

APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO EM CÉLULA INDIVIDUAL NA FISIOPATOLOGIA DO CÂNCER

APPLICATION OF SINGLE CELL SEQUENCING IN CANCER PHYSIOPATHOLOGY

Charlotte Cesty Borda

Faculdades Metropolitanas Unidas (FMU), São Paulo.
Possuo Pós-Doc do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Departamento de Parasitologia, Doutorado em Biotecnologia pela Universidade de São Paulo (2007).

E-mail: charlotte.saenz@fmu.br

Camila Vega

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Formada em Biomedicina na Faculdades Metropolitanas Unidas (FMU). Doutoranda na USP no Departamento de patologia.

E-mail: camilagev@gmail.com

RESUMO:

A análise de células individuais tem sido amplamente reconhecida como técnica chave para o entendimento das funções celulares, aprimorando as formas de diferenciação entre um tecido saudável e um doente, permitindo assim vários avanços e descobertas em diversas áreas, entre elas a neurociência, reprodução humana, microbiologia e oncologia. O avanço dessas técnicas mostra-se particularmente importante para tecidos com alto grau de variação, como tumores, podendo revelar diferenças estruturais e mutações que poderiam ser mascaradas por outras células em um sequenciamento em massa. O estudo detalhado do genoma de células individuais é capaz de mostrar funções até então desconhecidas, em células fenotipicamente idênticas em um determinado órgão, porém, vários desafios precisam ser ultrapassados. O principal desafio é extrair uma quantidade muito pequena de amostra e amplificá-la de forma a gerar quantidade suficiente de material para que seja feito um sequenciamento confiável. Lidar com baixas concentrações de DNA pode levar a degradação, perda de amostra e contaminações podendo ter um grande efeito na qualidade do sequenciamento. Devido a essas dificuldades, o objetivo deste trabalho é descrever as técnicas utilizadas para o sequenciamento de célula individual, desde a manipulação até a amplificação, mostrando a importância dessa técnica para o estudo do câncer e para o aprimoramento dos principais temas envolvidos na eficácia da terapia do câncer: detecção, progressão e predição.

Palavras Chave: sequenciamento em célula individual; câncer; célula tumoral circulante; MDA; MALBAC.

ABSTRACT:

The single cell analysis has been widely recognized as the main technique for the better understanding of cell functions, improving the ways of differentiation between healthy and unhealthy tissues, allowing several advances and discoveries in many different areas, including neuroscience, human reproduction, microbiology and oncology. These advances are particularly important for tissues with a high degree of variation, such as tumors, revealing structural differences and mutations that could be masked by other cells in a mass sequencing, for being part of only a small fraction of the studied cells. The detailed genomic study of individual cells is capable to show previously unknown functions, in phenotypically identical cells at a specific organ, however, several challenges still need to be overcome. The main challenge is to extract a very small sample and amplify it in a way to generate enough material for a reliable sequencing. Dealing with a low concentration of DNA can lead to degradation, loss of the sample and contamination, having a great effect in the quality of the sequencing. Due to these difficulties in the amplification of the DNA from a single cell, this review aims to describe the techniques used for single cell sequencing, from manipulation to amplification, showing the importance of this technique for cancer studies and for the improvement of the main themes related to the efficiency of cancer therapies: detection, progression and prediction.

Keywords: single cell sequencing; cancer; circulating tumor cell; MDA; MALBAC.

1. INTRODUÇÃO

Apesar da maior parte dos sequenciamentos de DNA e RNA serem feitos a partir de amostras de tecidos ou cultura de células, fazendo com que diferenças entre as células muitas vezes passem despercebidas, as diferenças genômicas em alguns tipos celulares são bem caracterizadas e têm sido estudadas por décadas ¹. A unidade fundamental de todos os sistemas biológicos é a célula, cada célula controla os parâmetros dos seus respectivos sistemas ². O sequenciamento de células individuais permite o melhor entendimento das funções celulares em seu meio, aprimorando as formas de diferenciação entre um tecido saudável e um tecido doente. Isso tem permitido avanços e descobertas em diversas áreas, dentre elas a neurociência, a reprodução humana, a microbiologia e a oncologia ³.

A microbiologia, por exemplo, proporciona uma vasta área para a utilização desta técnica. Aproximadamente 99% dos microrganismos, segundo a maior parte das estimativas, ainda não podem ser cultivadas, sendo observadas somente pelo uso de marcadores. Nos últimos anos, muitos desses microrganismos têm sido estudados por meio do sequenciamento de células individuais, sendo que tais estudos tendem a crescer exponencialmente junto ao aperfeiçoamento da técnica. Esses novos dados podem elucidar funções anteriormente desconhecidas de microrga-

nismos, relacionando-os com a saúde humana tanto positivamente, através da microbiota, quanto negativamente, pela descoberta de novos patógenos ¹.

Na imunologia, a técnica de análise de células individuais permitiu a descoberta de novos tipos celulares dentro do sistema imune ⁴. A análise do RNA mensageiro de células individuais permitiu, por exemplo, a descoberta de um tipo raro de célula intestinal ⁵. Na clínica, o sequenciamento de célula única pode ajudar na triagem de embriões fertilizados *in vitro* para pacientes de risco. Os corpúsculos polares são considerados dispensáveis para o desenvolvimento do embrião e, assim, podem ser removidos com segurança utilizando micropipetas para a seleção de óvulos normais fertilizados, no caso de doenças genéticas maternas. Uma única célula também pode ser retirada do blastocisto e testada para doenças genéticas paternas, permitindo a seleção de embriões não afetados ^{3; 6}.

As análises em células individuais são particularmente importantes para o estudo de tecidos com altos graus de variações, como o cérebro e tumores, podendo revelar diferenças estruturais e mutações. Neurônios, por exemplo, podem ser caracterizados em diferentes tipos celulares baseados na morfologia, padrões de condutividade e diversidades de moléculas expressas, porém, essas informações podem passar despercebidas quando estudadas em grupos de células ⁷. Nos estudos de célula tronco o sequenciamento de célula individual tem permitido a descoberta e o estudo tanto de células tronco pluripotentes quanto de células tronco tecido específicas ⁸.

Diferenças na expressão gênica de células raras podem não ser detectadas, por contribuírem apenas a uma pequena fração do tecido total. O uso do sequenciamento de transcrito (RNA-Seq) em células individuais é capaz de detectar essas diferenças e têm confirmado que neurônios morfologicamente idênticos de uma mesma região possuem diferentes padrões de expressão gênica ^{7; 9}.

O valor da técnica de sequenciamento em células individuais para o estudo do câncer vem da possibilidade de se obter uma enorme quantidade de informações a partir de uma única célula tumoral. Tumores são formados por uma complexa associação de vários tipos celulares que inclui fibroblastos não cancerosos, células endoteliais, linfócitos e macrófagos que, juntos, muitas vezes, constituem mais de 50% do DNA ou RNA extraído. Essa associação de materiais genômicos extraídos pode mascarar o sinal das células cancerígenas, dificultando assim, a comparação de dados entre células ou ainda um estudo mais detalhado sobre o câncer ¹⁰.

2. CONSIDERAÇÕES GERAIS

2.1 Sequenciamento em células individuais

Um grande e rápido progresso tem acontecido nos últimos anos em relação ao sequenciamento de células individuais, e dado que este campo está no início do seu desenvolvimento ainda há muito para ser explorado ².

A principal vantagem de se analisar uma população de células separadamente ao invés de medir a média do tecido é a possibilidade de entender a interação existente entre cada célula e sua contribuição para o todo ¹¹. O progresso dessa técnica nos mostra que em todas as populações celulares existe um nível de heterogeneidade entre células do mesmo tipo e este fato pode ser muito importante para o entendimento de vários sistemas biológicos complexos, facilitando o estudo de doenças e o desenvolvimento de tratamentos ^{11; 12}.

O principal desafio de analisar uma única célula é extrair uma quantidade muito pequena de amostra e amplificá-la de forma eficaz gerando quantidade suficiente de material para que seja feito o sequenciamento confiável. Lidar com pequenas quantidades de amostra significa que a degradação, perda e contaminações podem gerar um grande efeito na qualidade do sequenciamento ³.

O isolamento de células de um tecido pode ser realizado de várias formas, e são classificados como células específica (*biased*) ou aleatórias (*unbiased*). A princípio, uma amostra aleatória reflete melhor a composição do tecido, porém, uma amostra específica pode ser necessária para o isolamento de células raras ¹³.

Várias técnicas podem ser utilizadas para o isolamento das células, micropipetagem, microdissecção a laser, FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) e MACS (*magnetic activated cell sorting*) ^{13; 14}(Tabela 1). Em suspensões de células, o isolamento pode ser feito por meio da micropipetagem ¹³. Este é um método de baixo custo e tecnicamente simples, os únicos materiais necessários são uma pipeta e um microscópio. O procedimento inicia-se pela digestão enzimática do tecido para gerar uma suspensão de células, em seguida essa suspensão é diluída para aproximadamente 10–20 células por 1 µl de solução e examinada no microscópio para a seleção e aspiração da célula desejada ¹⁵. Esta técnica se mostra muito trabalhosa e com um rendimento pequeno ¹². Alguns pesquisadores propuseram o uso da técnica FISH (*fluorescence in situ hybridization*) para aumentar a eficiência desta técnica ¹⁶.

Tabela 1. Vantagens e desvantagens dos métodos de isolamento de células individuais (Adaptado de Shapiro, 2013¹³).

Método	Célula específica ou aleatória	Rendimento	Custo	Processo manual ou automatizado
Micromanipulação	Aleatória	Baixo	Baixo	Manual
FACS	Aleatória/ Específica	Alto	Alto	Automatizado
LCM	Aleatória	Baixo	Alto	Manual

O isolamento por microdissecção a laser (LCM) é usado para isolar células diretamente do seu tecido de origem sem o uso de qualquer produto químico¹⁵. O procedimento básico envolve cobrir o tecido alvo com um filme termoplástico e atirar o laser no filme para que este derreta e fique aderido a célula alvo, facilitando o isolamento mecânico desta célula¹⁵. Porém o uso desta técnica para o isolamento de células individuais não é capaz de eliminar todos contaminantes de células vizinhas presentes na célula alvo^{17; 18}.

O FACS pode ser utilizado tanto para seleção de células específicas quando para captura de células aleatórias, sendo este o método mais eficiente para isolamento celular¹³. Esse método é capaz de selecionar e analisar células de tecidos heterogêneos usando sinais de fluorescência e parâmetros de dispersão de luz¹⁵. Esta técnica inicia-se com células em suspensão que serão marcadas com anticorpos fluorescentes específicos para a célula alvo, dessa maneira a célula alvo pode ser identificada e isolada para análise¹⁵. Esta técnica tem muitas vantagens sobre as outras, incluindo maior velocidade de isolamento e maior rendimento, porém a capacidade de detecção de fluorescência do FACS é relativamente baixa, fazendo com que marcadores de baixa expressão não sejam detectados, podendo não captar algumas células específicas^{15; 19}.

A técnica MACS é capaz de capturar e isolar células individuais de forma rápida e efetiva. O procedimento envolve a imunorreatividade de antígenos na membrana celular e anticorpos ligados a partículas magnéticas que permitem a seleção das células por campo magnético^{20; 21}. Esta técnica mostrou-se particularmente útil para o isolamento de células tumorais circulantes (CTCs) do sangue periférico em pesquisas relacionadas ao câncer²⁰.

Com o surgimento e maior aplicação do sequenciamento em célula individual, várias técnicas de amplificação foram criadas. As principais descobertas que permitiram a criação dessas técnicas foram as polimerases Phi29 (Φ 29) isolada de *Bacillus subtilis* e a polimerase *Bst*, isolada de *Bacillus stearothermophilus*, que são capazes de amplificar o genoma humano acima de mil vezes por meio do uso das

técnicas MDA (*multiple displacement amplification*) e MALBAC (*multiple annealing looping-based amplification cycle*)²². O número de técnicas e de kits para amplificação específica de célula individual vem aumentando, porém, existem vários parâmetros a serem considerados em sua escolha, como a uniformidade da amplificação, cobertura, taxa de erro, número de amplificações necessárias, tipos de reagentes utilizados, entre outros. Várias comparações ainda são necessárias para a identificação das melhores combinações entre amostras e reagentes a serem utilizados¹.

Após a amplificação é necessário realizar a leitura das sequências amplificadas, para isso é utilizada a técnica NGS (*Next Generation Sequencing*), que vem sendo aperfeiçoada cada vez mais para permitir o sequenciamento de células únicas². Em geral, uma vez que o DNA ou RNA da célula individual foi amplificado, a plataforma de NGS mais usada é a Illumina, porém algumas plataformas como a Pacific Biosciences atualmente permitem leituras mais longas, o que pode gerar informações complementares².

3. MDA E MALBAC

A MDA é uma técnica isotérmica linear, baseada no uso de polimerases de alta capacidade (Φ 29 e *Bst*) em conjunto com primers aleatórios modificados, criando estruturas ramificadas para a amplificação total do genoma com alta fidelidade, porém não muito uniformes, o que pode permitir resultados falso positivos¹². Foi desenvolvida para a amplificação total do genoma a partir de quantidades muito pequenas de amostras^{22; 23} (Figura 1).

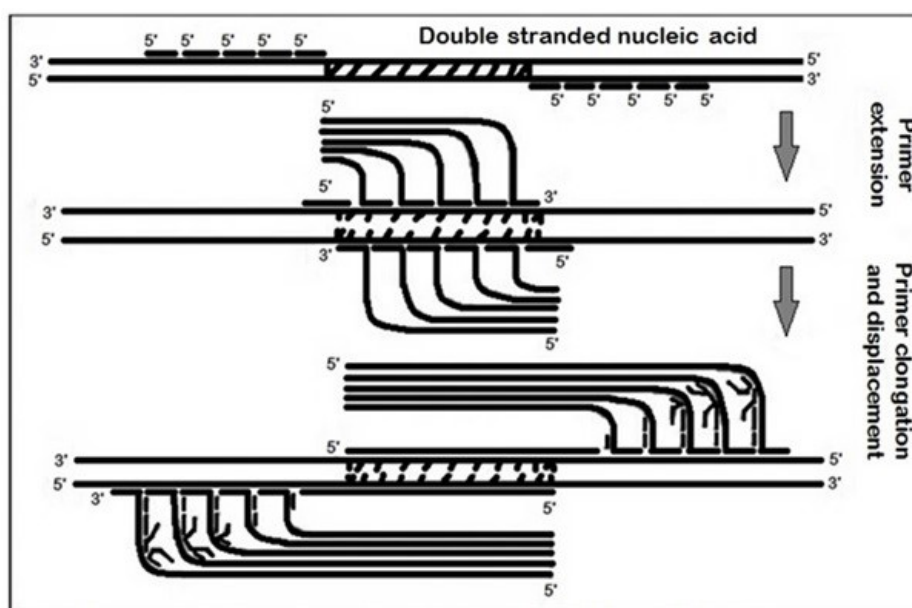


Figura 1. Representação do mecanismo de amplificação por MDA (Fakruddin et al., 2013²³)

Ao contrário da técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*), a amplificação por MDA não necessita de ciclos de repetição. É realizada uma desnaturação inicial da amostra, seguida pela amplificação, que pode durar de 6 a 18 horas a 30 °C, e finalizada pela inativação da DNA polimerase a 65 °C por 10 minutos. O rendimento e a sensibilidade são altos. A partir de 1-10 cópias do genoma humano podem ser obtidos 20-30 µg de DNA ²³.

MALBAC é uma técnica semi-linear que combina recursos do MDA e da PCR. Esta técnica de amplificação oferece alta uniformidade. Um sequenciamento feito com amostras amplificadas por MALBAC alcançam 93% de cobertura genômica ^{12; 22; 24}.

A amplificação se inicia com um *pool* de primers aleatórios, cada um tendo em comum uma sequência de 27 nucleotídeos e 8 nucleotídeos variáveis, que podem se hibridizar uniformemente à amostra inicial a 0 °C. A 65 °C a DNA polimerase gera *semiamplicons* de tamanhos variados (0.5 – 1.5 kb) que são então separados da amostra inicial a 94 °C. São realizados 5 ciclos de preamplificação a 58 °C, permitindo a formação de *amplicons* completos e o *looping* desses amplicons, evitando amplificações adicionais e hibridização cruzada. Por fim é realizada uma amplificação exponencial por PCR gerando a quantidade necessária de DNA para o sequenciamento ²⁴.

4. APLICAÇÕES NA FISILOGIA DO CÂNCER

O câncer é uma doença causada por mutações no DNA, juntamente com falhas nos processos de reparo celular, levando a uma expansão clonal descontrolada ²⁵ que está entre as doenças mais letais e debilitantes do mundo, apesar do grande número de pesquisas realizadas para desvendar os mecanismos moleculares da doença e seus processos patológicos ¹⁵.

Tumores são muitas vezes misturas de vários tipos celulares. Essa heterogeneidade altera o resultado das análises. Quando várias células estão presentes, a análise reflete a média da população de células ou o conjunto de células dominantes, que podem não ser os mais malignos presentes no tumor ^{7; 10}. Em geral, somente mutações que são encontradas em várias células são consideradas reais, como resultado algumas mutações mais raras podem passar despercebidas. Com o uso do sequenciamento de célula individual, é possível estudá-las separadamente permitindo avaliar quais células são as mais malignas, quais tem maior potencial para metástase e até quais podem desenvolver resistência aos tratamentos quimioterápicos, além de facilitar a descoberta de biomarcadores para serem usados no diagnóstico e prognóstico do câncer e de alvos para terapias moleculares ^{15; 26; 27; 28; 29}. Essa técnica já permitiu, por exemplo, a identificação de

uma subpopulação distinta de células tumorais em adenocarcinoma pulmonar ³⁰ e também a identificação de candidatos a biomarcadores para células circulantes de melanoma ³¹.

Avanços técnicos em pesquisas recentes tornaram possível o estudo do câncer em nível celular. Esses métodos são considerados importantes ferramentas para avaliar a evolução da doença, permitindo assim grande evolução tanto na pesquisa quanto na prática clínica ²⁵. Com o sequenciamento de célula individual é possível traçar o perfil de células cancerígenas escassas, monitorar células tumorais circulantes e detectar células que possam ser resistentes a quimioterapia. Essas aplicações poderão aprimorar os três principais temas envolvidos na eficácia da terapia do câncer: detecção, progressão e predição ¹⁰.

5. CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES

Apesar de décadas de estudos para entender o papel das células tumorais circulantes (CTCs), muito ainda permanece desconhecido. As CTCs infiltram-se no sistema circulatório, provindas de tumores primários e, ao contrário de outras células presentes na circulação, as CTCs normalmente apresentam marcadores de superfície epitelial, como o EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*) que as diferencia de outras células sanguíneas. Nos pacientes com câncer a média de CTCs encontradas é de uma em 7,5mL de sangue. As CTCs foram quantificadas pela primeira vez por RT-PCR (*real-time PCR*), utilizando marcadores específicos para genes tumorais, porém, os resultados foram insuficientes em termos de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, devido, principalmente, a possibilidade de contaminações. Além disso, este método não fornece evidências diretas sobre a presença de CTCs no sangue ³².

Uma importante aplicação para o sequenciamento de célula individual é traçar o perfil genômico ou as sequências de mutações presentes em CTCs e em células tumorais disseminadas (DTCs- células que se disseminam dentro de tecidos, como os ossos), permitindo assim o diagnóstico e o monitoramento de pacientes com câncer. A partir dessas células, importantes informações sobre a atividade do câncer podem ser obtidas sem a necessidade de uma biópsia ¹⁰. Estudos recentes mostraram que diversos pacientes apresentando tumores primários não metastáticos apresentavam evidências de CTCs ^{10; 33}.

Vários métodos foram criados para a contagem e o isolamento das CTCs no sangue. Esses métodos normalmente dependem do uso de anticorpos anti EpCAM para que seja possível a separação dessas poucas células em meio as células sanguíneas,

porém, a EpCAM não é 100% específica, e os métodos utilizados atualmente para a distinção de células tumorais e contaminantes não são seguros ¹⁰.

6. A BIOINFORMÁTICA NA ANÁLISE DOS DADOS

O estudo de células individuais está crescendo rapidamente e nos últimos anos várias técnicas surgiram, porém ainda são poucas as ferramentas de bioinformática disponíveis para estas análises. O sequenciamento de DNA/RNA de células individuais normalmente possui baixa cobertura genômica e grandes chances de erro, pois as regiões do genoma não amplificadas não serão sequenciadas e as ferramentas desenvolvidas para o sequenciamento em massa não funcionam bem para células individuais ²².

Apesar do sequenciamento de célula individual fornecer uma grande quantidade de informações em relação a heterogeneidade e evolução de tumores, ainda existem vários problemas técnicos a serem resolvidos. A precisão e a sensibilidade da detecção das variações celulares podem afetar significativamente a análise da população de células ²².

O contínuo avanço e aplicação dessa técnica requer o desenvolvimento de novos algoritmos e *softwares* capazes de lidar com as características das técnicas desenvolvidas. São necessárias ferramentas para avaliar o desempenho de diferentes tecnologias de sequenciamento de célula individual e normas técnicas para a avaliação da cobertura genômica, para que os resultados de diferentes tecnologias possam ser comparados. Também são necessárias ferramentas para lidar com a grande quantidade de dados que serão gerados em projetos de sequenciamento de células individual, que provavelmente será maior do que em projetos de sequenciamento padrão ²².

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sequenciamento de células individuais mostra-se uma ferramenta de grande importância em diversas áreas da biologia e da medicina, permitindo, por exemplo, o estudo genético pré-implantacional em clínicas de fertilização *in vitro*, o estudo de microrganismos de difícil cultivo e, principalmente, o estudo mais aprofundado de células raras. Várias diferenças funcionais em células anteriormente tidas como idênticas já foram descobertas por meio dessa técnica, utilizando MDA e MALBAC como forma de amplificação, porém, ela ainda é pouco conhecida e pouco utilizada. Dentro da oncologia, o uso do sequenciamento de célula individual permite que sejam encontradas e estudadas células específicas dentro de massas tumo-

rais heterogêneas, e também, células tumorais circulantes, que ainda são pouco conhecidas devido à pequena quantidade presente no sangue. O estudo de forma individual destas células torna possível uma pesquisa mais aprofundada da doença e com isso, a detecção e o tratamento do câncer podem ser aprimorados. É preciso desenvolver novas ferramentas e aprimorar as já existentes, tanto para a manipulação das células, amplificação e sequenciamento do genoma, quanto para a análise dos dados obtidos. Também são necessários mais testes para que sejam definidas as melhores combinações entre amostras e reagentes a serem utilizados, buscando aumentar a confiabilidade da técnica de sequenciamento de células individuais.

REFERÊNCIAS

1. Blainey PC, Quake SR. Dissecting genomic diversity, one cell at a time. *Nat Methods*. 2014;11(1):19-21.
2. Baslan T, Hicks J. Single cell sequencing approaches for complex biological systems. *Curr Opin Genet Dev*. 2014;26:59-65.
3. Chi KR. Singled out for sequencing. *Nat Methods*. 2014;11(1):13-7.
4. Vieira Braga FA, Teichmann SA, Chen X. Genetics and immunity in the era of single-cell genomics. *Hum Mol Genet*. 2016;25(R2):R141-R8.
5. Grün D, Lyubimova A, Kester L, Wiebrands K, Basak O, Sasaki N, et al. Single-cell messenger RNA sequencing reveals rare intestinal cell types. *Nature*. 2015;525(7568):251-5.
6. Hou Y, Fan W, Yan L, Li R, Lian Y, Huang J, et al. Genome analyses of single human oocytes. *Cell*. 2013;155(7):1492-506.
7. Navin N, Kendall J, Troge J, Andrews P, Rodgers L, McIndoo J, et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature*. 2011;472.
8. Wen L, Tang F. Single-cell sequencing in stem cell biology. *Genome Biol*. 2016;17:71.
9. Qiu S, Luo S, Evgrafov O, Li R, Schroth GP, Levitt P, et al. Single-neuron RNA-Seq: technical feasibility and reproducibility. *Front Genet*. 2012;3:124.
10. Navin N, Hicks J. Future medical applications of single-cell sequencing in cancer. *Genome Med*. 2011;3(5):31.

- 11.** Fitzgerald V, Leonard P. Single cell screening approaches for antibody discovery. *Methods*. 2016.
- 12.** Grun D, van Oudenaarden A. Design and Analysis of Single-Cell Sequencing Experiments. *Cell*. 2015;163(4):799-810.
- 13.** Shapiro E, Biezuner T, Linnarsson S. Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science. *Nat Rev Genet*. 2013;14(9):618-30.
- 14.** Liang J, Cai W, Sun Z. Single-cell sequencing technologies: current and future. *J Genet Genomics*. 2014;41(10):513-28.
- 15.** Sun HJ, Chen J, Ni B, Yang X, Wu YZ. Recent advances and current issues in single-cell sequencing of tumors. *Cancer Lett*. 2015;365(1):1-10.
- 16.** Ishoey T, Woyke T, Stepanauskas R, Novotny M, Lasken RS. Genomic sequencing of single microbial cells from environmental samples. *Curr Opin Microbiol*. 2008;11(3):198-204.
- 17.** Cheng L, Zhang S, MacLennan GT, Williamson SR, Davidson DD, Wang M, et al. Laser-assisted microdissection in translational research: theory, technical considerations, and future applications. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2013;21(1):31-47.
- 18.** Vandewoestyne M, Goossens K, Burvenich C, Van Soom A, Peelman L, Deforce D. Laser capture microdissection: should an ultraviolet or infrared laser be used? *Anal Biochem*. 2013;439(2):88-98.
- 19.** Kalisky T, Blainey P, Quake SR. Genomic analysis at the single-cell level. *Annu Rev Genet*. 2011;45:431-45.
- 20.** Autebert J, Coudert B, Bidard FC, Pierga JY, Descroix S, Malaquin L, et al. Microfluidic: an innovative tool for efficient cell sorting. *Methods*. 2012;57(3):297-307.
- 21.** Chen J, Li J, Sun Y. Microfluidic approaches for cancer cell detection, characterization, and separation. *Lab Chip*. 2012;12(10):1753-67.
- 22.** Ning L, Liu G, Li G, Hou Y, Tong Y, He J. Current Challenges in the Bioinformatics of Single Cell Genomics. *Front Oncol*. 2014;4:7.
- 23.** Fakruddin M, Mannan KS, Chowdhury A, Mazumdar RM, Hossain MN, Islam S, et al. Nucleic acid amplification: Alternative methods of polymerase chain reaction. *J Pharm Bioallied Sci*. 2013;5(4):245-52.

- 24.** Zong C, Lu S, Chapman AR, Xie XS. Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell. *Science*. 2012;338(6114):1622-6.
- 25.** Van Loo P, Voet T. Single cell analysis of cancer genomes. *Curr Opin Genet Dev*. 2014;24C:82-91.
- 26.** Hiley C, de Bruin EC, McGranahan N, Swanton C. Deciphering intratumor heterogeneity and temporal acquisition of driver events to refine precision medicine. *Genome Biology*. 2014;15(8 %@ 1474-760X):453.
- 27.** Qian M, Wang DC, Chen H, Cheng Y. Detection of single cell heterogeneity in cancer. *Semin Cell Dev Biol*. 2016.
- 28.** Mäbert K, Cojoc M, Peitzsch C, Kurth I, Souchelnytskyi S, Dubrovskaya A. Cancer biomarker discovery: current status and future perspectives. *Int J Radiat Biol*. 2014;90(8):659-77.
- 29.** Normanno N, Rachiglio AM, Roma C, Fenizia F, Esposito C, Pasquale R, et al. Molecular diagnostics and personalized medicine in oncology: challenges and opportunities. *J Cell Biochem*. 2013;114(3):514-24.
- 30.** Min JW, Kim WJ, Han JA, Jung YJ, Kim KT, Park WY, et al. Identification of Distinct Tumor Subpopulations in Lung Adenocarcinoma via Single-Cell RNA-seq. *PLoS One*. 2015;10(8):e0135817.
- 31.** Ramsköld D, Luo S, Wang YC, Li R, Deng Q, Faridani OR, et al. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. *Nat Biotechnol*. 2012;30(8):777-82.
- 32.** Yusa A, Toneri M, Masuda T, Ito S, Yamamoto S, Okochi M, et al. Development of a New Rapid Isolation Device for Circulating Tumor Cells (CTCs) Using 3D Palladium Filter and Its Application for Genetic Analysis. *PLoS One*. 2014;9(2):e88821.
- 33.** Bidard FC, Mathiot C, Delaloge S, Brain E, Giachetti S, de Cremoux P, et al. Single circulating tumor cell detection and overall survival in nonmetastatic breast cancer. *Ann Oncol*. 2010;21(4):729-33.

Recebido em: 09/12/2016

Aceito em: 08/02/2017