via lateral hypothalamic orexin neurons. Current Biology. 26 de setembro de 2022;32(18):3871-3885.e4.
11. Quintana DS, Rokicki J, van der Meer D, Alnæs D, Kaufmann T, Córdova-Palomera A, et al. Oxytocin pathway gene networks in the human brain. Nature Communications 2019 10:1 [Internet]. 8 de fevereiro de 2019 [citado 23 de janeiro de 2025];10(1):1–12. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-019-08503-8>
12. Al-Massadi O, Dieguez C, Schneeberger M, López M, Schwaninger M, Prevot V, et al. Multifaceted actions of melanin-concentrating hormone on mammalian energy homeostasis. Nature Reviews Endocrinology 2021 17:12 [Internet]. 4 de outubro de 2021 [citado 30 de março de 2025];17(12):745–55. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41574-021-00559-1>
13. Mogi K, Funabashi T, Mitsushima D, Hagiwara H, Kimura F. Sex Difference in the Response of Melanin-Concentrating Hormone Neurons in the Lateral Hypothalamic Area to Glucose, as Revealed by the Expression of Phosphorylated Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate

- Response Element-Binding Protein. *Endocrinology* [Internet]. 1º de agosto de 2005 [citado 20 de janeiro de 2025];146(8):3325–33. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1210/en.2005-0078>
14. Bittencourt JC. Anatomical organization of the melanin-concentrating hormone peptide family in the mammalian brain. *Gen Comp Endocrinol*. 1º de junho de 2011;172(2):185–97.
 15. Bonnavion P, Mickelsen LE, Fujita A, de Lecea L, Jackson AC. Hubs and spokes of the lateral hypothalamus: cell types, circuits and behaviour. *J Physiol* [Internet]. 15 de novembro de 2016 [citado 10 de abril de 2025];594(22):6443–62. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27302606/>
 16. Diniz GB, Bittencourt JC. The Melanin-Concentrating Hormone (MCH) System: A Tale of Two Peptides. *Front Neurosci* [Internet]. 26 de novembro de 2019 [citado 8 de fevereiro de 2025];13:490166. Disponível em: www.frontiersin.org
 17. Knollema S, Brown ER, Vale W, Sawchenko PE. Novel hypothalamic and preoptic sites of prepro-melanin-concentrating hormone messenger ribonucleic Acid and Peptide expression in lactating rats. *J Neuroendocrinol* [Internet]. 1992 [citado 20 de janeiro de 2025];4(6):709–17. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21554658/>
 18. Rondini TA, Donato J, Rodrigues B de C, Bittencourt JC, Elias CF. Chemical identity and connections of medial preoptic area neurons expressing melanin-concentrating hormone during lactation. *J Chem Neuroanat* [Internet]. janeiro de 2010 [citado 7 de janeiro de 2025];39(1):51–62. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19913090/>
 19. Bonnavion P, Mickelsen LE, Fujita A, de Lecea L, Jackson AC. Hubs and spokes of the lateral hypothalamus: cell types, circuits and behaviour. *J Physiol (Lond)*. 15 de novembro de 2016;594(22):6443–62.
 20. Saito Y, Nagasaki H. The melanin-concentrating hormone system and its physiological functions. *Results Probl Cell Differ* [Internet]. 2008 [citado 17 de janeiro de 2025];46:159–79. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18227983/>
 21. Concetti C, Peleg-Raibstein D, Burdakov D. Hypothalamic MCH Neurons: From Feeding to Cognitive Control. *Function* [Internet]. 2023 [citado 20 de janeiro de 2025];5(1):zqad059. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10667013/>

22. Diniz GB, Bittencourt JC. The melanin-concentrating hormone as an integrative peptide driving motivated behaviors. *Front Syst Neurosci*. 29 de maio de 2017;11:32.
23. Baysoy A, Bai Z, Satija R, Fan R. The technological landscape and applications of single-cell multi-omics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2023 24:10 [Internet]. 6 de junho de 2023 [citado 10 de abril de 2025];24(10):695–713. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41580-023-00615-w>
24. Butler A, Hoffman P, Smibert P, Papalexi E, Satija R. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nature Biotechnology* 2018 36:5 [Internet]. 2 de abril de 2018 [citado 10 de abril de 2025];36(5):411–20. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nbt.4096>
25. Cheng C, Chen W, Jin H, Chen X. A Review of Single-Cell RNA-Seq Annotation, Integration, and Cell-Cell Communication. *Cells* [Internet]. 1º de agosto de 2023 [citado 10 de abril de 2025];12(15). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37566049/>
26. Adil A, Kumar V, Jan AT, Asger M. Single-Cell Transcriptomics: Current Methods and Challenges in Data Acquisition and Analysis. *Front Neurosci* [Internet]. 22 de abril de 2021 [citado 10 de abril de 2025];15:591122. Disponível em: www.frontiersin.org
27. Xu C, Lopez R, Mehlman E, Regier J, Jordan MI, Yosef N. Probabilistic harmonization and annotation of single-cell transcriptomics data with deep generative models. *Mol Syst Biol* [Internet]. 25 de janeiro de 2021 [citado 10 de abril de 2025];17(1):9620. Disponível em: <https://www.embopress.org/doi/10.15252/msb.20209620>
28. Wolf FA, Angerer P, Theis FJ. SCANPY: Large-scale single-cell gene expression data analysis. *Genome Biol* [Internet]. 6 de fevereiro de 2018 [citado 10 de abril de 2025];19(1):1–5. Disponível em: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-017-1382-0>
29. Quan F, Liang X, Cheng M, Yang H, Liu K, He S, et al. Annotation of cell types (ACT): a convenient web server for cell type annotation. *Genome Med* [Internet]. 1º de dezembro de 2023 [citado 10 de abril de 2025];15(1):1–18. Disponível em: <https://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13073-023-01249-5>
30. Papalexi E, Mimitou EP, Butler AW, Foster S, Bracken B, Mauck WM, et al. Characterizing the molecular regulation of inhibitory immune

- checkpoints with multimodal single-cell screens. *Nature Genetics* 2021 53:3 [Internet]. 1º de março de 2021 [citado 10 de abril de 2025];53(3):322–31. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41588-021-00778-2>
31. Dimitrov D, Schäfer PSL, Farr E, Rodriguez-Mier P, Lobentanzer S, Badia-i-Mompel P, et al. LIANA+ provides an all-in-one framework for cell–cell communication inference. *Nature Cell Biology* 2024 26:9 [Internet]. 2 de setembro de 2024 [citado 10 de abril de 2025];26(9):1613–22. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41556-024-01469-w>
 32. Herb BR, Glover HJ, Bhaduri A, Colantuoni C, Bale TL, Siletti K, et al. Single-cell genomics reveals region-specific developmental trajectories underlying neuronal diversity in the human hypothalamus. *Sci Adv* [Internet]. 10 de novembro de 2023 [citado 12 de fevereiro de 2025];9(45):eadf6251. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10631741/>
 33. Moffitt JR, Bambah-Mukku D, Eichhorn SW, Vaughn E, Shekhar K, Perez JD, et al. Molecular, spatial, and functional single-cell profiling of the hypothalamic preoptic region. *Science* (1979) [Internet]. 16 de novembro de 2018 [citado 12 de fevereiro de 2025];362(6416). Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aau5324>
 34. Rossi MA, Basiri ML, McHenry JA, Kosyk O, Otis JM, Van Den Munkhof HE, et al. Obesity remodels activity and transcriptional state of a lateral hypothalamic brake on feeding. *Science* (1979) [Internet]. 28 de junho de 2019 [citado 12 de fevereiro de 2025];364(6447):1271–4. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aax1184>
 35. Yao Z, van Velthoven CTJ, Kunst M, Zhang M, McMillen D, Lee C, et al. A high-resolution transcriptomic and spatial atlas of cell types in the whole mouse brain. *Nature* 2023 624:7991 [Internet]. 13 de dezembro de 2023 [citado 12 de fevereiro de 2025];624(7991):317–32. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-023-06812-z>
 36. Mickelsen LE, Bolisetty M, Chimileski BR, Fujita A, Beltrami EJ, Costanzo JT, et al. Single-cell transcriptomic analysis of the lateral hypothalamic area reveals molecularly distinct populations of inhibitory and excitatory neurons. *Nature Neuroscience* 2019 22:4 [Internet]. 11 de março de 2019 [citado 10 de abril de 2025];22(4):642–56. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41593-019-0349-8>
 37. Rossi MA, Basiri ML, McHenry JA, Kosyk O, Otis JM, Van Den Munkhof HE, et al. Obesity remodels activity and transcriptional state of a lateral hypothalamic brake on feeding. *Science* (1979) [Internet]. 28 de junho de

- 2019 [citado 10 de abril de 2025];364(6447):1271–4. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aax1184>
38. Rossi MA, Basiri ML, Liu Y, Hashikawa Y, Hashikawa K, Fenno LE, et al. Transcriptional and functional divergence in lateral hypothalamic glutamate neurons projecting to the lateral habenula and ventral tegmental area. *Neuron* [Internet]. 1º de dezembro de 2021 [citado 10 de abril de 2025];109(23):3823–3837.e6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34624220/>
39. Ianevski A, Giri AK, Aittokallio T. Fully-automated and ultra-fast cell-type identification using specific marker combinations from single-cell transcriptomic data. *Nature Communications* 2022 13:1 [Internet]. 10 de março de 2022 [citado 10 de abril de 2025];13(1):1–10. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-022-28803-w>
40. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* [Internet]. 20 de fevereiro de 1998 [citado 10 de abril de 2025];92(4):573–85. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9491897/>
41. Bittencourt JC, Presse F, Arias C, Peto C, Vaughan J, Nahon J -L, et al. The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol* [Internet]. 1992 [citado 10 de abril de 2025];319(2):218–45. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1522246/>
42. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* [Internet]. 29 de dezembro de 1995 [citado 10 de abril de 2025];83(7):1263–71. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8548812/>
43. Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, et al. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* [Internet]. 10 de janeiro de 1997 [citado 10 de abril de 2025];88(1):131–41. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9019399/>
44. Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, Perrin MH, Lewis K, Sutton S, et al. Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature* [Internet]. 1995 [citado 10 de abril de 2025];378(6554):287–92. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7477349/>

45. Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Bouthenet ML, Schwartz JC. Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature* [Internet]. 1990 [citado 10 de abril de 2025];347(6289):146–51. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1975644/>
46. Villalón CM, Centurión D, Rabelo G, De Vries P, Saxena PR, Sánchez-López A. The 5-HT₁-like receptors mediating inhibition of sympathetic vasopressor outflow in the pithed rat: Operational correlation with the 5-HT(1A), 5-HT(1B) and 5-HT(1D) subtypes. *Br J Pharmacol*. 1998;124(5):1001–11.
47. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999 402:6762 [Internet]. 9 de dezembro de 1999 [citado 10 de abril de 2025];402(6762):656–60. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/45230>
48. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000 404:6778 [Internet]. 6 de abril de 2000 [citado 10 de abril de 2025];404(6778):661–71. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/35007534>
49. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics* 2000 25:1 [Internet]. maio de 2000 [citado 10 de abril de 2025];25(1):25–9. Disponível em: https://www.nature.com/articles/ng0500_25
50. Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters. *OMICS* [Internet]. 1º de maio de 2012 [citado 10 de abril de 2025];16(5):284. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3339379/>