

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 981 265**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6841 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.06.2021 PCT/US2021/036415**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.12.2021 WO21252499**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2021 E 21743315 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2024 EP 4162074**

54 Título: **Métodos para determinar un margen quirúrgico y métodos de uso del mismo**

30 Prioridad:

08.06.2020 US 202063036195 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

08.10.2024

73 Titular/es:

**10X GENOMICS, INC. (100.0%)
6230 Stoneridge Mall Road
Pleasanton, CA 94588-3260, US**

72 Inventor/es:

DADHWAL, SMRITEE

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 981 265 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para determinar un margen quirúrgico y métodos de uso del mismo

Esta solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud de patente provisional de Estados Unidos núm 63/036,195, presentada el 8 de junio de 2020.

5 Antecedentes

Las células dentro de un tejido de un sujeto tienen diferencias en la morfología y/o función celular debido a niveles variados de analitos (por ejemplo, expresión de genes y/o proteínas) dentro de las diferentes células. La posición específica de una célula dentro de un tejido (por ejemplo, la posición de la célula con respecto a las células vecinas o la posición de la célula con relación al microambiente del tejido) puede afectar, por ejemplo, la morfología, diferenciación, destino, viabilidad, proliferación, comportamiento y señalización de la célula y la comunicación cruzada con otras células en el tejido.

10

La heterogeneidad espacial se ha estudiado previamente mediante el uso de técnicas que sólo proporcionan datos para un pequeño puñado de analitos en el contexto de un tejido intacto o una porción de un tejido, o proporcionan una gran cantidad de datos de analitos para células individuales, pero no proporcionan información sobre la posición de la célula individual en una muestra biológica original (por ejemplo, muestra de tejido).

15

El documento WO2016/13496 describe métodos para determinar dianas en una muestra mediante el uso de códigos de barras estocásticos que comprenden una etiqueta espacial y una etiqueta molecular. Yoosuf y otros (2020, Breast Cancer Research 22:6) describe la identificación de firmas de expresión mediante transcriptómica espacial para distinguir el carcinoma ductal in situ (DCIS) no maligno y el carcinoma ductal invasivo (IDC) para el diagnóstico del cáncer.

20

Resumen

La presente invención proporciona un método para determinar un margen quirúrgico de un tejido a resecar en un sujeto, el método comprende:

25 (a) poner en contacto una sección de tejido obtenida del sujeto con un sustrato que comprende una pluralidad de sondas de captura fijadas al sustrato, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende (i) un dominio de captura que se hibrida con un analito de la sección de tejido y (ii) un código de barras espacial;

(b) permeabilizar la sección de tejido e hibridar el analito con el dominio de captura;

30 (c) determinar (i) toda o una parte de una secuencia correspondiente al analito hibridado con el dominio de captura o un complemento del mismo, y (ii) la secuencia de código de barras espacial o un complemento de la misma, y usar las secuencias determinadas de (i) y (ii) para identificar el analito en una ubicación en la sección de tejido; y

(d) comparar el analito en la ubicación en la sección de tejido con el analito en una o más ubicaciones diferentes en la sección de tejido, y determinar el margen quirúrgico del tejido a resecar del sujeto basándose en la comparación.

35 La presente invención proporciona además un método para determinar un margen quirúrgico de un tejido a resecar en un sujeto, el método comprende:

(a) poner en contacto una sección de tejido obtenida del sujeto con una pluralidad de agentes de captura del analito, en donde un agente de captura del analito de la pluralidad de agentes de captura del analito comprende:

un resto de unión al analito que se une específicamente a un analito,

un código de barras del resto de unión al analito, y

40 una secuencia de captura del analito;

(b) disponer la sección de tejido obtenida del sujeto en un sustrato que comprende una pluralidad de sondas de captura fijadas al sustrato, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende (i) un dominio de captura que se hibrida con la secuencia de captura del analito y (ii) un código de barras espacial;

(c) permeabilizar la sección de tejido e hibridar la secuencia de captura del analito con el dominio de captura;

45 (d) determinar (i) toda o una parte de una secuencia correspondiente al

analito hibridado con el dominio de captura o un complemento del mismo, y (ii) la secuencia de código de barras espacial o un complemento de la misma, y mediante el uso de las secuencias determinadas de (i) y (ii) para identificar el analito en una ubicación en la sección de tejido; y

(e) comparar el analito en la ubicación en la sección de tejido con el analito en una o más ubicaciones diferentes en la sección de tejido, y determinar el margen quirúrgico del tejido a resecar del sujeto basándose en la comparación.

En la presente descripción se proporciona un método para identificar un margen quirúrgico de un tejido a resecar en un sujeto, el método comprende: (a) poner en contacto una muestra de tejido obtenida del sujeto con una matriz que comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende (i) un dominio de captura que se une específicamente a un analito de la muestra de tejido y (ii) un código de barras espacial; (b) determinar (i) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al analito específicamente unido al dominio de captura o un complemento del mismo, y (ii) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial o un complemento de la misma, y usar las secuencias de ácido nucleico determinadas de (i) y (ii) para identificar la presencia del analito en una ubicación en la muestra de tejido; (c) comparar la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del analito en ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido, y determinar el margen quirúrgico del tejido a resecar del sujeto basándose en la comparación.

También se proporcionan en la presente descripción métodos para determinar el tamaño y el sitio de un tejido a resecar de un sujeto, el método comprende: (a) poner en contacto una muestra de tejido obtenida del sujeto con una matriz que comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende (i) un dominio de captura que se une específicamente a un analito de la muestra de tejido y (ii) un código de barras espacial; (b) determinar (i) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al analito específicamente unido al dominio de captura o un complemento del mismo, y (ii) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial o un complemento de la misma, y usar las secuencias de ácido nucleico determinadas de (i) y (ii) para identificar la presencia del analito en una ubicación en la muestra de tejido; (c) comparar la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del analito en una ubicación diferente de la muestra de tejido, y determinar el tamaño y el sitio del tejido a resecar del sujeto basándose en la comparación.

También se proporcionan en la presente descripción métodos para reducir el riesgo de nueva extirpación de un tejido, el método comprende: (a) poner en contacto una muestra de tejido con una matriz que comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende una (i) dominio de captura que se une específicamente a un analito de la muestra de tejido y (ii) un código de barras espacial; (b) determinar (i) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al analito específicamente unido al dominio de captura o un complemento del mismo, y (ii) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial o un complemento de la misma, y usar las secuencias de ácido nucleico determinadas de (i) y (ii) para identificar la presencia del analito en una ubicación en la muestra de tejido; (c) comparar la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del analito en ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido, y determinar el margen quirúrgico basándose en la comparación.

También se proporcionan en la presente descripción métodos para reducir la tasa de recurrencia de una anomalía tisular en un sujeto, el método comprende: usar un tejido resecaado del sujeto mediante el uso de un margen quirúrgico previamente determinado mediante el uso de un método que comprende las etapas de: (a) poner en contacto un tejido muestra obtenido del sujeto a una matriz que comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende un (i) dominio de captura que se une específicamente a un analito de la muestra de tejido y (ii) un código de barras espacial; (b) determinar (i) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al analito específicamente unido al dominio de captura o un complemento del mismo, y (ii) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial o un complemento de la misma, y usar las secuencias de ácido nucleico determinadas de (i) y (ii) para identificar la presencia del analito en una ubicación en la muestra de tejido; (c) comparar la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del analito en ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido, y determinar el margen quirúrgico basándose en la comparación.

En algunas modalidades, la matriz comprende un portaobjetos. En algunas modalidades, la matriz es una matriz de perlas.

En algunas modalidades, la etapa (b) comprende secuenciar (i) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al analito específicamente unido al dominio de captura o un complemento del mismo, y (ii) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial o un complemento del mismo. En algunas modalidades, la secuenciación es una secuenciación de alto rendimiento. En algunas modalidades, la etapa (b) comprende extender un extremo 3' de la sonda de captura mediante el uso del analito específicamente unido como una plantilla para generar una sonda de captura extendida. En algunas modalidades, la etapa (b) comprende además generar un ácido nucleico de hebra única que comprende una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a toda o una parte de la sonda de captura extendida.

También se proporcionan en la presente descripción métodos para identificar un margen quirúrgico de un tejido a resecar, el método comprende: (a) poner en contacto una muestra de tejido con una pluralidad de agentes de captura del analito, en donde un agente de captura del analito de la pluralidad de agentes de captura del analito comprende un código de barras del resto de unión al analito, una secuencia de captura del analito y un resto de unión al analito

que se une específicamente a un analito; (b) disponer la muestra de tejido en una matriz, en donde la matriz comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende un código de barras espacial y un dominio de captura que se une específicamente a la secuencia de captura del analito; (c) determinar (i) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras del resto de unión al analito o un complemento de la misma, y (ii) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial o un complemento de la misma y usar las secuencias de ácido nucleico determinadas de (i) y (ii) para identificar la presencia del analito en una ubicación en la muestra de tejido; (d) comparar la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del analito en ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido, y determinar el margen quirúrgico del tejido a resecar basándose en la comparación.

También se proporcionan en la presente descripción métodos para determinar el tamaño y el sitio de un tejido a resecar de un sujeto, el método comprende: (a) poner en contacto una muestra de tejido obtenida del sujeto con una pluralidad de agentes de captura del analito, en donde un agente de captura del analito de la pluralidad de agentes de captura del analito comprende un código de barras de resto de unión al analito, una secuencia de captura del analito y un resto de unión al analito que se une específicamente a un analito; (b) disponer la muestra de tejido en una matriz, en donde la matriz comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende un código de barras espacial y un dominio de captura que se une específicamente a la secuencia de captura del analito; (c) determinar (i) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras del resto de unión al analito o un complemento de la misma, y (ii) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial o un complemento de la misma y usar las secuencias de ácido nucleico determinadas de (i) y (ii) para identificar la presencia del analito en una ubicación en la muestra de tejido; (d) comparar la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del analito en ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido, y determinar el tamaño y el sitio del tejido a resecar del sujeto basándose en la comparación.

También se proporcionan en la presente descripción métodos para reducir la tasa de recurrencia de una anomalía tisular en un sujeto, el método comprende: usar un tejido resecaado del sujeto mediante el uso de un margen quirúrgico previamente determinado mediante el uso de un método que comprende las etapas de: (a) poner en contacto una muestra de tejido obtenida del sujeto con una pluralidad de agentes de captura del analito, en donde un agente de captura del analito de la pluralidad de agentes de captura del analito comprende un código de barras de resto de unión al analito, una secuencia de captura del analito y un resto de unión al analito que se une específicamente a un analito; (b) disponer la muestra de tejido en una matriz, en donde la matriz comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende un código de barras espacial y un dominio de captura que se une específicamente a la secuencia de captura del analito; (c) determinar (i) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras del resto de unión al analito o un complemento de la misma, y (ii) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial o un complemento de la misma y usar las secuencias de ácido nucleico determinadas de (i) y (ii) para identificar la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido; (d) comparar la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del analito en ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido, y determinar el margen quirúrgico basándose en la comparación.

En algunas modalidades, la etapa (c) comprende secuenciar (i) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras del resto de unión al analito o un complemento del mismo, y (ii) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial o un complemento del mismo. En algunas modalidades, la secuenciación es una secuenciación de alto rendimiento. En algunas modalidades, la etapa (c) comprende extender un extremo 3' de la sonda de captura mediante el uso del agente de captura del analito específicamente unido como una plantilla para generar una sonda de captura extendida. En algunas modalidades, la etapa (c) comprende además generar un ácido nucleico de hebra única que comprende una secuencia que es complementaria a toda o una parte de la sonda de captura extendida.

En algunas modalidades, la matriz comprende un portaobjetos. En algunas modalidades, la matriz comprende un portaobjetos que tiene la pluralidad de sondas de captura. En algunas modalidades, la matriz es una matriz de perlas.

En algunas modalidades, el tejido a resecar es un tumor. En algunas modalidades, el tejido a resecar es tejido infectado, tejido necrótico o tejido enfermo. En algunas modalidades, el tejido resecaado es un tumor. En algunas modalidades, el tejido resecaado es tejido infectado, tejido necrótico o tejido enfermo.

En algunas modalidades, el analito es ARN. En algunas modalidades, el ARN es ARNm. En algunas modalidades, el analito es ADN. En algunas modalidades, el ADN es ADN genómico.

En algunas modalidades, se sospecha que el sujeto tiene o se le diagnostica cáncer. En algunas modalidades, el cáncer es cáncer de mama. En algunas modalidades, se sospecha que el sujeto tiene o se le diagnostica carcinoma ductal in situ. En algunas modalidades, el analito es una proteína. En algunas modalidades, la proteína es una proteína intracelular. En algunas modalidades, la proteína es una proteína extracelular. En algunas modalidades, el resto de unión al analito es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión al antígeno.

En la presente descripción se describen diversas modalidades de las características de esta descripción.

Descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos ilustran ciertas modalidades de las características y ventajas de esta descripción. Los símbolos de referencia similares en los dibujos indican elementos similares.

5 La Figura 1 es un diagrama esquemático que muestra un ejemplo de una sonda de captura con código de barras, como se describe en la presente descripción.

La Figura 2 es un esquema que ilustra una sonda de captura escindible, en donde la sonda de captura escindida puede entrar en una célula no permeabilizada y unirse a analitos diana dentro de la muestra.

La Figura 3 es un diagrama esquemático de una característica con código de barras espacial multiplexada ilustrativa.

10 La Figura 4 es un esquema que muestra un método ilustrativo para determinar un margen quirúrgico (por ejemplo, un margen tumoral) de un tejido a resear de un sujeto.

Descripción detallada

15 Esta solicitud se basa en el descubrimiento de un método para analizar perfiles de expresión espacial de analitos en secciones de tejido y sus aplicaciones para determinar márgenes quirúrgicos y métodos de tratamiento de pacientes que lo necesitan.

20 Las metodologías y composiciones de análisis espacial descritas en la presente descripción pueden proporcionar una gran cantidad de analito y/o datos de expresión para una variedad de analitos dentro de una muestra biológica con alta resolución espacial, lo que mantiene al mismo tiempo el contexto espacial nativo. Los métodos y composiciones de análisis espacial pueden incluir, por ejemplo, el uso de una sonda de captura que incluye un código de barras espacial (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que proporciona información sobre la ubicación o posición de un analito dentro de una célula o una muestra de tejido (por ejemplo, una célula de mamífero o una muestra de tejido de mamífero) y un dominio de captura que es capaz de unirse a un analito (por ejemplo, una proteína y/o un ácido nucleico) producido por y/o presente en una célula. Los métodos y composiciones de análisis espacial también pueden incluir el uso de una sonda de captura que tiene un dominio de captura que captura un agente intermedio para la detección indirecta de un analito. Por ejemplo, el agente intermedio puede incluir una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, un código de barras) asociada con el agente intermedio. Por lo tanto, la detección del agente intermedio es indicativa del analito en la muestra de células o tejido.

30 Los aspectos no limitantes de las metodologías y composiciones de análisis espacial se describen en las patentes de Estados Unidos núms 10,774,374, 10,724,078, 10,480,022, 10,059,990, 10,041,949, 10,002,316, 9,879,313, 9,783,841, 9,727,810, 9,593,365, 8,951,726, 8,604,182, 7,709,198, publicaciones de solicitudes de patente de Estados Unidos núms 2020/239946, 2020/080136, 2020/0277663, 2020/024641, 2019/330617, 2019/264268, 2020/256867, 2020/224244, 2019/194709, 2019/161796, 2019/085383, 2019/055594, 2018/216161, 2018/051322, 2018/0245142, 2017/241911, 2017/089811, 2017/067096, 2017/029875, 2017/0016053, 2016/108458, 2015/000854, 2013/171621, WO 2018/091676, WO 2020/176788, Rodriques y otros, Science 363(6434):1463-1467, 2019; Lee y otros, Nat. Protoc. 35 10(3):442-458, 2015; Trejo y otros, PLoS ONE 14(2):e0212031, 2019; Chen y otros, Science 348(6233):aaa6090, 2015; Gao y otros, BMC Biol. 15:50, 2017; y Gupta y otros, Nature Biotechnol. 36:1197-1202, 2018; la Guía del usuario de los kits de reactivos de expresión genética espacial de Visium (por ejemplo, Rev C, con fecha de junio de 2020) y/o la Guía del usuario de los kits de reactivos de optimización de tejidos espaciales de Visium (por ejemplo, Rev C, con fecha de julio de 2020), ambas disponibles en el sitio web de documentación de soporte de 10x Genomics y puede usarse en la presente descripción en cualquier combinación. En la presente descripción se describen aspectos adicionales no limitantes de las metodologías y composiciones de análisis espacial.

40 Alguna terminología general que puede usarse en esta descripción puede encontrarse en la Sección (I)(b) del documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2020/0277663. Típicamente, un "código de barras" es una etiqueta o identificador que transmite o es capaz de transmitir información (por ejemplo, información sobre un analito en una muestra, una perla y/o una sonda de captura). Un código de barras puede ser parte de un analito o independiente de un analito. Puede unirse un código de barras a un analito. Un código de barras particular puede ser único con relación a otros códigos de barras. A los efectos de esta descripción, un "analito" puede incluir cualquier sustancia, estructura, resto o componente biológico a analizar. El término "diana" puede referirse de manera similar a un analito de interés.

50 Los analitos pueden clasificarse en términos generales en uno de dos grupos: analitos de ácidos nucleicos y analitos no ácidos nucleicos. Los ejemplos de analitos no ácidos nucleicos incluyen, pero sin limitarse a, lípidos, carbohidratos, péptidos, proteínas, glicoproteínas (unidas a N o unidas a O), lipoproteínas, fosfoproteínas, variantes específicas de proteínas fosforiladas o acetiladas, variantes de amidación de proteínas, variantes de hidroxilación de proteínas, variantes de metilación de proteínas, variantes de ubiquitinación de proteínas, variantes de sulfatación de proteínas, proteínas virales (por ejemplo, cápside viral, envoltura viral, cubierta viral, accesorio viral, glicoproteínas virales, pico viral, etc.), proteínas extracelulares e intracelulares, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno. En algunas

modalidades, el(los) analito(s) puede(n) localizarse en ubicación(ones) subcelular(es), incluida(s), por ejemplo, orgánulos, por ejemplo, mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico, cloroplastos, vesículas endocíticas, vesículas exocíticas, vacuolas, lisosomas, etc. En algunas modalidades, el(los) analito(s) puede(n) ser péptidos o proteínas, incluidos sin limitación, anticuerpos y enzimas. Pueden encontrarse ejemplos adicionales de analitos en la Sección (I)(c) del documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm 2020/0277663. En algunas modalidades, un analito puede detectarse indirectamente, tal como mediante la detección de un agente intermedio, por ejemplo, un producto de ligazón o un agente de captura del analito (por ejemplo, un anticuerpo conjugado con oligonucleótido), tales como los descritos en la presente descripción.

Una "muestra biológica" se obtiene típicamente del sujeto para su análisis mediante el uso de cualquiera de una variedad de técnicas que incluyen, pero sin limitarse a, biopsia, cirugía y microscopía de captura láser (LCM), y generalmente incluye células y/u otro material biológico del sujeto. En algunas modalidades, una muestra biológica puede ser una sección de tejido. En algunas modalidades, una muestra biológica puede ser una muestra biológica fijada y/o teñida (por ejemplo, una sección de tejido fijada y/o teñida). Los ejemplos no limitantes de tinciones incluyen tinciones histológicas (por ejemplo, hematoxilina y/o eosina) y tinciones inmunológicas (por ejemplo, tinciones fluorescentes). En algunas modalidades, pueden obtenerse imágenes de una muestra biológica (por ejemplo, una muestra biológica fijada y/o teñida). Las muestras biológicas también se describen en la Sección (I)(d) del documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm 2020/0277663.

En algunas modalidades, una muestra biológica se permeabiliza con uno o más reactivos de permeabilización. Por ejemplo, la permeabilización de una muestra biológica puede facilitar la captura del analito. Las condiciones y agentes de permeabilización ilustrativos se describen en la Sección (I)(d)(ii)(13) o la Sección de modalidades ilustrativas del documento WO 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm 2020/0277663.

Los métodos de análisis espacial basados en matrices implican la transferencia de uno o más analitos de una muestra biológica a una serie de características en un sustrato, donde cada característica está asociada con una ubicación espacial única en la matriz. El análisis subsecuente de los analitos transferidos incluye determinar la identidad de los analitos y la ubicación espacial de los analitos dentro de la muestra biológica. La ubicación espacial de un analito dentro de la muestra biológica se determina basándose en la característica a la que está unido el analito (por ejemplo, directa o indirectamente) en la matriz, y la ubicación espacial relativa de la característica dentro de la matriz.

Una "sonda de captura" se refiere a cualquier molécula capaz de capturar (directa o indirectamente) y/o marcar un analito (por ejemplo, un analito de interés) en una muestra biológica. En algunas modalidades, la sonda de captura es un ácido nucleico o un polipéptido. En algunas modalidades, la sonda de captura incluye un código de barras (por ejemplo, un código de barras espacial y/o un identificador molecular único (UMI)) y un dominio de captura. En algunas modalidades, una sonda de captura puede incluir un dominio de escisión y/o un dominio funcional (por ejemplo, un sitio de unión a cebador, tal como para secuenciación de nueva generación (NGS)). Ver, por ejemplo, la Sección (II)(b) (por ejemplo, las subsecciones (i)-(vi)) del documento WO 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm 2020/0277663. La generación de sondas de captura puede lograrse mediante cualquier método apropiado, incluidos los descritos en la Sección (II)(d)(ii) del documento WO 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm 2020/0277663.

La Figura 1 es un diagrama esquemático que muestra una sonda de captura ilustrativa, como se describe en la presente descripción. Como se muestra, la sonda de captura 102 está opcionalmente acoplada a una característica 101 por un dominio de escisión 103, tal como un enlazador disulfuro. La sonda de captura puede incluir una secuencia funcional 104 que sean útiles para su procesamiento subsecuente. La secuencia funcional 104 puede incluir toda o una parte de la secuencia de unión de células de flujo específica del secuenciador (por ejemplo, una secuencia P5 o P7), toda o una parte de una secuencia de cebador de secuenciación (por ejemplo, un sitio de unión al cebador R1, un sitio de unión al cebador R2), o sus combinaciones. La sonda de captura también puede incluir un código de barras espacial 105. La sonda de captura también puede incluir una secuencia de identificador molecular único (UMI) 106. Mientras la Figura 1 muestra el código de barras espacial 105 como ubicado aguas arriba (5') de la secuencia UMI 106, debe entenderse que las sondas de captura en donde la secuencia UMI 106 está ubicada aguas arriba (5') del código de barras espacial 105 también es adecuado para su uso en cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción. La sonda de captura también puede incluir un dominio de captura 107 para facilitar la captura de un analito diana. El dominio de captura puede tener una secuencia complementaria a una secuencia de un analito de ácido nucleico. El dominio de captura puede tener una secuencia complementaria a una sonda conectada descrita en la presente descripción. El dominio de captura puede tener una secuencia complementaria a una secuencia de control de captura presente en un agente de captura del analito. El dominio de captura puede tener una secuencia complementaria a un oligonucleótido de férula. Tal oligonucleótido de férula, además de tener una secuencia complementaria a un dominio de captura de una sonda de captura, puede tener una secuencia complementaria a una secuencia de un analito de ácido nucleico, una porción de una sonda conectada descrita en la presente descripción, una secuencia de control de captura descrita en la presente descripción y/o un adaptador metilado descrito en la presente descripción.

Las secuencias funcionales generalmente pueden seleccionarse para compatibilidad con cualquiera de una variedad de sistemas de secuenciación diferentes, por ejemplo, Ion Torrent Proton o PGM, instrumentos de secuenciación Illumina, PacBio, Oxford Nanopore, etc., y los requisitos de los mismos. En algunas modalidades, las secuencias

funcionales pueden seleccionarse por compatibilidad con sistemas de secuenciación no comercializados. Ejemplos de tales sistemas y técnicas de secuenciación, para los cuales pueden usarse secuencias funcionales adecuadas, incluyen (pero no se limitan a) secuenciación Ion Torrent Proton o PGM, secuenciación Illumina, secuenciación PacBio SMRT y secuenciación Oxford Nanopore. Además, en algunas modalidades, las secuencias funcionales pueden seleccionarse para que sean compatibles con otros sistemas de secuenciación, incluidos sistemas de secuenciación no comercializados.

En algunas modalidades, el código de barras espacial 105 y secuencias funcionales 104 es común a todas las sondas adjuntas a una característica determinada. En algunas modalidades, la secuencia UMI 106 de una sonda de captura unida a una característica determinada es diferente de la secuencia UMI de una sonda de captura diferente adjunta a la característica dada.

La Figura 2 es un esquema que ilustra una sonda de captura escindible, en donde la sonda de captura escindida puede entrar en una célula no permeabilizada y unirse a analitos dentro de la muestra. La sonda de captura 201 contiene un dominio de escisión 202, un péptido penetrantes en células 203, una molécula reportera 204, y un enlace disulfuro (-S-S-). 205 representa todas las demás partes de una sonda de captura, por ejemplo, un código de barras espacial y un dominio de captura. Las sondas de captura escindibles se describen con más detalle en el documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm 2020/0277663.

Para múltiples sondas de captura que están unidas a una característica de matriz común, la una o más secuencias de códigos de barras espaciales de las múltiples sondas de captura pueden incluir secuencias que son las mismas para todas las sondas de captura acopladas a la característica, y/o secuencias que son diferentes en todas sondas de captura acopladas a la característica.

La Figura 3 es un diagrama esquemático de una característica con código de barras espacial multiplexada ilustrativa. En la Figura 3, la característica 301 puede acoplarse a sondas de captura con códigos de barras espaciales, en donde las sondas con códigos de barras espaciales de una característica particular pueden poseer el mismo código de barras espacial, pero tienen diferentes dominios de captura diseñados para asociar el código de barras espacial de la característica con más de un analito diana. Por ejemplo, una característica puede acoplarse a cuatro tipos diferentes de sondas de captura con códigos de barras espaciales, donde cada tipo de sonda de captura con códigos de barras espaciales posee el código de barras espacial 302. Un tipo de sonda de captura asociada con la característica incluye el código de barras espacial 302 en combinación con un dominio de captura poli(T) 303, diseñado para capturar analitos diana de ARNm. Un segundo tipo de sonda de captura asociada con la característica incluye el código de barras espacial 302 en combinación con un dominio de captura N-mer aleatorio 304 para análisis de ADNg. Un tercer tipo de sonda de captura asociada con la característica incluye el código de barras espacial 302 en combinación con un dominio de captura complementario a una secuencia de control de captura de un agente de captura del analito de interés 305. Un cuarto tipo de sonda de captura asociada con la característica incluye el código de barras espacial 302 en combinación con un dominio de captura que puede unirse específicamente a una molécula de ácido nucleico 306 que pueden funcionar en un ensayo CRISPR (por ejemplo, CRISPR/Cas9). Si bien solo se muestran cuatro constructos diferentes con códigos de barras de sonda de captura en la Figura 3, los constructos con código de barras de sonda de captura se pueden adaptar para el análisis de cualquier analito determinado asociado con un ácido nucleico y capaz de unirse a tal constructo. Por ejemplo, los esquemas mostrados en la Figura 3 también pueden usarse para el análisis simultáneo de otros analitos descritos en la presente descripción, incluidos, pero sin limitarse a: (a) ARNm, un constructo de rastreo de linaje, proteínas y metabolitos de la superficie celular o intracelulares, y ADNg; (b) ARNm, proteínas y metabolitos intracelulares o de superficie celular con cromatina accesible (por ejemplo, ATAC-seq, DNase-seq y/o MNase-seq), y un agente de perturbación (por ejemplo, una nucleasa ARNcr/ARNgu CRISPR, TALEN, dedos de zinc y/u oligonucleótido antisentido como se describe en la presente descripción); (c) ARNm, proteínas y/o metabolitos de la superficie celular o intracelulares, un agente de etiquetado con código de barras (por ejemplo, los multímeros de MHC descritos en la presente descripción) y una secuencia V(D)J de un receptor de células inmunitarias (por ejemplo, receptor de células T). En algunas modalidades, un agente de perturbación puede ser una molécula pequeña, un anticuerpo, un fármaco, un aptámero, un miARN, un entorno físico (por ejemplo, cambio de temperatura) o cualquier otro agente de perturbación conocido. Ver, por ejemplo, la Sección (II)(b) (por ejemplo, las subsecciones (i)-(vi)) del documento WO 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm 2020/0277663. La generación de sondas de captura puede lograrse mediante cualquier método apropiado, incluidos los descritos en la Sección (II)(d)(ii) del documento WO 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm 2020/0277663.

Las sondas de captura unidas a una única característica de matriz pueden incluir secuencias de códigos de barras espaciales idénticas (o comunes), secuencias de códigos de barras espaciales diferentes o una combinación de ambas. Las sondas de captura unidas a una entidad pueden incluir varios conjuntos de sondas de captura. Las sondas de captura de un conjunto dado pueden incluir secuencias de códigos de barras espaciales idénticas. Las secuencias de códigos de barras espaciales idénticas pueden ser diferentes de las secuencias de códigos de barras espaciales de sondas de captura de otro conjunto.

La pluralidad de sondas de captura puede incluir secuencias de códigos de barras espaciales (por ejemplo, secuencias de códigos de barras de ácidos nucleicos) que están asociadas con ubicaciones específicas en una matriz espacial. Por ejemplo, una primera pluralidad de sondas de captura puede asociarse con una primera región, basándose en

una secuencia de código de barras espacial común a las sondas de captura dentro de la primera región, y una segunda pluralidad de sondas de captura puede asociarse con una segunda región, basándose en una secuencia de código de barras espacial común a las sondas de captura dentro de la segunda región. La segunda región puede estar asociada o no con la primera región. Pueden asociarse pluralidades adicionales de sondas de captura con secuencias de códigos de barras espaciales comunes a las sondas de captura dentro de otras regiones. En algunas modalidades, las secuencias de códigos de barras espaciales pueden ser las mismas en una pluralidad de moléculas sonda de captura.

En algunas modalidades, se incorporan múltiples códigos de barras espaciales diferentes en una única sonda de captura dispuesta. Por ejemplo, un conjunto mixto pero conocido de secuencias de códigos de barras espaciales puede proporcionar una dirección o atribución más sólida de los códigos de barras espaciales a un lugar o ubicación determinados, al proporcionar una confirmación duplicada o independiente de la identidad de la ubicación. En algunas modalidades, los múltiples códigos de barras espaciales representan una especificidad creciente de la ubicación del punto de la matriz particular.

En algunas modalidades, puede detectarse más de un tipo de analito (por ejemplo, ácidos nucleicos y proteínas) de una muestra biológica (por ejemplo, simultánea o secuencialmente) mediante el uso de cualquier técnica en formato múltiple apropiada, tales como las descritas en la Sección (IV) del documento WO 2020/176788 y/o publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm 2020/0277663.

En algunas modalidades, la detección de uno o más analitos (por ejemplo, analitos proteicos) puede realizarse mediante el uso de uno o más agentes de captura del analito. Como se usa en la presente, un "agente de captura del analito" se refiere a un agente que interactúa con un analito (por ejemplo, un analito en una muestra biológica) y con una sonda de captura (por ejemplo, una sonda de captura unida a un sustrato o una característica) para identificar el analito. En algunas modalidades, el agente de captura del analito incluye: (i) un resto de unión al analito (por ejemplo, que se une a un analito), por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo; (ii) código de barras del resto de unión al analito; y (iii) una secuencia de captura del analito. Como se usa en la presente, el término "código de barras del resto de unión al analito" se refiere a un código de barras que está asociado con, o de cualquier otra manera, identifica el resto de unión al analito. Como se usa en la presente, el término "secuencia de captura del analito" se refiere a una región o resto configurado para hibridarse, unirse, acoplarse o interactuar de cualquier otra manera con un dominio de captura de una sonda de captura. En algunos casos, un código de barras del resto de unión al analito (o una porción del mismo) puede eliminarse (por ejemplo, escindirse) del agente de captura del analito. Puede encontrarse una descripción adicional de los agentes de captura del analito en la Sección (II)(b)(ix) del documento WO 2020/176788 y/o en la Sección (II)(b)(viii) de la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm 2020/0277663.

Existen al menos dos métodos para asociar un código de barras espacial con una o más células vecinas, de manera que el código de barras espacial identifique la una o más células, y/o el contenido de la una o más células, como asociado con una ubicación espacial particular. Un método es promover analitos o sustitutos de analitos (por ejemplo, agentes intermedios) fuera de una célula y hacia una matriz con código de barras espacial (por ejemplo, incluyendo sondas de captura con código de barras espaciales). Otro método consiste en escindir sondas de captura con códigos de barras espaciales de una matriz y promover las sondas de captura con códigos de barras espaciales hacia y/o dentro o sobre la muestra biológica.

En algunos casos, las sondas de captura pueden configurarse para cebar, replicar y, en consecuencia, producir productos de extensión opcionalmente con códigos de barra a partir de una plantilla (por ejemplo, una plantilla de ADN o ARN, tal como un analito o un agente intermedio (por ejemplo, un producto de ligazón o un agente de captura de analito), o una porción del mismo), o derivados de los mismos (ver, por ejemplo, la Sección (II)(b)(vii) del documento WO 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm 2020/0277663 con respecto a sondas de captura extendidas). En algunos casos, las sondas de captura pueden configurarse para formar productos de ligazón con una plantilla (por ejemplo, una plantilla de ADN o ARN, tal como un analito o un agente intermedio, o una porción del mismo), para crear de esta manera productos de ligazón que sirven como sustitutos de una plantilla.

Como se usa en la presente, una "sonda de captura extendida" se refiere a una sonda de captura que tiene nucleótidos adicionales añadidos al extremo (por ejemplo, extremo 3' o 5') de la sonda de captura, para extender de esta manera la longitud total de la sonda de captura. Por ejemplo, un "extremo 3' extendido" indica que se añadieron nucleótidos adicionales al nucleótido más 3' de la sonda de captura para extender la longitud de la sonda de captura, por ejemplo, mediante reacciones de polimerización usadas para extender moléculas de ácido nucleico, incluida la polimerización con plantilla catalizada por una polimerasa (por ejemplo, una ADN polimerasa o una transcriptasa inversa). En algunas modalidades, extender la sonda de captura incluye añadir a un extremo 3' de una sonda de captura una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de ácido nucleico de un analito o agente intermedio unido específicamente al dominio de captura de la sonda de captura. En algunas modalidades, la sonda de captura se extiende mediante el uso de transcripción inversa. En algunas modalidades, la sonda de captura se extiende mediante el uso de una o más ADN polimerasas. Las sondas de captura extendidas incluyen la secuencia de la sonda de captura y la secuencia del código de barras espacial de la sonda de captura.

En algunas modalidades, las sondas de captura extendidas se amplifican (por ejemplo, en solución a granel o en la matriz) para producir cantidades que son suficientes para el análisis aguas abajo, por ejemplo, mediante secuenciación de ADN. En algunas modalidades, las sondas de captura extendidas (por ejemplo, moléculas de ADN) actúan como plantillas para una reacción de amplificación (por ejemplo, una reacción en cadena de la polimerasa).

5 Variantes adicionales de métodos de análisis espacial, que incluyen, en algunas modalidades, una etapa de obtención de imágenes, se describen en la Sección (II)(a) del documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm 2020/0277663. Análisis de analitos capturados (y/o agentes intermedios o porciones de los mismos), por ejemplo, incluyendo extracción de muestras, extensión de sondas de captura, secuenciación (por ejemplo, de una sonda de captura extendida escindida y/o una molécula de ADN complementaria a una sonda de
10 captura extendida), la secuenciación en la matriz (por ejemplo, mediante el uso de, por ejemplo, enfoques de hibridación in situ o ligazón in situ), análisis temporal y/o captura de proximidad, se describe en la Sección (II)(g) del documento WO 2020/176788 y/o publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm 2020/0277663. Algunas mediciones de control de calidad se describen en la Sección (II)(h) del documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm 2020/0277663.

15 La información espacial puede proporcionar información de importancia biológica y/o médica. Por ejemplo, los métodos y composiciones descritos en la presente descripción pueden permitir: la identificación de uno o más biomarcadores (por ejemplo, de diagnóstico, pronóstico y/o para la determinación de la eficacia de un tratamiento) de una enfermedad o trastorno; identificación de una diana farmacológica candidato para el tratamiento de una enfermedad o trastorno; identificación (por ejemplo, diagnóstico) de un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno; identificación de la etapa
20 y/o pronóstico de una enfermedad o trastorno en un sujeto; identificación de un sujeto que tiene una mayor posibilidad de desarrollar una enfermedad o trastorno; seguimiento de la progresión de una enfermedad o trastorno en un sujeto; determinación de la eficacia de un tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto; identificación de una subpoblación de pacientes para la cual un tratamiento es efectivo para una enfermedad o trastorno; modificación de un tratamiento de un sujeto con una enfermedad o trastorno; selección de un sujeto para la participación en un ensayo clínico; y/o selección de un tratamiento para un sujeto con una enfermedad o trastorno.

La información espacial puede proporcionar información de importancia biológica. Por ejemplo, los métodos y composiciones descritos en la presente descripción pueden permitir: identificación de perfiles de expresión del transcriptoma y/o proteoma (por ejemplo, en tejido sano y/o enfermo); identificación de múltiples tipos de analitos muy cercanos (por ejemplo, análisis del vecino más cercano); determinación de genes y/o proteínas regulados
30 positivamente y/o negativamente en tejido enfermo; caracterización de microambientes tumorales; caracterización de respuestas inmunitarias tumorales; caracterización de tipos celulares y su colocalización en tejido; e identificación de variantes genéticas dentro de los tejidos (por ejemplo, basadas en los perfiles de expresión de genes y/o proteínas asociados con biomarcadores de enfermedades o trastornos específicos).

Típicamente, para los métodos basados en matrices espaciales, un sustrato funciona como soporte para la unión
35 directa o indirecta de sondas de captura a características de la matriz. Una "característica" es una entidad que actúa como soporte o depósito de diversas entidades moleculares usadas en el análisis espacial. En algunas modalidades, algunas o todas las características de una matriz están funcionalizadas para la captura del analito. Se describen sustratos ilustrativos en la Sección (II)(c) del documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm 2020/0277663. Pueden encontrarse características y atributos geométricos ilustrativos de una
40 matriz en las Secciones (II)(d)(i), (II)(d)(iii) y (II)(d)(iv) del documento WO 2020/176788 y/o publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm 2020/0277663.

Generalmente, los analitos y/o agentes intermedios (o porciones de los mismos) pueden capturarse cuando se pone en contacto una muestra biológica con un sustrato que incluye sondas de captura (por ejemplo, un sustrato con sondas de captura incrustadas, manchadas, impresas, fabricadas sobre el sustrato, o un sustrato con características (por
45 ejemplo, perlas, pocillos) que comprenden sondas de captura). Como se usa en la presente, "contacto", "contactado" y/o "poner en contacto", una muestra biológica con un sustrato se refiere a cualquier contacto (por ejemplo, directo o indirecto) de manera que las sondas de captura puedan interactuar (por ejemplo, unirse covalentemente o no covalentemente (por ejemplo, hibridarse)) con analitos de la muestra biológica. La captura puede lograrse de forma activa (por ejemplo, mediante el uso de electroforesis) o pasivamente (por ejemplo, mediante el uso de difusión). La
50 captura de analitos se describe con más detalle en la Sección (II)(e) del documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm 2020/0277663.

En algunos casos, el análisis espacial puede realizarse mediante la unión y/o introducción de una molécula (por ejemplo, un péptido, un lípido o una molécula de ácido nucleico) que tiene un código de barras (por ejemplo, un código de barras espacial) a una muestra biológica (por ejemplo, a una célula en una muestra biológica). En algunas
55 modalidades, una pluralidad de moléculas (por ejemplo, una pluralidad de moléculas de ácido nucleico) que tienen una pluralidad de códigos de barras (por ejemplo, una pluralidad de códigos de barras espaciales) se introducen en una muestra biológica (por ejemplo, en una pluralidad de células en una muestra biológica) para su uso en análisis espacial. En algunas modalidades, después de unir y/o introducir una molécula que tiene un código de barras a una muestra biológica, la muestra biológica puede separarse físicamente (por ejemplo, disociarse) en células individuales
60 o grupos de células para su análisis. Algunos de estos métodos de análisis espacial se describen en la Sección (III) del documento WO 2020/176788 y/o en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm 2020/0277663.

En algunos casos, el análisis espacial puede realizarse mediante la detección de múltiples oligonucleótidos que se hibridan con un analito. En algunos casos, por ejemplo, el análisis espacial puede realizarse mediante el uso de ligazón con plantilla de ARN (RTL). Los métodos de RTL se han descrito anteriormente. Ver, por ejemplo, Credle y otros, *Nucleic Acids Res.* 21 de agosto de 2017;45(14):e128. Típicamente, RTL incluye la hibridación de dos oligonucleótidos con secuencias adyacentes en un analito (por ejemplo, una molécula de ARN, tal como una molécula de ARNm). En algunos casos, los oligonucleótidos son moléculas de ADN. En algunos casos, uno de los oligonucleótidos incluye al menos dos bases de ácido ribonucleico en el extremo 3' y/o el otro oligonucleótido incluye un nucleótido fosforilado en el extremo 5'. En algunos casos, uno de los dos oligonucleótidos incluye un dominio de captura (por ejemplo, una secuencia poli(A), una secuencia no homopolimérica). Después de la hibridación con el analito, una ligasa (por ejemplo, ligasa SplintR) liga los dos oligonucleótidos juntos, lo que crea un producto de ligazón. En algunos casos, los dos oligonucleótidos se hibridan con secuencias que no son adyacentes entre sí. Por ejemplo, la hibridación de los dos oligonucleótidos crea un espacio entre los oligonucleótidos hibridados. En algunos casos, una polimerasa (por ejemplo, una ADN polimerasa) puede extender uno de los oligonucleótidos antes de la ligazón. Después de la ligazón, el producto de ligazón se libera del analito. En algunos casos, el producto de ligazón se libera mediante el uso de una endonucleasa (por ejemplo, ARNasa H). El producto de ligazón liberado puede capturarse a continuación mediante sondas de captura (por ejemplo, en lugar de la captura directa de un analito) en una matriz, opcionalmente amplificarse y secuenciarse, para determinar de este modo la ubicación y opcionalmente la abundancia del analito en la muestra biológica.

Durante el análisis de información espacial, se obtiene información de secuencia para un código de barras espacial asociado con un analito, y la información de secuencia puede usarse para proporcionar información sobre la distribución espacial del analito en la muestra biológica. Pueden usarse varios métodos para obtener la información espacial. En algunas modalidades, sondas de captura específicas y los analitos que capturan están asociados con ubicaciones específicas en una serie de características en un sustrato. Por ejemplo, pueden asociarse códigos de barras espaciales específicos con ubicaciones de matriz específicas antes de la fabricación de la matriz, y las secuencias de los códigos de barras espaciales pueden almacenarse (por ejemplo, en una base de datos) junto con información de ubicación de matriz específica, de modo que cada código de barras espacial se asigne de forma única a una ubicación particular de la matriz.

Alternativamente, pueden depositarse códigos de barras espaciales específicos en ubicaciones predeterminadas en una serie de características durante la fabricación, de manera que en cada ubicación, solo esté presente un tipo de código de barras espacial, de modo que los códigos de barras espaciales estén asociados de forma única con una única característica de la matriz. Cuando sea necesario, las matrices pueden decodificarse mediante el uso de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción de modo que los códigos de barras espaciales se asocien de forma única con las ubicaciones de las características de la matriz, y este mapeo puede almacenarse como se describió anteriormente.

Cuando se obtiene información de secuencia para sondas y/o analitos de captura durante el análisis de información espacial, las ubicaciones de las sondas y/o analitos de captura pueden determinarse haciendo referencia a la información almacenada que asocia de forma única cada código de barras espacial con una ubicación de característica de matriz. De esta manera, las sondas de captura específicas y los analitos capturados se asocian con ubicaciones específicas en el conjunto de características. Cada ubicación de característica de matriz representa una posición con relación a un punto de referencia de coordenadas (por ejemplo, una ubicación de matriz, un marcador fiducial) para la matriz. En consecuencia, cada ubicación de característica tiene una "dirección" o ubicación en el espacio de coordenadas de la matriz.

Algunos flujos de trabajo de análisis espacial ilustrativos se describen en la sección modalidades ilustrativas del documento WO 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm 2020/0277663. Ver, por ejemplo, la modalidad ilustrativa que comienza con "En algunos ejemplos no limitantes de los flujos de trabajo descritos en la presente descripción, la muestra puede sumergirse..." del documento WO 2020/176788 y/o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm 2020/0277663. Ver también, por ejemplo, la Guía del usuario de los kits de reactivos de expresión genética espacial de Visium (por ejemplo, Rev C, con fecha de junio de 2020) y/o la Guía del usuario de los kits de reactivos de optimización de tejidos espaciales de Visium (por ejemplo, Rev C, con fecha de julio de 2020).

En algunas modalidades, el análisis espacial puede realizarse mediante el uso de hardware y/o software dedicado, tal como cualquiera de los sistemas descritos en las Secciones (II)(e)(ii) y/o (V) de los documentos WO 2020/176788 y/o publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm 2020/0277663, o cualquiera de uno o más de los dispositivos o métodos descritos en las Secciones *Control Slide for Imaging, Methods of Using Control Slides and Substrates for, Systems of Using Control Slides and Substrates for Imaging, and/or Sample and Array Alignment Devices and Methods, Informational labels* del documento WO 2020/123320.

Los sistemas adecuados para realizar análisis espacial pueden incluir componentes tales como una cámara (por ejemplo, una celda de flujo o una cámara hermética y sellable) para contener una muestra biológica. La muestra biológica puede montarse, por ejemplo, en un soporte para muestras biológicas. Pueden conectarse una o más cámaras de fluido a la cámara y/o al portamuestras a través de conductos de fluido, y los fluidos se pueden suministrar a la cámara y/o al portamuestras a través de bombas fluidicas, fuentes de vacío u otros dispositivos acoplados a los

conductos de fluido que crean un gradiente de presión para impulsar el flujo de fluido. También pueden conectarse una o más válvulas a conductos de fluido para regular el flujo de reactivos desde los depósitos hasta la cámara y/o el portamuestras.

5 Los sistemas pueden incluir opcionalmente una unidad de control que incluye uno o más procesadores electrónicos, una interfaz de entrada, una interfaz de salida (tal como una pantalla) y una unidad de almacenamiento (por ejemplo, un medio de almacenamiento de estado sólido tal como, pero sin limitarse a, un medio de almacenamiento magnético, óptico u otro de estado sólido, persistente, grabable y/o regrabable). Opcionalmente, la unidad de control puede conectarse a uno o más dispositivos remotos a través de una red. La unidad de control (y sus componentes) generalmente puede realizar cualquiera de las etapas y funciones descritos en la presente descripción. Cuando el sistema está conectado a un dispositivo remoto, el dispositivo (o dispositivos) remoto(s) puede(n) realizar cualquiera de las etapas o características descritas en la presente descripción. Los sistemas pueden incluir opcionalmente uno o más detectores (por ejemplo, CCD, CMOS) usados para capturar imágenes. Los sistemas también pueden incluir opcionalmente una o más fuentes de luz (por ejemplo, basadas en LED, basadas en diodos, láseres) para iluminar una muestra, un sustrato con características, analitos de una muestra biológica capturada en un sustrato y diversos medios de control y calibración.

10 Los sistemas pueden incluir opcionalmente instrucciones de software codificadas y/o implementadas en uno o más medios de almacenamiento tangibles y componentes de hardware tales como circuitos integrados de aplicaciones específicas. Las instrucciones de software, cuando son ejecutadas por una unidad de control (y en particular, un procesador electrónico) o un circuito integrado, pueden hacer que la unidad de control, circuito integrado u otro componente que ejecuta las instrucciones de software realice cualquiera de las etapas o funciones del método descritos en la presente descripción.

15 En algunos casos, los sistemas descritos en la presente descripción pueden detectar (por ejemplo, registrar una imagen) la muestra biológica en la matriz. En la solicitud PCT núm 2020/061064 y/o en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm 2021/0150707 se describen métodos ilustrativos para detectar la muestra biológica en una matriz.

20 Antes de transferir analitos de la muestra biológica al conjunto de características del sustrato, la muestra biológica puede alinearse con la matriz. La alineación de una muestra biológica y una matriz de características que incluyen sondas de captura pueden facilitar el análisis espacial, que puede usarse para detectar diferencias en la presencia y/o nivel de analito dentro de diferentes posiciones en la muestra biológica, por ejemplo, para generar un mapa tridimensional de la presencia y/o nivel del analito. En la solicitud PCT núm 2020/053655 se describen métodos ilustrativos para generar un mapa bidimensional y/o tridimensional de la presencia y/o nivel del analito y los métodos de análisis espacial se describen generalmente en el documento WO 2020/061108 y/o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm 2021/0155982.

25 En algunos casos, un mapa de presencia y/o nivel de analito puede alinearse con una imagen de una muestra biológica mediante el uso de uno o más marcadores fiduciales, por ejemplo, objetos colocados en el campo de visión de un sistema de imágenes que aparecen en la imagen producida, como se describe en la Sección *Substrate Attributes, Control Slide for Imaging* del documento WO 2020/123320, solicitud PCT núm. 2020/061066 y/o publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm 2021/018522. Los marcadores fiduciales pueden usarse como punto de referencia o escala de medición para la alineación (por ejemplo, para alinear una muestra y una matriz, para alinear dos sustratos, para determinar una ubicación de una muestra o matriz en un sustrato con respecto a un marcador fiducial) y/o para mediciones cuantitativas de tamaños y/o distancias.

II. Análisis espacial

30 Los planes de diagnóstico y tratamiento del cáncer y las enfermedades frecuentemente se guían por tres herramientas de diagnóstico: análisis de sangre, obtención de imágenes y/o biopsias. Frecuentemente, la cirugía es la primera línea de tratamiento cuando se identifican tejidos cancerosos y enfermos, especialmente en las primeras etapas de la enfermedad. Cuando está indicada la cirugía, los médicos se enfrentan a decisiones difíciles sobre el tamaño y el lugar de la resección del tejido enfermo. El diagnóstico y la estadificación concluyentes frecuentemente se obtienen después de que se ha completado la resección quirúrgica. Desafortunadamente, a veces no se elimina por completo todo el tejido anormal, lo que deja márgenes de tejido que contienen células enfermas que pueden proliferar en el cuerpo y causar cáncer y enfermedades continuas.

35 Los métodos descritos aquí pueden ayudar a respaldar la decisión de un médico sobre el tipo de intervención quirúrgica para proporcionar a un sujeto un cáncer potencial o un tejido enfermo. Por ejemplo, la información obtenida al practicar los métodos descritos puede ayudar a determinar el tamaño y el sitio de la resección del tejido al identificar de manera más completa los márgenes de tejido anormales, para reducir de esta manera el riesgo de una nueva extirpación y/o para reducir el riesgo de recurrencia futura del tejido canceroso o enfermo en el sujeto.

(a) Métodos para determinar el tamaño y el sitio de un tejido a extirpar

40 En la presente descripción se proporcionan métodos para determinar el tamaño y el sitio de un tejido a resear de un sujeto que incluyen: (a) poner en contacto una muestra de tejido obtenida del sujeto con una matriz que comprende

una pluralidad de sondas de captura, donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende (i) un dominio de captura que se une específicamente a un analito de la muestra de tejido y (ii) un código de barras espacial; (b) determinar (i) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al analito específicamente unido al dominio de captura o un complemento del mismo, y (ii) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial o un complemento de la misma, y usar las secuencias de ácido nucleico determinadas de (i) y (ii) para identificar la presencia del analito en una ubicación en la muestra de tejido; (c) comparar la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del analito en ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido, y determinar el tamaño y el sitio de un tejido a resear del sujeto basándose en la comparación. En algunas modalidades, el analito es un ADN o ARN. En algunas modalidades, el analito es una molécula de ARN mensajero (ARNm). En algunas modalidades, el analito es un ADN genómico. En algunas modalidades, el analito comprende una secuencia de longitud completa de un biomarcador descrito en la presente descripción. En algunas modalidades, el analito comprende un fragmento de la secuencia de un biomarcador descrito en la presente descripción. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, cada una de la pluralidad de sondas de captura comprende (i) un dominio de captura que se une específicamente a un analito de la sección de tejido y (ii) un código de barras espacial. La sonda de captura puede ser cualquier sonda de captura descrita en la presente descripción. En algunas modalidades, el dominio de captura de la sonda de captura comprende una secuencia que es sustancialmente complementaria (por ejemplo, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % complementaria) a una porción de la secuencia del analito de la muestra de tejido. En algunas modalidades, el dominio de captura puede tener un total de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 125 nucleótidos (o cualquiera de los subintervalos de este intervalo descrito en la presente descripción). En algunas modalidades, la secuencia que es sustancialmente complementaria a una porción de la secuencia del analito puede ser una secuencia aleatoria. En algunas modalidades, la secuencia que es sustancialmente complementaria a una porción de la secuencia del analito puede incluir una secuencia de oligonucleótidos poli(T) (por ejemplo, al menos 5 T contiguas, al menos 10 T contiguas o al menos 15 T contiguas).

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la etapa (b) comprende secuenciar (i) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al analito específicamente unido al dominio de captura o un complemento del mismo, y (ii) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial o un complemento del mismo. En algunas modalidades, la secuenciación es secuenciación de alto rendimiento, secuenciación por síntesis, secuenciación por hibridación, secuenciación por ligazón o cualquiera de los otros métodos de secuenciación descritos en la presente descripción o conocidos en la técnica. Por ejemplo, la secuenciación puede implicar uno o más de amplificación de ácido nucleico, la ligazón o adición de uno o más adaptadores de secuenciación, escisión de la sonda de captura de la matriz, extensión de la sonda de captura mediante el uso del ADNc unido como plantilla, y generación de un ácido nucleico de hebra única que comprende una secuencia que es complementaria a toda o parte de la sonda de captura extendida. Los métodos no limitantes para determinar la secuencia de (i) toda o una parte de la secuencia del ácido nucleico diana, o un complemento de la misma, o (ii) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras del resto de unión, o un complemento de la misma, se describen en la presente descripción o son conocidos en la técnica.

También se proporcionan en la presente descripción métodos para determinar el tamaño y el sitio de un tejido a resear de un sujeto que incluyen: (a) poner en contacto una muestra de tejido obtenida del sujeto con una pluralidad de agentes de captura del analito, donde un agente de captura del analito de la pluralidad de agentes de captura del analito comprende un código de barras de resto de unión al analito, una secuencia de captura del analito y un resto de unión al analito que se une específicamente a un analito; (b) disponer la muestra de tejido en una matriz, donde la matriz comprende una pluralidad de sondas de captura, donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende un código de barras espacial y un dominio de captura que se une específicamente a la secuencia de captura del analito; (c) determinar (i) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras del resto de unión del analito o un complemento de la misma, y (ii) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras del resto de unión o un complemento de la misma, y usar las secuencias de ácido nucleico determinadas de (i) y (ii) para identificar la presencia del analito en una ubicación en la muestra de tejido; (d) comparar la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del analito en ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido, y determinar el tamaño y el sitio de un tejido a resear del sujeto basándose en la comparación. En algunas modalidades, el analito es una proteína. En algunas modalidades, el analito es una proteína de longitud completa. En algunas modalidades, el analito es un fragmento de una proteína. En algunas modalidades, el analito es un subproducto de una proteína. En algunas modalidades, la proteína es cualquiera de los biomarcadores de cáncer ilustrativos descritos en la presente descripción.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, cada uno de la pluralidad de agentes de captura del analito comprende un código de barras del resto de unión al analito, una secuencia de captura del analito y un resto de unión al analito que se une específicamente a un analito. En algunas modalidades, el resto de unión al analito es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno (por ejemplo, un Fab). También puede usarse como resto de unión al analito cualquier otro resto de unión a proteínas adecuado conocido en la técnica. En algunas modalidades, el código de barras del resto de unión al analito puede ser cualquier código de barras descrito en la presente descripción. En algunas modalidades, la secuencia de captura del analito puede ser

cualquier secuencia de captura del analito descrita en la presente descripción. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, cada una de la pluralidad de sondas de captura comprende un código de barras espacial y un dominio de captura que se une específicamente a la secuencia de captura del analito. La sonda de captura puede ser cualquier sonda de captura descrita en la presente descripción. En algunas modalidades, el dominio de captura de la sonda de captura comprende una secuencia que es sustancialmente complementaria (por ejemplo, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % complementaria) a una porción de la secuencia de captura del analito. En algunas modalidades, el dominio de captura puede tener un total de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 125 nucleótidos (o cualquiera de los subintervalos de este intervalo descrito en la presente descripción). En algunas modalidades, la secuencia que es sustancialmente complementaria a una porción de la secuencia de captura del analito puede ser una secuencia aleatoria. En algunas modalidades, la secuencia que es sustancialmente complementaria a una porción de la secuencia de captura del analito puede incluir una secuencia de oligonucleótidos poli(T) (por ejemplo, al menos 5 T contiguas, al menos 10 T contiguas o al menos 15 T contiguas).

En algunas modalidades, la determinación de la secuencia se realiza mediante secuenciación. En algunas modalidades, la secuenciación es secuenciación de alto rendimiento, secuenciación por hibridación o cualquiera de los otros métodos de secuenciación descritos en la presente descripción o conocidos en la técnica. Por ejemplo, la secuenciación puede implicar uno o más de amplificación de ácido nucleico, la ligazón o adición de uno o más adaptadores de secuenciación, escisión de la sonda de captura de la matriz, extensión de la sonda de captura mediante el uso de la secuencia de captura del analito unida como plantilla, y generar un ácido nucleico de hebra única que comprende una secuencia que es complementaria a toda o parte de la sonda de captura extendida. Los métodos no limitantes para determinar la secuencia de (i) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras del resto de unión al analito, o un complemento de la misma, o (ii) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial, o un complemento de la misma, se describen en la presente descripción o son conocidos en la técnica.

En algunas modalidades, el tejido a resear es un tumor (por ejemplo, un tumor maligno o benigno). En algunas modalidades, el tumor es un tumor sólido. En algunas modalidades, se sospecha que el sujeto tiene cáncer. En algunas modalidades, el sujeto se ha diagnosticado o identificado previamente con un cáncer (por ejemplo, cualquiera de los cánceres ilustrativos descritos en la presente descripción).

Los ejemplos no limitantes de cánceres a los que se hace referencia en cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción incluyen: sarcomas, carcinomas, carcinoma corticosuprarrenal, cánceres relacionados con el SIDA, cáncer anal, cáncer de apéndice, astrocitomas, tumor teratoide/rabdoide atípico, carcinoma de células basales, cáncer de vejiga, glioma del tronco encefálico, tumores cerebrales (incluido el glioma del tronco encefálico, tumor teratoide/rabdoide atípico del sistema nervioso central, tumores embrionarios del sistema nervioso central, astrocitomas, craneofaringioma, ependimoblastoma, ependimoma, meduloblastoma, meduloepitelioma, tumores del parénquima pineal de diferenciación intermedia, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales y pineoblastoma), cáncer de mama, tumores bronquiales, cáncer de sitio primario desconocido, tumor carcinoide, carcinoma de sitio primario desconocido, tumor teratoide/rabdoide atípico del sistema nervioso central, tumores embrionarios del sistema nervioso central, cáncer de cuello uterino, cánceres infantiles, cordoma, cáncer de colon, cáncer colorrectal, craneofaringioma, tumores de células de los islotes del páncreas endocrino, cáncer de endometrio, ependimoblastoma, ependimoma, cáncer de esófago, estesioblastoma, sarcoma de Ewing, tumor extracraneal de células germinales, tumor extragonadal de células germinales, cáncer de vías biliares extrahepáticas, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico (estómago), tumor carcinoide gastrointestinal, tumor de células del estroma gastrointestinal, tumor del estroma gastrointestinal (GIST), tumor trofoblástico gestacional, glioma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de corazón, cáncer de hipofaringe, melanoma intraocular, tumores de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, histiocitosis de células de Langerhans, cáncer de laringe, cáncer de labio, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, histiocitoma fibroso maligno, cáncer de hueso, meduloblastoma, meduloepitelioma, melanoma, carcinoma de células de Merkel, carcinoma de piel de células de Merkel, mesotelioma, cáncer de cuello escamoso metastásico con primaria oculta, cáncer de boca, síndromes de neoplasias endocrinas múltiples, mieloma múltiple, mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, neoplasias mieloproliferativas, cáncer de cavidad nasal, cáncer de nasofaringe, neuroblastoma, cáncer de piel no melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer oral, cáncer de cavidad oral, cáncer de orofaringe, osteosarcoma, otros tumores del cerebro y de la médula espinal, cáncer de ovario, cáncer epitelial de ovario, tumor de células germinales de ovario, tumor de ovario de bajo potencial maligno, cáncer de páncreas, papilomatosis, cáncer de senos paranasales, cáncer de paratiroides, cáncer pélvico, cáncer de pene, cáncer de faringe, tumores del parénquima pineal de diferenciación intermedia, pineoblastoma, tumor pituitario, blastoma pleuropulmonar, cáncer de hígado hepatocelular primario, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer renal, cáncer de células renales (riñón), cáncer de células renales, cáncer del tracto respiratorio, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de glándula salival, síndrome de Sezary, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejido blando, carcinoma de células escamosas, cáncer de cuello escamoso, cáncer de estómago (gástrico), tumores neuroectodérmicos primitivos suprasensoriales, cáncer testicular, cáncer de garganta, carcinoma tímico, timoma, cáncer de tiroides, cáncer de células de transición, cáncer de células de transición de la pelvis renal y el uréter, tumor trofoblástico, cáncer de uréter, cáncer de uretra, cáncer de útero, sarcoma uterino, cáncer de vagina, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenström y tumor de Wilm.

En algunas modalidades, el tejido a reseca puede incluir un tumor (por ejemplo, un tumor maligno) de cualquiera de los tipos de cáncer descritos en la presente descripción.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, el analito es un biomarcador tumoral. En algunas modalidades, el analito es un antígeno tumoral. Los antígenos tumorales ilustrativos incluyen, pero sin limitarse a, series de antígenos de antígeno asociado a melanoma (MAGE) (por ejemplo, MAGE-C1 (antígeno de cáncer/testículo CT7), antígeno MAGE-B1 (antígeno MAGE-XP, DAM10), antígeno MAGE-B2 (DAM6), antígeno MAGE-2, antígeno MAGE-4a y antígeno MAGE-4b), tirosinasa, glicoproteína 100 (gp100), disialogangliósido GD-2, disialogangliósido O-acetilado GD-3, gangliósido GM-2, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), antígeno B-Raf mutante asociado con melanoma y cáncer de colon, antígeno del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2/neu), antígeno asociado a melanoma reconocido por células T (MART-1) (por ejemplo, péptido MART-1 26-35 o péptido MART-1 27-35), proteína de unión a proteína cinasa C, proteína transcriptasa inversa, proteína de anclaje a cinasa A (proteína AKAP), cinasa relacionada con vaccinia Serina/treonina cinasa 1 (VRK1), fucosiltransferasa (T6-7), proteína de dedos de zinc 258 (T11-6), proteína de unión a p53 (T1-52), T5-15 (KIAA1735), T5-13 (Sos1), T11-5 (proteína hipotética MGC4170), T11-9 (proteína hipotética AF225417), T11-3 (repetición de anquirina trap), T7-1 (KIAA1288), un péptido ras mutante o de tipo salvaje, fermento de telomerasa de *Homo sapiens* (hTRT), citoqueratina-19 (CYFRA21-1), antígeno 1 del carcinoma de células escamosas (SCCA-1), proteína T4-A, antígeno 2 del carcinoma de células escamosas (SCCA-2), antígeno del carcinoma de ovario CA125 (1A1-3B) (KIAA0049), MUCINA 1 asociada a la superficie celular (por ejemplo, MUCINA asociada a tumores, MUCINA asociada a carcinoma, MUCINA epitelial polimórfica, MUCINA urinaria reactiva al maní, mucina epitelial polimórfica (PEM), PEMT, episialina, antígeno de membrana epitelial asociado a tumores, antígeno de membrana epitelial (EMA), antígeno H23 (H23AG), PUM y antígeno asociado a carcinoma de mama DF3), antígeno tumoral CTCL se1-1, antígeno tumoral CTCL se14-3, antígeno tumoral CTCL se20-4, antígeno tumoral CTCL se20-9, antígeno tumoral CTCL se33-1, antígeno tumoral CTCL se37-2, antígeno tumoral CTCL se57-1, antígeno tumoral CTCL se89-1, antígeno de membrana específico de la próstata, glicoproteína del trofoblasto oncofetal 5T4, herpesvirus asociado a sarcoma de Kaposi Orf73, antígeno de cáncer de colon NY-CO-45, antígeno de cáncer de pulmón NY-LU-12 variante A, antígeno de superficie asociado al cáncer, antígeno de adenocarcinoma ART1, antígeno de cáncer de cerebro-testículo asociado paraneoplásico (antígeno onconeuronal MA2; antígeno neuronal paraneoplásico), antígeno ventral neurooncológico 2 (NOVA2), gen del antígeno del carcinoma hepatocelular 520, antígeno asociado a tumor CO-029, antígeno asociado a tumor MAGE-X2, antígeno del sarcoma sinovial, punto de ruptura X 2, antígeno del carcinoma de células escamosas reconocido por célula T, antígeno 1 de cáncer de colon definido serológicamente, antígeno de cáncer de mama definido serológicamente NY-BR-15, antígeno de cáncer de mama definido serológicamente NY-BR-16, cromogranina A, proteína secretora de paratiroides 1, antígeno asociado al cáncer de páncreas (DUPAN-2), antígeno carbohidrato CA 19-9, antígeno carbohidrato CA 72-4, antígeno carbohidrato CA 195 y antígeno carcinoembrionario (CEA).

En algunas modalidades, el tejido a reseca es un tejido infectado, un tejido necrótico o un tejido enfermo. En algunas modalidades, el analito puede estar asociado con una infección, necrosis, inflamación o enfermedad. En la técnica se conocen ejemplos no limitantes de dichos analitos.

En algunas modalidades, el tejido a reseca está infectado por una bacteria. En algunas modalidades, el tejido a reseca está infectado por un virus. En algunas modalidades, el tejido a reseca está infectado por un hongo. En algunas modalidades, el tejido a reseca está infectado por un parásito o protozoos.

En algunas modalidades, el tejido a reseca está infectado por una bacteria, por ejemplo, una bacteria *Bordetella pertussis*, una *Brucella abortis*, una *Escherichia coli*, una especie de *Salmonella*, por ejemplo, una *Salmonella typhi*, una *Streptococci*, una *vibrio* (*V. cholera*, *V. parahaemolyticus*), una *Shigella*, una *Pseudomonas*, una especie de *Brucella*, una *Klebsiella*, una especie de *Micobacterias* (una tuberculosis, una avium, un BCG, una leprae), una *Pneumococci*, una *Staphylococci*, una especie de *Enterobacterias*, una *Clostridium tetani*, una *Bacillus anthracis*, una *Streptococcus pneumoniae*, una *Meningococcus* A, B, C, Y, W o W-135, una *Helicobacter pylori*, una *Rochalimaea henselae*, una *Pasteurella* (*P. haemolytica*, *P. multocida*), una *Chlamydia* (*C. trachomatis*, *C. psittaci*), una *Treponema pallidum*, una *Haemophilus* species, por ejemplo, una *Haemophilus influenza* tipo b, una especie de *micoplasma*, una *Borrelia burgdorferi*, una *Legionella pneumophila*, una *Clostridium botulinum*, una *Corynebacterium diphtheriae*, una *Yersinia enterocolitica*, una *Ehrlichia*, una *Anaplasma* o una *Coxiella burnetii*.

En algunas modalidades, el tejido a reseca está infectado por un parásito o protozoos, por ejemplo, aquellos que causan la malaria (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, o *P. malariae*), un esquistosoma, un tripanosoma, leishmania, un nemátodo filarial, *Trichomonas vaginalis*, un sarcocystis, una especie de *Taenia* (*T. saginata* o *T. solium*), *Toxoplasma gondii*, *Trichinella spiralis* o una especie de *Eimeria*.

En algunas modalidades, el tejido a reseca está infectado por un hongo, por ejemplo, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Coccidioides immitis* o *Coccidioides posadasii*.

En algunas modalidades, el tejido a reseca está infectado por un virus, por ejemplo, un rotavirus, un aftovirus (el agente para la fiebre aftosa), un virus del Ébola, un virus Hanta, una parainfluenza, una especie de virus del herpes (por ejemplo, virus del herpes simple, virus de Epstein-Barr, virus de la varicela, pseudorrabia o citomegalovirus), un virus de la rabia, un virus de la polio, una hepatitis A, B, C o E, moquillo, un virus de la encefalomiелitis equina

5 venezolana, un virus de la leucemia felina, un reovirus, un virus respiratorio sincitial, un virus de la fiebre de Lassa, un virus del polioma, un parvovirus canino, un virus del papiloma, un flavivirus, un virus de la encefalitis transmitido por garrapatas, un paramixovirus (el agente de la peste bovina), un rinovirus, un enterovirus, un virus Mengo, un paramixovirus (paperas, sarampión o virus respiratorio sincitial), un virus de la bronquitis infecciosa aviar, HTLV 1, VIH-1 o -2, o virus de la influenza A, B o C, un virus de la coriomeningitis linfocítica, un parvovirus, un adenovirus, un togavirus, un virus respiratorio sincitial bovino, un coronavirus o un virus de la encefalitis japonesa.

10 En algunas modalidades, los métodos proporcionados en la presente descripción comprenden comparar la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del analito en ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido, y determinar el tamaño y el sitio de un tejido a resecar del sujeto basándose en la comparación. En algunas modalidades, la(s) ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido es/son ubicación(ones) de referencia. En algunas modalidades, la(s) ubicación(ones) de referencia en la muestra de tejido es/son ubicaciones de tejido sano. En algunas modalidades, la(s) ubicación(ones) de referencia en la muestra de tejido es/son ubicaciones de tejido no canceroso. En algunas modalidades, la(s) ubicación(ones) de referencia en la muestra de tejido es/son ubicaciones de tejido no tumoral. En algunas modalidades, la(s) ubicación(ones) de referencia en la muestra de tejido es/son
15 ubicaciones sin anomalías tales como tumor, cáncer, necrosis, inflamación, infección o enfermedad.

20 En algunas modalidades, la presencia del analito en la ubicación de la muestra de tejido es significativamente diferente de la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s) en el tejido. En algunas modalidades, la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido es significativamente mayor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s) de la muestra de tejido. En algunas modalidades, la presencia del analito en la ubicación de la muestra de tejido es significativamente menor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido.

25 En algunas modalidades, se determina que la ubicación en la muestra de tejido se reseca si la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido es significativamente diferente de la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s). En algunas modalidades, se determina que la ubicación en la muestra de tejido se reseca si la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido es significativamente mayor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s). En algunas modalidades, se determina que la ubicación en la muestra de tejido se reseca si la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido es significativamente menor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s).

30 En algunas modalidades, la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido es de aproximadamente 0,1 veces a aproximadamente 100 veces (por ejemplo, aproximadamente 0,1 veces a aproximadamente 90 veces, aproximadamente 0,1 veces a aproximadamente 80 veces, aproximadamente 0,1 veces a aproximadamente 70 veces, aproximadamente 0,1 veces a aproximadamente 60 veces, aproximadamente 0,1 veces a aproximadamente 50 veces, aproximadamente 0,1 veces a aproximadamente 40 veces, aproximadamente 0,1 veces a aproximadamente 30 veces, aproximadamente 0,1 veces a aproximadamente 20 veces, aproximadamente 0,1 veces a aproximadamente 15 veces, aproximadamente 0,1 veces a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 0,1 veces a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 0,1 veces a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 0,1 veces a aproximadamente 5 veces, aproximadamente 0,1 veces a aproximadamente 4 veces, aproximadamente 0,1 veces a aproximadamente 3 veces, aproximadamente 0,1 veces a aproximadamente 2 veces, aproximadamente 0,1 veces a aproximadamente 1,5 veces, aproximadamente 0,1 veces a aproximadamente 1 vez, aproximadamente 0,1 veces a aproximadamente 0,8 veces, aproximadamente 0,1 veces a aproximadamente 0,6 veces, aproximadamente 0,1 veces a aproximadamente 0,4 veces, aproximadamente 0,1 veces a aproximadamente 0,2 veces, aproximadamente 1 vez a aproximadamente 100 veces, aproximadamente 1 vez a aproximadamente 90 veces, aproximadamente 1 vez a aproximadamente 80 veces, aproximadamente 1 vez a aproximadamente 70 veces, aproximadamente 1 vez a aproximadamente 60 veces, aproximadamente 1 vez a aproximadamente 50 veces, aproximadamente 1 vez a aproximadamente 40 veces, aproximadamente 1 vez a aproximadamente 30 veces, aproximadamente 1 vez a aproximadamente 20 veces, aproximadamente 1 vez a aproximadamente 15 veces, aproximadamente 1 vez a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 1 vez a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 1 vez a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 1 vez a aproximadamente 5 veces, aproximadamente 1 vez a aproximadamente 4 veces, aproximadamente 1 vez a aproximadamente 3 veces, aproximadamente 1 vez a aproximadamente 2 veces, aproximadamente 1 vez a aproximadamente 1,5 veces, aproximadamente 5 veces a aproximadamente 100 veces, aproximadamente 5 veces a aproximadamente 90 veces, aproximadamente 5 veces a aproximadamente 80 veces, aproximadamente 5 veces a aproximadamente 70 veces, aproximadamente 5 veces a aproximadamente 60 veces, aproximadamente 5 veces a aproximadamente 50 veces, aproximadamente 5 veces a aproximadamente 40 veces, aproximadamente 5 veces a aproximadamente 30 veces, aproximadamente 5 veces a aproximadamente 20 veces, aproximadamente 5 veces a aproximadamente 15 veces, aproximadamente 5 veces a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 5 veces a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 5 veces a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 5 veces a aproximadamente 5 veces, aproximadamente 5 veces a aproximadamente 4 veces, aproximadamente 5 veces a aproximadamente 3 veces, aproximadamente 5 veces a aproximadamente 2 veces, aproximadamente 10 veces a aproximadamente 100 veces, aproximadamente 10 veces a aproximadamente 90 veces, aproximadamente 10 veces a aproximadamente 80 veces, aproximadamente 10 veces a aproximadamente 70 veces, aproximadamente 10 veces a aproximadamente 60 veces, aproximadamente 10 veces a aproximadamente 50 veces, aproximadamente 10 veces a aproximadamente 40 veces, aproximadamente 10 veces a aproximadamente 30 veces, aproximadamente 10 veces a aproximadamente 20 veces, aproximadamente 10 veces a aproximadamente 15 veces, aproximadamente 15 veces a aproximadamente 100 veces, aproximadamente 15 veces a aproximadamente 90 veces, aproximadamente 15 veces a aproximadamente 80 veces, aproximadamente 15 veces a aproximadamente 70 veces,

- aproximadamente 65 %, aproximadamente 40 % a aproximadamente 60 %, aproximadamente 40 % a
aproximadamente 55 %, aproximadamente 40 % a aproximadamente 50 %, aproximadamente 40 % a
aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 % a aproximadamente 99 %, aproximadamente 50 % a
aproximadamente 95 %, aproximadamente 50 % a aproximadamente 90 %, aproximadamente 50 % a
5 aproximadamente 85 %, aproximadamente 50 % a aproximadamente 80 %, aproximadamente 50 % a
aproximadamente 75 %, aproximadamente 50 % a aproximadamente 70 %, aproximadamente 50 % a
aproximadamente 65 %, aproximadamente 50 % a aproximadamente 60 %, aproximadamente 50 % a
aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 % a aproximadamente 99 %, aproximadamente 60 % a
aproximadamente 95 %, aproximadamente 60 % a aproximadamente 90 %, aproximadamente 60 % a
10 aproximadamente 85 %, aproximadamente 60 % a aproximadamente 80 %, aproximadamente 60 % a
aproximadamente 75 %, aproximadamente 60 % a aproximadamente 70 %, aproximadamente 60 % a
aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 % a aproximadamente 99 %, aproximadamente 70 % a
aproximadamente 95 %, aproximadamente 70 % a aproximadamente 90 %, aproximadamente 70 % a
aproximadamente 85 %, aproximadamente 70 % a aproximadamente 80 %, aproximadamente 70 % a
15 aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 % a aproximadamente 99 %, aproximadamente 80 % a
aproximadamente 95 %, aproximadamente 80 % a aproximadamente 90 %, aproximadamente 80 % a
aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 % a aproximadamente 99 %, aproximadamente 90 % a
aproximadamente 95 % o aproximadamente 95 % a aproximadamente 99 %) menor que la presencia del analito en
la(s) ubicación(ones) diferente(s).
- 20 En algunas modalidades, se evalúa la presencia de ciertos biomarcadores asociados con un cáncer y/o enfermedad
(por ejemplo, biomarcadores de cáncer de mama en carcinoma ductal) en una ubicación en una muestra de tejido. Si
la presencia de ciertos biomarcadores asociados con un cáncer y/o una enfermedad está por debajo de un valor
umbral para esos biomarcadores, la ubicación en la muestra de tejido se considera "clara". Si la presencia de ciertos
biomarcadores asociados con un cáncer y/o enfermedad está por encima de un valor umbral para esos biomarcadores,
25 la ubicación en la muestra de tejido se considera dentro del margen del tejido a reseca.
- En algunas modalidades, el método comprende además comparar la presencia de uno o más analitos adicionales en
la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del uno o más analitos adicionales en la(s) ubicación(ones)
diferente(s) en la muestra de tejido. En algunas modalidades, la presencia de un total de aproximadamente 1 a
aproximadamente 20 000 (por ejemplo, aproximadamente 1 a aproximadamente 18 000, aproximadamente 1 a
30 aproximadamente 16 000, aproximadamente 1 a aproximadamente 14 000, aproximadamente 1 a aproximadamente
12 000, aproximadamente 1 a aproximadamente 10 000, aproximadamente 1 a aproximadamente 9000,
aproximadamente 1 a aproximadamente 8000, aproximadamente 1 a aproximadamente 7000, aproximadamente 1 a
aproximadamente 6000, aproximadamente 1 a aproximadamente 5000, aproximadamente 1 a aproximadamente
4500, aproximadamente 1 a aproximadamente 4000, aproximadamente 1 a aproximadamente 3500,
35 aproximadamente 1 a aproximadamente 3000, aproximadamente 1 a aproximadamente 2500, aproximadamente 1 a
aproximadamente 2000, aproximadamente 1 a aproximadamente 1500, aproximadamente 1 a aproximadamente
1000, aproximadamente 1 a aproximadamente 800, aproximadamente 1 a aproximadamente 600, aproximadamente
1 a aproximadamente 500, aproximadamente 1 a aproximadamente 400, aproximadamente 1 a aproximadamente
300, aproximadamente 1 a aproximadamente 200, aproximadamente 1 a aproximadamente 100, aproximadamente 1
40 a aproximadamente 50, aproximadamente 1 a aproximadamente 20, aproximadamente 1 a aproximadamente 10,
aproximadamente 1 a aproximadamente 5, aproximadamente 50 a aproximadamente 20 000, aproximadamente 50 a
aproximadamente 18 000, aproximadamente 50 a aproximadamente 16 000, aproximadamente 50 a
aproximadamente 14 000, aproximadamente 50 a aproximadamente 12 000, aproximadamente 50 a
aproximadamente 10 000, aproximadamente 50 a aproximadamente 9000, aproximadamente 50 a aproximadamente
45 8000, aproximadamente 50 a aproximadamente 7000, aproximadamente 50 a aproximadamente 6000,
aproximadamente 50 a aproximadamente 5000, aproximadamente 50 a aproximadamente 4500, aproximadamente
50 a aproximadamente 4000, aproximadamente 50 a aproximadamente 3500, aproximadamente 50 a
aproximadamente 3000, aproximadamente 50 a aproximadamente 2500, aproximadamente 50 a aproximadamente
2000, aproximadamente 50 a aproximadamente 1500, aproximadamente 50 a aproximadamente 1000,
50 aproximadamente 50 a aproximadamente 800, aproximadamente 50 a aproximadamente 600, aproximadamente 50 a
aproximadamente 500, aproximadamente 50 a aproximadamente 400, aproximadamente 50 a aproximadamente 300,
aproximadamente 50 a aproximadamente 200, aproximadamente 50 a aproximadamente 100, aproximadamente 100
a aproximadamente 20 000, aproximadamente 100 a aproximadamente 18 000, aproximadamente 100 a
aproximadamente 16 000, aproximadamente 100 a aproximadamente 14 000, aproximadamente 100 a
55 aproximadamente 12 000, aproximadamente 100 a aproximadamente 10 000, aproximadamente 100 a
aproximadamente 9000, aproximadamente 100 a aproximadamente 8000, aproximadamente 100 a aproximadamente
7000, aproximadamente 100 a aproximadamente 6000, aproximadamente 100 a aproximadamente 5000,
aproximadamente 100 a aproximadamente 4500, aproximadamente 100 a aproximadamente 4000, aproximadamente
100 a aproximadamente 3500, aproximadamente 100 a aproximadamente 3000, aproximadamente 100 a
60 aproximadamente 2500, aproximadamente 100 a aproximadamente 2000, aproximadamente 100 a aproximadamente
1500, aproximadamente 100 a aproximadamente 1000, aproximadamente 100 a aproximadamente 800,
aproximadamente 100 a aproximadamente 600, aproximadamente 100 a aproximadamente 500, aproximadamente
100 a aproximadamente 400, aproximadamente 100 a aproximadamente 300, aproximadamente 100 a
aproximadamente 200, aproximadamente 500 a aproximadamente 20 000, aproximadamente 500 a aproximadamente

18 000, aproximadamente 500 a aproximadamente 16 000, aproximadamente 500 a aproximadamente 14 000, aproximadamente 500 a aproximadamente 12 000, aproximadamente 500 a aproximadamente 10 000, aproximadamente 500 a aproximadamente 9000, aproximadamente 500 a aproximadamente 8000, aproximadamente 500 a aproximadamente 7000, aproximadamente 500 a aproximadamente 6000, aproximadamente 500 a aproximadamente 5000, aproximadamente 500 a aproximadamente 4500, aproximadamente 500 a aproximadamente 4000, aproximadamente 500 a aproximadamente 3500, aproximadamente 500 a aproximadamente 3000, aproximadamente 500 a aproximadamente 2500, aproximadamente 500 a aproximadamente 2000, aproximadamente 500 a aproximadamente 1500, aproximadamente 500 a aproximadamente 1000, aproximadamente 500 a aproximadamente 800, aproximadamente 500 a aproximadamente 600, aproximadamente 1000 a aproximadamente 20 000, aproximadamente 1000 a aproximadamente 18 000, aproximadamente 1000 a aproximadamente 16 000, aproximadamente 1000 a aproximadamente 14 000, aproximadamente 1000 a aproximadamente 12 000, aproximadamente 1000 a aproximadamente 10 000, aproximadamente 1000 a aproximadamente 9000, aproximadamente 1000 a aproximadamente 8000, aproximadamente 1000 a aproximadamente 7000, aproximadamente 1000 a aproximadamente 6000, aproximadamente 1000 a aproximadamente 5000, aproximadamente 1000 a aproximadamente 4500, aproximadamente 1000 a aproximadamente 4000, aproximadamente 1000 a aproximadamente 3500, aproximadamente 1000 a aproximadamente 3000, aproximadamente 1000 a aproximadamente 2500, aproximadamente 1000 a aproximadamente 2000, aproximadamente 1000 a aproximadamente 1500, aproximadamente 1500 a aproximadamente 20 000, aproximadamente 2000 a aproximadamente 20 000, aproximadamente 2000 a aproximadamente 18 000, aproximadamente 2000 a aproximadamente 16 000, aproximadamente 2000 a aproximadamente 14 000, aproximadamente 2000 a aproximadamente 12 000, aproximadamente 2000 a aproximadamente 10 000, aproximadamente 2000 a aproximadamente 9000, aproximadamente 2000 a aproximadamente 8000, aproximadamente 2000 a aproximadamente 7000, aproximadamente 2000 a aproximadamente 6000, aproximadamente 2000 a aproximadamente 5000, aproximadamente 2000 a aproximadamente 4500, aproximadamente 2000 a aproximadamente 4000, aproximadamente 2000 a aproximadamente 3500, aproximadamente 2000 a aproximadamente 3000, aproximadamente 2000 a aproximadamente 2500, aproximadamente 5000 a aproximadamente 20 000, aproximadamente 5000 a aproximadamente 18 000, aproximadamente 5000 a aproximadamente 16 000, aproximadamente 5000 a aproximadamente 14 000, aproximadamente 5000 a aproximadamente 12 000, aproximadamente 5000 a aproximadamente 10 000, aproximadamente 5000 a aproximadamente 9000, aproximadamente 5000 a aproximadamente 8000, aproximadamente 5000 a aproximadamente 7000, aproximadamente 5000 a aproximadamente 6000, aproximadamente 10 000 a aproximadamente 20 000, aproximadamente 10 000 a aproximadamente 18 000, aproximadamente 10 000 a aproximadamente 16 000, aproximadamente 10 000 a aproximadamente 14 000, aproximadamente 10 000 a aproximadamente 12 000, aproximadamente 12 000 a aproximadamente 20 000, aproximadamente 12 000 a aproximadamente 18 000, aproximadamente 12 000 a aproximadamente 16 000, aproximadamente 12 000 a aproximadamente 14 000, aproximadamente 14 000 a aproximadamente 20 000, aproximadamente 14 000 a aproximadamente 18 000, aproximadamente 14 000 a aproximadamente 16 000, aproximadamente 16 000 a aproximadamente 20 000, aproximadamente 16 000 a aproximadamente 18 000, or aproximadamente 18 000 a aproximadamente 20 000) analitos en la ubicación se comparan con la presencia del(de los) analitos en la(s) ubicación(ones) diferente(s).

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, las células mutantes se identifican de acuerdo con la presencia del uno o más analitos en la ubicación en la muestra de tejido. En algunas modalidades, una célula mutante se identifica de acuerdo con la presencia de uno o más biomarcadores descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, una célula mutante se identifica de acuerdo con la presencia de uno o más biomarcadores de la superficie celular, por ejemplo, un receptor de la superficie celular, en la ubicación de la muestra de tejido.

En algunas modalidades, una célula dentro de una ubicación en la muestra de tejido se identifica como una célula mutante si la presencia del uno o más analitos en la ubicación en la muestra de tejido son significativamente diferentes de la presencia del(de los) analito(s) en la(s) ubicación(ones) diferente(s). En algunas modalidades, una célula dentro de una ubicación en la muestra de tejido se identifica como una célula mutante si la presencia del uno o más analitos en la ubicación en la muestra de tejido es significativamente mayor que la presencia del(de los) analito(s) en la(s) ubicación(ones) diferente(s). En algunas modalidades, se determina que la(s) célula(s) mutante(s) dentro de la ubicación en la muestra de tejido se reseca(n) si la presencia del(de los) analito(s) en la ubicación en la muestra de tejido es significativamente menor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s).

En algunas modalidades, una ubicación en la muestra de tejido comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 000 (por ejemplo, aproximadamente 1 a aproximadamente 90 000, aproximadamente 1 a aproximadamente 80 000, aproximadamente 1 a aproximadamente 70 000, aproximadamente 1 a aproximadamente 60 000, aproximadamente 1 a aproximadamente 50 000, aproximadamente 1 a aproximadamente 40 000, aproximadamente 1 a aproximadamente 30 000, aproximadamente 1 a aproximadamente 20 000, aproximadamente 1 a aproximadamente 10 000, aproximadamente 1 a aproximadamente 9000, aproximadamente 1 a aproximadamente 8000, aproximadamente 1 a aproximadamente 7000, aproximadamente 1 a aproximadamente 6000, aproximadamente 1 a aproximadamente 5000, aproximadamente 1 a aproximadamente 4000, aproximadamente 1 a aproximadamente 3000, aproximadamente 1 a aproximadamente 2000, aproximadamente 1 a aproximadamente

1000, aproximadamente 1 a aproximadamente 900, aproximadamente 1 a aproximadamente 800, aproximadamente 1 a aproximadamente 700, aproximadamente 1 a aproximadamente 600, aproximadamente 1 a aproximadamente 500, aproximadamente 1 a aproximadamente 400, aproximadamente 1 a aproximadamente 300, aproximadamente 1 a aproximadamente 200, aproximadamente 1 a aproximadamente 100, aproximadamente 1 a aproximadamente 90, aproximadamente 1 a aproximadamente 80, aproximadamente 1 a aproximadamente 70, aproximadamente 1 a aproximadamente 60, aproximadamente 1 a aproximadamente 50, aproximadamente 1 a aproximadamente 40, aproximadamente 1 a aproximadamente 30, aproximadamente 1 a aproximadamente 20, aproximadamente 1 a aproximadamente 10, aproximadamente 100 a aproximadamente 100 000, aproximadamente 100 a aproximadamente 90 000, aproximadamente 100 a aproximadamente 80 000, aproximadamente 100 a aproximadamente 70 000, aproximadamente 100 a aproximadamente 60 000, aproximadamente 100 a aproximadamente 50 000, aproximadamente 100 a aproximadamente 40 000, aproximadamente 100 a aproximadamente 30 000, aproximadamente 100 a aproximadamente 20 000, aproximadamente 100 a aproximadamente 10 000, aproximadamente 100 a aproximadamente 9000, aproximadamente 100 a aproximadamente 8000, aproximadamente 100 a aproximadamente 7000, aproximadamente 100 a aproximadamente 6000, aproximadamente 100 a aproximadamente 5000, aproximadamente 100 a aproximadamente 4000, aproximadamente 100 a aproximadamente 3000, aproximadamente 100 a aproximadamente 2000, aproximadamente 100 a aproximadamente 1000, aproximadamente 100 a aproximadamente 900, aproximadamente 100 a aproximadamente 800, aproximadamente 100 a aproximadamente 700, aproximadamente 100 a aproximadamente 600, aproximadamente 100 a aproximadamente 500, aproximadamente 100 a aproximadamente 400, aproximadamente 100 a aproximadamente 300, aproximadamente 100 a aproximadamente 200, aproximadamente 1000 a aproximadamente 100 000, aproximadamente 1000 a aproximadamente 90 000, aproximadamente 1000 a aproximadamente 80 000, aproximadamente 1000 a aproximadamente 70 000, aproximadamente 1000 a aproximadamente 60 000, aproximadamente 1000 a aproximadamente 50 000, aproximadamente 1000 a aproximadamente 40 000, aproximadamente 1000 a aproximadamente 30 000, aproximadamente 1000 a aproximadamente 20 000, aproximadamente 1000 a aproximadamente 10 000, aproximadamente 1000 a aproximadamente 9000, aproximadamente 1000 a aproximadamente 8000, aproximadamente 1000 a aproximadamente 7000, aproximadamente 1000 a aproximadamente 6000, aproximadamente 1000 a aproximadamente 5000, aproximadamente 1000 a aproximadamente 4000, aproximadamente 1000 a aproximadamente 3000, aproximadamente 1000 a aproximadamente 2000, 10 000 a aproximadamente 100 000, aproximadamente 10 000 a aproximadamente 90 000, aproximadamente 10 000 a aproximadamente 80 000, aproximadamente 10 000 a aproximadamente 70 000, aproximadamente 10 000 a aproximadamente 60 000, aproximadamente 10000 a aproximadamente 50 000, aproximadamente 10 000 a aproximadamente 40 000, aproximadamente 10 000 a aproximadamente 30 000, aproximadamente 10 000 a aproximadamente 20 000) células.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la muestra de tejido puede obtenerse de cualquier tejido u órgano adecuado del sujeto (por ejemplo, tejido mamario, tejido muscular, tejido glandular, tejido graso o adiposo, tejido nervioso, tejido articular, tejido de ligamentos, tejido de tendones, tejido de boca, tejido de lengua, tejido de glándulas salivales, tejido de glándulas parótidas, tejido de glándulas submandibulares, tejido de glándulas sublinguales, tejido de faringe, tejido de esófago, tejido de estómago, tejido de intestino delgado, tejido de duodeno, tejido de yeyuno, tejido de íleon, tejido de intestino grueso, tejido de hígado, tejido de la vesícula biliar, tejido del mesenterio, tejido de páncreas, tejido del canal anal, tejido del ano, tejido de la cavidad nasal, tejido de la faringe, tejido de la laringe, tejido de la tráquea, tejido de los bronquios, tejido pulmonar, tejido del diafragma, tejido renal, tejido del uréter, tejido de la vejiga, tejido de la uretra, tejido de los ovarios, tejido de las trompas de Falopio, tejido del útero, tejido de la vagina, tejido de la vulva, tejido del clítoris, tejido de los testículos, tejido del epidídimo, tejido del conducto deferente, tejido de las vesículas seminales, tejido de la próstata, tejido de la glándula bulbouretral, tejido del órgano reproductor externo, tejido del pene, tejido del escroto, tejido cerebral, tejido de la glándula pituitaria, tejido de la glándula pineal, tejido de la glándula tiroides, tejido de la glándula paratiroides, tejido de la glándula suprarrenal, tejido del páncreas, tejido del corazón, tejido del foramen oval permeable, tejido arterial, tejido venoso, tejido capilar, tejido de los vasos linfáticos, tejido de los ganglios linfáticos, tejido óseo, tejido del timo, tejido del bazo, tejido linfode asociado al intestino, tejido de las amígdalas, tejido del intersticio, tejido del cerebro, tejido del hemisferio cerebral, tejido del diencefalo, tejido del tronco encefálico, tejido del mesencefalo, tejido de la protuberancia, médula tejido del oblongo, tejido del cerebelo, tejido de la médula espinal, tejido del sistema ventricular, tejido del plexo coroideo, tejido nervioso, tejido del nervio craneal, tejido del nervio espinal, tejido de Anglia, tejido del sistema nervioso entérico, tejido ocular, tejido de la córnea, tejido del iris, tejido del cuerpo ciliar, tejido del cristalino, tejido de la retina, tejido del oído, tejido del oído externo, tejido del lóbulo de la oreja, tejido del tímpano, tejido del oído medio, tejido de los huesecillos, tejido del oído interno, tejido de la cóclea, tejido del vestíbulo, tejido del canal semicircular, tejido del epitelio olfatorio, tejido de la lengua, tejido de las papilas gustativas, tejido de la glándula mamaria, tejido de la piel, tejido subcutáneo y tejido de los conductos mamarios). En algunas modalidades, la muestra de tejido puede incluir o estar cerca en el cuerpo del sujeto a un nervio, un vaso sanguíneo y/o un vaso linfático.

El código de barras espacial de la sonda de captura puede ser cualquier código de barras espacial descrito en la presente descripción.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la matriz puede ser cualquiera de los tipos de matrices descritos en la presente descripción. Por ejemplo, la matriz comprende un portaobjetos. En algunas modalidades, la sonda de captura se une al portaobjetos (por ejemplo, por su extremo 5').

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la matriz es una matriz de perlas. En algunas modalidades, un extremo 5' de la sonda de captura se une a una perla de la matriz de perlas.

5 En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, el método comprende extender un extremo 3' de la sonda de captura mediante el uso del analito específicamente unido o el código de barras del agente de unión al analito como plantilla para generar una sonda de captura extendida.

10 En algunas modalidades, se usan métodos adicionales en combinación con los métodos descritos en la presente descripción para determinar el sitio y el tamaño del tejido a reseca en un sujeto. En algunas modalidades, se usan modalidades de obtención de imágenes médicas tal como la tomografía computarizada (CT) y la obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI) en combinación con los métodos descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, se usa una tomografía por emisión de posición (PET) en combinación con los métodos descritos en la presente descripción. Por ejemplo, puede realizarse una exploración inicial de un paciente con cáncer y/o la obtención de imágenes de una muestra de tejido de un paciente con cáncer mediante el uso de, por ejemplo, MRI, CT y/o PET antes de los métodos descritos en la presente descripción, y una evaluación preliminar del margen quirúrgico. La información inicial puede proporcionar orientación sobre, por ejemplo, dónde obtener la muestra de tejido para usar en los métodos descritos en la presente descripción, el tamaño de la muestra de tejido y/o el número de muestras de tejido necesarias. En otro ejemplo, puede realizarse una exploración y/u obtención de imágenes de seguimiento mediante el uso de, por ejemplo, MRI, CT y/o PET después de realizar los métodos descritos en la presente descripción. La exploración y/u obtención de imágenes de seguimiento proporcionan información sobre, por ejemplo, la eliminación del tejido canceroso y/o enfermo, y si hay tejido canceroso y/o enfermo residual. También puede usarse cualquier otro método adecuado conocido en la técnica en combinación con los métodos descritos en la presente descripción.

15

20

25 En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, al menos una porción del tejido a reseca incluye célula(s) cancerosa(s), célula(s) precancerosa(s), célula(s) necrótica(s), célula(s) infectada(s) y/o tejido enfermo. En algunas modalidades, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 99 % o el 100 % del tejido a reseca incluye una o más células cancerosas, células precancerosas, células necróticas, células infectadas y tejido enfermo.

(b) Métodos de tratamiento de un sujeto mediante resección de tejido

30 También se describen en la presente descripción, pero no forman parte de la invención, métodos para tratar a un sujeto que lo necesita que incluyen: (a) poner en contacto una muestra de tejido obtenida del sujeto con una matriz que comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de las sondas de captura comprenden (i) un dominio de captura que se une específicamente a un analito de la muestra de tejido y (ii) un código de barras espacial; (b) determinar (i) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al analito específicamente unido al dominio de captura o un complemento de la misma, y (ii) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial o un complemento de la misma, y usar las secuencias de ácido nucleico determinadas de (i) y (ii) para identificar la presencia del analito en una ubicación en la muestra de tejido; (c) comparar la presencia del analito en la ubicación de la muestra de tejido con la presencia del analito en una ubicación diferente de la muestra de tejido, y determinar el margen quirúrgico basándose en la comparación; y (d) reseca tejido del sujeto mediante el uso del margen quirúrgico determinado en la etapa (c).

35

40 Un método para tratar a un sujeto, el método comprende: reseca tejido del sujeto mediante el uso de un margen quirúrgico previamente determinado mediante el uso de un método que comprende las etapas de: (a) poner en contacto una muestra de tejido obtenida del sujeto con una matriz que comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende (i) un dominio de captura que se une específicamente a un analito de la muestra de tejido y (ii) un código de barras espacial; (b) determinar (i) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al analito específicamente unido al dominio de captura o un complemento de la misma, y (ii) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial o un complemento de la misma, y usar las secuencias de ácido nucleico determinadas de (i) y (ii) para identificar la presencia del analito en una ubicación en la muestra de tejido; (c) comparar la presencia del analito en la ubicación de la muestra de tejido con la presencia del analito en una ubicación diferente de la muestra de tejido, y determinar el margen quirúrgico basándose en la comparación.

45

50

55 Por ejemplo, cuando un médico practica el método, los datos obtenidos pueden proporcionarle información sobre la ubicación exacta del tejido canceroso o enfermo y, por lo tanto, proporcionarle el margen quirúrgico preciso del tejido a reseca. Mediante el uso de la información del margen quirúrgico preciso proporcionada por el método descrito en la presente descripción, el médico puede lograr, por ejemplo, una resección más completa, para tratar de esta manera al sujeto.

En algunas modalidades, el analito es un ADN o ARN. En algunas modalidades, el analito es una molécula de ARN mensajero (ARNm). En algunas modalidades, el analito es un ADN genómico. En algunas modalidades, el analito comprende una secuencia de longitud completa de un biomarcador descrito en la presente descripción. En algunas modalidades, el analito comprende un fragmento de la secuencia de un biomarcador descrito en la presente

descripción. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, cada una de la pluralidad de sondas de captura comprende (i) un dominio de captura que se une específicamente a un analito de la muestra de tejido y (ii) un código de barras espacial. La sonda de captura puede ser cualquier sonda de captura descrita en la presente descripción. En algunas modalidades, el dominio de captura de la sonda de captura comprende una secuencia que es sustancialmente complementaria (por ejemplo, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % complementaria) a una porción de la secuencia del analito de la muestra de tejido. En algunas modalidades, el dominio de captura puede tener un total de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 125 nucleótidos (o cualquiera de los subintervalos de este intervalo descrito en la presente descripción). En algunas modalidades, la secuencia que es sustancialmente complementaria a una porción de la secuencia del analito puede ser una secuencia aleatoria. En algunas modalidades, la secuencia que es sustancialmente complementaria a una porción de la secuencia del analito puede incluir una secuencia de oligonucleótidos poli(T) (por ejemplo, al menos 5 T contiguas, al menos 10 T contiguas o al menos 15 T contiguas).

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la etapa (b) comprende secuenciar (i) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al analito específicamente unido al dominio de captura o un complemento del mismo, y (ii) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial o un complemento del mismo. En algunas modalidades, la secuenciación es secuenciación de alto rendimiento, secuenciación por hibridación o cualquiera de los otros métodos de secuenciación descritos en la presente descripción o conocidos en la técnica. Por ejemplo, la secuenciación puede implicar uno o más de amplificación de ácido nucleico, la ligazón o adición de uno o más adaptadores de secuenciación, escisión de la sonda de captura de la matriz, extensión de la sonda de captura mediante el uso del ADNc unido como plantilla, y generación de un ácido nucleico de hebra única que comprende una secuencia que es complementaria a toda o parte de la sonda de captura extendida. Los métodos no limitantes para determinar la secuencia de (i) toda o una parte de la secuencia del ácido nucleico diana, o un complemento de la misma, o (ii) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial, o un complemento de la misma, se describen en la presente descripción o son conocidos en la técnica.

También se describen en la presente descripción, pero no forman parte de la invención, métodos para tratar a un sujeto que incluyen: (a) poner en contacto una muestra de tejido obtenida del sujeto con una pluralidad de agentes de captura del analito, en donde un agente de captura del analito de la pluralidad de agentes de captura del analito comprende un código de barras del resto de unión al analito, una secuencia de captura del analito y un resto de unión al analito que se une específicamente a un analito; (b) disponer la muestra de tejido en una matriz, en donde la matriz comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende un código de barras espacial y un dominio de captura que se une específicamente a la secuencia de captura del analito; (c) determinar (i) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras del resto de unión al analito o un complemento de la misma, y (ii) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial o un complemento de la misma y usar las secuencias de ácido nucleico determinadas de (i) y (ii) para identificar la presencia del analito en una ubicación en la muestra de tejido; (d) comparar la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del analito en ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido, y determinar el margen quirúrgico basándose en la comparación; y (e) reseca tejido del sujeto mediante el uso del margen quirúrgico determinado en la etapa (d).

También se describen en la presente descripción, pero no forman parte de la invención, métodos para tratar a un sujeto, el método comprende: reseca tejido del sujeto mediante el uso de un margen quirúrgico previamente determinado mediante el uso de un método que comprende las etapas de: (a) poner en contacto una muestra de tejido obtenida del sujeto con una pluralidad de agentes de captura del analito, en donde un agente de captura del analito de la pluralidad de agentes de captura del analito comprende un código de barras del resto de unión al analito, una secuencia de captura del analito y un resto de unión al analito que se une específicamente a un analito; (b) disponer la muestra de tejido en una matriz, en donde la matriz comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende un código de barras espacial y un dominio de captura que se une específicamente a la secuencia de captura del analito; (c) determinar (i) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras del resto de unión al analito o un complemento de la misma, y (ii) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial o un complemento de la misma y usar las secuencias de ácido nucleico determinadas de (i) y (ii) para identificar la presencia del analito en una ubicación en la muestra de tejido; (d) comparar la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del analito en ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido, y determinar el margen quirúrgico basándose en la comparación.

En algunas modalidades, el analito es una proteína. En algunas modalidades, el analito es una proteína de longitud completa. En algunas modalidades, el analito es un fragmento de una proteína. En algunas modalidades, el analito es un subproducto de una proteína. En algunas modalidades, la proteína es cualquiera de los biomarcadores de cáncer ilustrativos descritos en la presente descripción.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, cada uno de la pluralidad de agentes de captura del analito comprende un código de barras del resto de unión al analito, una secuencia de captura del analito y un resto de unión al analito que se une específicamente a un analito. En algunas modalidades, el resto de unión al analito es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno (por ejemplo, un Fab).

También puede usarse como resto de unión al analito cualquier otro resto de unión a proteínas adecuado conocido en la técnica. En algunas modalidades, el código de barras del resto de unión al analito puede ser cualquier código de barras descrito en la presente descripción. En algunas modalidades, la secuencia de captura del analito puede ser cualquier secuencia de captura del analito descrita en la presente descripción. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, cada una de la pluralidad de sondas de captura comprende un código de barras espacial y un dominio de captura que se une específicamente a la secuencia de captura del analito. La sonda de captura puede ser cualquier sonda de captura descrita en la presente descripción. En algunas modalidades, el dominio de captura de la sonda de captura comprende una secuencia que es sustancialmente complementaria (por ejemplo, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % complementaria) a una porción de la secuencia de captura del analito. En algunas modalidades, el dominio de captura puede tener un total de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 125 nucleótidos (o cualquiera de los subintervalos de este intervalo descrito en la presente descripción). En algunas modalidades, la secuencia que es sustancialmente complementaria a una porción de la secuencia de captura del analito puede ser una secuencia aleatoria. En algunas modalidades, la secuencia que es sustancialmente complementaria a una porción de la secuencia de captura del analito puede incluir una secuencia de oligonucleótidos poli(T) (por ejemplo, al menos 5 T contiguas, al menos 10 T contiguas o al menos 15 T contiguas).

En algunas modalidades, la determinación de la secuencia se realiza mediante secuenciación. En algunas modalidades, la secuenciación es secuenciación de alto rendimiento, secuenciación por hibridación o cualquiera de los otros métodos de secuenciación descritos en la presente descripción o conocidos en la técnica. Por ejemplo, la secuenciación puede implicar uno o más de amplificación de ácido nucleico, la ligazón o adición de uno o más adaptadores de secuenciación, escisión de la sonda de captura de la matriz, extensión de la sonda de captura mediante el uso de la secuencia de captura del analito unida como plantilla, y generar un ácido nucleico de hebra única que comprende una secuencia que es complementaria a toda o parte de la sonda de captura extendida. Los métodos no limitantes para determinar la secuencia de (i) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras del resto de unión al analito, o un complemento de la misma, o (ii) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial, o un complemento de la misma, se describen en la presente descripción o son conocidos en la técnica.

En algunas modalidades, el tejido resecado es o comprende un tumor (por ejemplo, un tumor maligno o benigno). En algunas modalidades, el tumor es un tumor sólido. En algunas modalidades, se sospecha que el sujeto tiene cáncer. En algunas modalidades, el sujeto se ha diagnosticado o identificado previamente con un cáncer (por ejemplo, cualquiera de los cánceres ilustrativos descritos en la presente descripción).

En algunas modalidades, el tejido resecado puede incluir un tumor (por ejemplo, un tumor maligno) de cualquiera de los tipos de cáncer descritos en la presente descripción.

En algunas modalidades, el analito es un biomarcador tumoral. En algunas modalidades, el analito es un antígeno tumoral. Los antígenos tumorales ilustrativos incluyen, pero sin limitarse a, cualquiera de los antígenos tumorales ilustrativos descritos en la presente descripción.

En algunas modalidades, el tejido resecado es o comprende un tejido infectado, un tejido necrótico o un tejido enfermo. En algunas modalidades, el analito puede estar asociado con una infección, necrosis, inflamación o enfermedad. En la técnica se conocen ejemplos no limitantes de dichos analitos.

En algunas modalidades, el tejido resecado está infectado por una bacteria (por ejemplo, cualquiera de las bacterias ilustrativas descritas en la presente descripción), un parásito o protozoos (por ejemplo, cualquiera de los parásitos o protozoos ilustrativos descritos en la presente descripción), un hongo (por ejemplo, cualquiera de los hongos ilustrativos descritos en la presente descripción), o un virus (por ejemplo, cualquiera de los virus ilustrativos descritos en la presente descripción).

En algunas modalidades, los métodos proporcionados en la presente descripción comprenden comparar la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del analito en ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido, y determinar el tamaño y el sitio de un tejido a resecar del sujeto basándose en la comparación. En algunas modalidades, la(s) ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido es/son ubicación(ones) de referencia. En algunas modalidades, la(s) ubicación(ones) de referencia en la muestra de tejido es/son ubicaciones de tejido sano. En algunas modalidades, la(s) ubicación(ones) de referencia en la muestra de tejido es/son ubicaciones de tejido no canceroso. En algunas modalidades, la(s) ubicación(ones) de referencia en la muestra de tejido es/son ubicaciones de tejido no tumoral. En algunas modalidades, la(s) ubicación(ones) de referencia en la muestra de tejido es/son ubicaciones sin anomalías tales como tumor, cáncer, necrosis, inflamación, infección o enfermedad.

En algunas modalidades, la presencia del analito en la ubicación de la muestra de tejido es significativamente diferente de la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s) en el tejido. En algunas modalidades, la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido es significativamente mayor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s) de la muestra de tejido. En algunas modalidades, la presencia del analito en la ubicación de la muestra de tejido es significativamente menor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido.

- 5 En algunas modalidades, se determina que la ubicación en la muestra de tejido se reseca si la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido es significativamente diferente de la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s). En algunas modalidades, se determina que la ubicación en la muestra de tejido se reseca si la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido es significativamente mayor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s). En algunas modalidades, se determina que la ubicación en la muestra de tejido se reseca si la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido es significativamente menor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s).
- 10 En algunas modalidades, la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido es aproximadamente 0,1 veces a aproximadamente 100 veces (por ejemplo, o cualquiera de los subintervalos de este intervalo descritos en la presente descripción) mayor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s).
- En algunas modalidades, la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido es aproximadamente 1 % a aproximadamente 99 % (por ejemplo, o cualquiera de los subintervalos de este intervalo descritos en la presente descripción) menor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s).
- 15 En algunas modalidades, se evalúa la presencia de ciertos biomarcadores asociados con un cáncer y/o enfermedad (por ejemplo, biomarcadores de cáncer de mama en carcinoma ductal) en una ubicación en una muestra de tejido. Si la presencia de ciertos biomarcadores asociados con un cáncer y/o una enfermedad está por debajo de un valor umbral para esos biomarcadores, la ubicación en la muestra de tejido se considera "clara". Si la presencia de ciertos biomarcadores asociados con un cáncer y/o enfermedad está por encima de un valor umbral para esos biomarcadores, la ubicación en la muestra de tejido se considera dentro del margen del tejido a reseca.
- 20 En algunas modalidades, el método comprende además comparar la presencia de uno o más analitos adicionales en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del uno o más analitos adicionales en la(s) ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido. En algunas modalidades, la presencia de un total de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 000 (por ejemplo, o cualquiera de los subintervalos de este intervalo descritos en la presente descripción) analitos en la ubicación se compara con la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s).
- 25 En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, las células mutantes se identifican de acuerdo con la presencia del uno o más analitos en la ubicación en la muestra de tejido. En algunas modalidades, una célula mutante se identifica de acuerdo con la presencia de uno o más biomarcadores descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, una célula mutante se identifica de acuerdo con la presencia de uno o más biomarcadores de superficie celular, por ejemplo, un receptor de superficie celular, en la ubicación en la muestra de tejido.
- 30 En algunas modalidades, una célula dentro de una ubicación en la muestra de tejido se identifica como una célula mutante si la presencia del uno o más analitos en la ubicación en la muestra de tejido son significativamente diferentes de la presencia del(de los) analito(s) en la(s) ubicación(ones) diferente(s). En algunas modalidades, una célula dentro de una ubicación en la muestra de tejido se identifica como una célula mutante si la presencia del uno o más analitos en la ubicación en la muestra de tejido es significativamente mayor que la presencia del(de los) analito(s) en la(s) ubicación(ones) diferente(s). En algunas modalidades, se determina que la(s) célula(s) mutante(s) dentro de la ubicación en la muestra de tejido se reseca(n) si la presencia del(de los) analito(s) en la ubicación en la muestra de tejido es significativamente menor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s).
- 35 En algunas modalidades, una ubicación en la muestra de tejido comprende aproximadamente 1 a aproximadamente 100 000 células.
- 40 El código de barras espacial de la sonda de captura puede ser cualquier código de barras espacial descrito en la presente descripción.
- En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la matriz puede ser cualquiera de los tipos de matrices descritos en la presente descripción. Por ejemplo, la matriz comprende un portaobjetos. En algunas modalidades, la sonda de captura se une al portaobjetos (por ejemplo, por su extremo 5').
- 45 En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la matriz es una matriz de perlas. En algunas modalidades, un extremo 5' de la sonda de captura se une a una perla de la matriz de perlas.
- En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, el método comprende extender un extremo 3' de la sonda de captura mediante el uso del analito específicamente unido o el código de barras del agente de unión al analito como plantilla para generar una sonda de captura extendida.
- 50 En algunas modalidades, se usan métodos adicionales en combinación con los métodos descritos en la presente descripción para determinar el sitio y el tamaño del tejido a reseca en un sujeto. En algunas modalidades, se usan modalidades de obtención de imágenes médicas tal como la tomografía computarizada (CT) y la obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI) en combinación con los métodos descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, se usa una tomografía por emisión de positrones (PET) en combinación con los métodos descritos en la presente descripción. Por ejemplo, puede realizarse una exploración inicial de un paciente con cáncer y/o la
- 55

obtención de imágenes de una muestra de tejido de un paciente con cáncer mediante el uso de, por ejemplo, MRI, CT y/o PET antes de los métodos descritos en la presente descripción, y una evaluación preliminar del margen quirúrgico. La información inicial puede proporcionar orientación sobre, por ejemplo, dónde obtener la muestra de tejido para usar en los métodos descritos en la presente descripción, el tamaño de la muestra de tejido y/o el número de muestras de tejido necesarias. En otro ejemplo, puede realizarse una exploración y/u obtención de imágenes de seguimiento mediante el uso de, por ejemplo, MRI, CT y/o PET después de realizar los métodos descritos en la presente descripción. La exploración y/u obtención de imágenes de seguimiento proporcionan información sobre, por ejemplo, la eliminación del tejido canceroso y/o enfermo, y si hay tejido canceroso y/o enfermo residual. También puede usarse cualquier otro método adecuado conocido en la técnica en combinación con los métodos descritos en la presente descripción.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, al menos una porción del tejido resecado incluye célula(s) cancerosa(s), célula(s) precancerosa(s), célula(s) necrótica(s), célula(s) infectada(s) y/o tejido enfermo. En algunas modalidades, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 99 % o el 100 % del tejido resecado incluye una o más células cancerosas, células precancerosas, células necróticas, células infectadas y tejido enfermo.

En algunas modalidades, la resección de tejido se considera exitosa cuando hay menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 %, menos del 5 % o cero célula(s) cancerosa(s), célula(s) precancerosa(s), célula(s) necróticas(s), célula(s) infectada(s) y/o tejido enfermo se detectan después de la resección en comparación con la(s) célula(s) cancerosa(s), célula(s) precancerosa(s), célula(s) necrótica(s), célula(s) infectada(s) y/o tejido enfermo identificado(s) antes de la resección.

En algunas modalidades, el tratamiento se considera exitoso cuando menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 %, menos del 5 % o cero célula(s) cancerosa(s), célula(s) precancerosa(s), célula(s) necrótica(s), célula(s) infectada(s) y/o tejido enfermo se detectan después de la resección en comparación con la(s) célula(s) cancerosa(s), célula(s) precancerosa(s), célula(s) necrótica(s), célula(s) infectada(s) y/o tejido enfermo identificado(s) antes de la resección.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, el margen quirúrgico puede ser el margen entre la(s) ubicación(ones) de una o más de células cancerosas, células precancerosas, células necróticas, células infectadas y tejido enfermo, y la(s) ubicación(ones) de tejido sano o normal, en un sujeto.

(c) Métodos para identificar un margen quirúrgico de un tejido a extirpar

En la presente descripción se proporcionan métodos para identificar un margen quirúrgico de un tejido a reseca en un sujeto, el método comprende: (a) poner en contacto una muestra de tejido obtenida del sujeto con una matriz que comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende (i) un dominio de captura que se une específicamente a un analito de la muestra de tejido y (ii) un código de barras espacial; (b) determinar (i) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al analito específicamente unido al dominio de captura o un complemento de la misma, y (ii) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial o un complemento de la misma, y usar las secuencias de ácido nucleico determinadas de (i) y (ii) para identificar la presencia del analito en una ubicación en la muestra de tejido; (c) comparar la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del analito en ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido, y determinar un margen quirúrgico de un tejido a reseca del sujeto basándose en la comparación. En algunas modalidades, el analito es un ADN o ARN. En algunas modalidades, el analito es una molécula de ARN mensajero (ARNm). En algunas modalidades, el analito es un ADN genómico. En algunas modalidades, el analito comprende una secuencia de longitud completa de un biomarcador descrito en la presente descripción. En algunas modalidades, el analito comprende un fragmento de la secuencia de un biomarcador descrito en la presente descripción. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, cada una de la pluralidad de sondas de captura comprende (i) un dominio de captura que se une específicamente a un analito de la muestra de tejido y (ii) un código de barras espacial. La sonda de captura puede ser cualquier sonda de captura descrita en la presente descripción. En algunas modalidades, el dominio de captura de la sonda de captura comprende una secuencia que es sustancialmente complementaria (por ejemplo, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % complementaria) a una porción de la secuencia del analito de la muestra de tejido. En algunas modalidades, el dominio de captura puede tener un total de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 125 nucleótidos (o cualquiera de los subintervalos de este intervalo descrito en la presente descripción). En algunas modalidades, la secuencia que es sustancialmente complementaria a una porción de la secuencia del analito puede ser una secuencia aleatoria. En algunas modalidades, la secuencia que es sustancialmente complementaria a una porción de la secuencia del analito puede incluir una secuencia de oligonucleótidos poli(T) (por ejemplo, al menos 5 T contiguas, al menos 10 T contiguas o al menos 15 T contiguas).

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la etapa (b) comprende secuenciar (i) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al analito específicamente unido al dominio de captura o un complemento del mismo, y (ii) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial o un complemento del mismo. En algunas modalidades, la secuenciación es secuenciación de alto rendimiento, secuenciación por hibridación o cualquiera de los otros métodos de

secuenciación descritos en la presente descripción o conocidos en la técnica. Por ejemplo, la secuenciación puede implicar uno o más de amplificación de ácido nucleico, la ligazón o adición de uno o más adaptadores de secuenciación, escisión de la sonda de captura de la matriz, extensión de la sonda de captura mediante el uso del ADNc unido como plantilla, y generación de un ácido nucleico de hebra única que comprende una secuencia que es complementaria a toda o parte de la sonda de captura extendida. Los métodos no limitantes para determinar la secuencia de (i) toda o una parte de la secuencia del ácido nucleico diana, o un complemento de la misma, o (ii) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial, o un complemento de la misma, se describen en la presente descripción o son conocidos en la técnica.

En la presente descripción se proporcionan métodos para identificar un margen quirúrgico de un tejido a resecar en un sujeto que incluyen: (a) poner en contacto una muestra de tejido obtenida del sujeto con una pluralidad de agentes de captura del analito, donde un agente de captura del analito de la pluralidad de agentes de captura del analito comprende un código de barras del resto de unión al analito, una secuencia de captura del analito y un resto de unión al analito que se une específicamente a un analito; (b) disponer la muestra de tejido en una matriz, en donde la matriz comprende una pluralidad de sondas de captura, donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende un código de barras espacial y un dominio de captura que se une específicamente a la secuencia de captura del analito; (c) determinar (i) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras del resto de unión al analito o un complemento de la misma, y (ii) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial o un complemento de la misma y usar las secuencias de ácido nucleico determinadas de (i) y (ii) para identificar la presencia del analito en una ubicación en la muestra de tejido; (d) comparar la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del analito en ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido, y determinar un margen quirúrgico de un tejido a resecar del sujeto basándose en la comparación. En algunas modalidades, el analito es una proteína. En algunas modalidades, el analito es una proteína de longitud completa. En algunas modalidades, el analito es un fragmento de una proteína. En algunas modalidades, el analito es un subproducto de una proteína. En algunas modalidades, la proteína es cualquiera de los biomarcadores de cáncer ilustrativos descritos en la presente descripción.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, cada uno de la pluralidad de agentes de captura del analito comprende un código de barras del resto de unión al analito, una secuencia de captura del analito y un resto de unión al analito que se une específicamente a un analito. En algunas modalidades, el resto de unión al analito es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno (por ejemplo, un Fab). También puede usarse como resto de unión al analito cualquier otro resto de unión a proteínas adecuado conocido en la técnica. En algunas modalidades, el código de barras del resto de unión al analito puede ser cualquier código de barras descrito en la presente descripción. En algunas modalidades, la secuencia de captura del analito puede ser cualquier secuencia de captura del analito descrita en la presente descripción. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, cada una de la pluralidad de sondas de captura comprende un código de barras espacial y un dominio de captura que se une específicamente a la secuencia de captura del analito. La sonda de captura puede ser cualquier sonda de captura descrita en la presente descripción. En algunas modalidades, el dominio de captura de la sonda de captura comprende una secuencia que es sustancialmente complementaria (por ejemplo, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % complementaria) a una porción de la secuencia de captura del analito. En algunas modalidades, el dominio de captura puede tener un total de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 125 nucleótidos (o cualquiera de los subintervalos de este intervalo descrito en la presente descripción). En algunas modalidades, la secuencia que es sustancialmente complementaria a una porción de la secuencia de captura del analito puede ser una secuencia aleatoria. En algunas modalidades, la secuencia que es sustancialmente complementaria a una porción de la secuencia de captura del analito puede incluir una secuencia de oligonucleótidos poli(T) (por ejemplo, al menos 5 T contiguas, al menos 10 T contiguas o al menos 15 T contiguas).

En algunas modalidades, la determinación de la secuencia se realiza mediante secuenciación. En algunas modalidades, la secuenciación es secuenciación de alto rendimiento, secuenciación por hibridación, secuenciación por ligazón o cualquiera de los otros métodos de secuenciación descritos en la presente descripción o conocidos en la técnica. Por ejemplo, la secuenciación puede implicar uno o más de amplificación de ácido nucleico, la ligazón o adición de uno o más adaptadores de secuenciación, escisión de la sonda de captura de la matriz, extensión de la sonda de captura mediante el uso de la secuencia de captura del analito unida como plantilla, y generar un ácido nucleico de hebra única que comprende una secuencia que es complementaria a toda o parte de la sonda de captura extendida. Los métodos no limitantes para determinar la secuencia de (i) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras del resto de unión al analito, o un complemento de la misma, o (ii) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial, o un complemento de la misma, se describen en la presente descripción o son conocidos en la técnica.

En algunas modalidades, el tejido a resecar es o comprende un tumor (por ejemplo, un tumor maligno o benigno). En algunas modalidades, el tumor es un tumor sólido. En algunas modalidades, se sospecha que el sujeto tiene cáncer. En algunas modalidades, el sujeto se ha diagnosticado o identificado previamente con un cáncer (por ejemplo, cualquiera de los cánceres ilustrativos descritos en la presente descripción).

En algunas modalidades, el tejido a resecar puede incluir un tumor (por ejemplo, un tumor maligno) de cualquiera de los tipos de cáncer descritos en la presente descripción.

En algunas modalidades, el analito es un biomarcador tumoral. En algunas modalidades, el analito es un antígeno tumoral. Los antígenos tumorales ilustrativos incluyen, pero sin limitarse a, cualquiera de los antígenos tumorales ilustrativos descritos en la presente descripción.

5 En algunas modalidades, el tejido a resecar es o comprende un tejido infectado, un tejido necrótico o un tejido enfermo. En algunas modalidades, el analito puede estar asociado con una infección, necrosis, inflamación o enfermedad. En la técnica se conocen ejemplos no limitantes de dichos analitos.

10 En algunas modalidades, el tejido a resecar está infectado por una bacteria (por ejemplo, cualquiera de las bacterias ilustrativas descritas en la presente descripción), un parásito o protozoos (por ejemplo, cualquiera de los parásitos o protozoos ilustrativos descritos en la presente descripción), un hongo (por ejemplo, cualquier de los hongos ilustrativos descritos en la presente descripción), o un virus (por ejemplo, cualquiera de los virus ilustrativos descritos en la presente descripción).

15 En algunas modalidades, los métodos proporcionados en la presente descripción comprenden comparar la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del analito en ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido, y determinar el tamaño y el sitio de un tejido a resecar del sujeto basándose en la comparación. En algunas modalidades, la(s) ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido es/son ubicación(ones) de referencia. En algunas modalidades, la(s) ubicación(ones) de referencia en la muestra de tejido es/son ubicaciones de tejido sano. En algunas modalidades, la(s) ubicación(ones) de referencia en la muestra de tejido es/son ubicaciones de tejido no canceroso. En algunas modalidades, la(s) ubicación(ones) de referencia en la muestra de tejido es/son ubicaciones de tejido no tumoral. En algunas modalidades, la(s) ubicación(ones) de referencia en la muestra de tejido es/son ubicaciones de tejido no tumoral. En algunas modalidades, la(s) ubicación(ones) de referencia en la muestra de tejido es/son ubicaciones sin anomalías tales como tumor, cáncer, necrosis, inflamación, infección o enfermedad.

20 En algunas modalidades, la presencia del analito en la ubicación de la muestra de tejido es significativamente diferente de la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s) en el tejido. En algunas modalidades, la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido es significativamente mayor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s) de la muestra de tejido. En algunas modalidades, la presencia del analito en la ubicación de la muestra de tejido es significativamente menor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido.

25 En algunas modalidades, se determina que la ubicación en la muestra de tejido se reseca si la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido es significativamente diferente de la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s). En algunas modalidades, se determina que la ubicación en la muestra de tejido se reseca si la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido es significativamente mayor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s). En algunas modalidades, se determina que la ubicación en la muestra de tejido se reseca si la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido es significativamente menor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s).

30 En algunas modalidades, la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido es aproximadamente 0,1 veces a aproximadamente 100 veces (por ejemplo, o cualquiera de los subintervalos de este intervalo descritos en la presente descripción) mayor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s).

35 En algunas modalidades, la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido es aproximadamente 1 % a aproximadamente 99 % (por ejemplo, o cualquiera de los subintervalos de este intervalo descritos en la presente descripción) menor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s).

40 En algunas modalidades, se evalúa la presencia de ciertos biomarcadores asociados con un cáncer y/o enfermedad (por ejemplo, biomarcadores de cáncer de mama en carcinoma ductal) en una ubicación en una muestra de tejido. Si la presencia de ciertos biomarcadores asociados con un cáncer y/o una enfermedad está por debajo de un valor umbral para esos biomarcadores, la ubicación en la muestra de tejido se considera "clara". Si la presencia de ciertos biomarcadores asociados con un cáncer y/o enfermedad está por encima de un valor umbral para esos biomarcadores, la ubicación en la muestra de tejido se considera dentro del margen del tejido a resecar.

45 En algunas modalidades, el método comprende además comparar la presencia de uno o más analitos adicionales en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del uno o más analitos adicionales en la(s) ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido. En algunas modalidades, la presencia de un total de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 000 (por ejemplo, o cualquiera de los subintervalos de este intervalo descritos en la presente descripción) analitos en la ubicación se compara con la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s).

50 En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, las células mutantes se identifican de acuerdo con la presencia del uno o más analitos en la ubicación en la muestra de tejido. En algunas modalidades, una célula mutante se identifica de acuerdo con la presencia de uno o más biomarcadores descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, una célula mutante se identifica de acuerdo con la presencia de uno o más biomarcadores de superficie celular, por ejemplo, un receptor de superficie celular, en la ubicación en la muestra de tejido.

- En algunas modalidades, una célula dentro de una ubicación en la muestra de tejido se identifica como una célula mutante si la presencia del uno o más analitos en la ubicación en la muestra de tejido son significativamente diferentes de la presencia del(de los) analito(s) en la(s) ubicación(ones) diferente(s). En algunas modalidades, una célula dentro de una ubicación en la muestra de tejido se identifica como una célula mutante si la presencia del uno o más analitos en la ubicación en la muestra de tejido es significativamente mayor que la presencia del(de los) analito(s) en la(s) ubicación(ones) diferente(s). En algunas modalidades, se determina que la(s) célula(s) mutante(s) dentro de la ubicación en la muestra de tejido se reseca(n) si la presencia del(de los) analito(s) en la ubicación en la muestra de tejido es significativamente menor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s).
- En algunas modalidades, una ubicación en la muestra de tejido comprende aproximadamente 1 a aproximadamente 100 000 células.
- El código de barras espacial de la sonda de captura puede ser cualquier código de barras espacial descrito en la presente descripción.
- En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la matriz puede ser cualquiera de los tipos de matrices descritos en la presente descripción. Por ejemplo, la matriz comprende un portaobjetos. En algunas modalidades, la sonda de captura se une al portaobjetos (por ejemplo, por su extremo 5').
- En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la matriz es una matriz de perlas. En algunas modalidades, un extremo 5' de la sonda de captura se une a una perla de la matriz de perlas.
- En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, el método comprende extender un extremo 3' de la sonda de captura mediante el uso del analito específicamente unido o el código de barras del agente de unión al analito como plantilla para generar una sonda de captura extendida.
- En algunas modalidades, se usan métodos adicionales en combinación con los métodos descritos en la presente descripción para determinar el sitio y el tamaño del tejido a resecar en un sujeto. En algunas modalidades, se usan modalidades de obtención de imágenes médicas tal como la tomografía computarizada (CT) y la obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI) en combinación con los métodos descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, se usa una tomografía por emisión de positrones (PET) en combinación con los métodos descritos en la presente descripción. Por ejemplo, puede realizarse una exploración inicial de un paciente con cáncer y/o la obtención de imágenes de una muestra de tejido de un paciente con cáncer mediante el uso de, por ejemplo, MRI, CT y/o PET antes de los métodos descritos en la presente descripción, y una evaluación preliminar del margen quirúrgico. La información inicial puede proporcionar orientación sobre, por ejemplo, dónde obtener la muestra de tejido para usar en los métodos descritos en la presente descripción, el tamaño de la muestra de tejido y/o el número de muestras de tejido necesarias. En otro ejemplo, puede realizarse una exploración y/u obtención de imágenes de seguimiento mediante el uso de, por ejemplo, MRI, CT y/o PET después de realizar los métodos descritos en la presente descripción. La exploración y/u obtención de imágenes de seguimiento proporcionan información sobre, por ejemplo, la eliminación del tejido canceroso y/o enfermo, y si hay tejido canceroso y/o enfermo residual. También puede usarse cualquier otro método adecuado conocido en la técnica en combinación con los métodos descritos en la presente descripción.
- En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, al menos una porción del tejido a resecar incluye célula(s) cancerosa(s), célula(s) precancerosa(s), célula(s) necrótica(s), célula(s) infectada(s) y/o tejido enfermo. En algunas modalidades, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 99 % o el 100 % del tejido a resecar incluye una o más células cancerosas, células precancerosas, células necróticas, células infectadas y tejido enfermo.
- En algunas modalidades, la resección de tejido se considera exitosa cuando hay menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 %, menos del 5 % o cero célula(s) cancerosa(s), célula(s) precancerosa(s), célula(s) necróticas(s), célula(s) infectada(s) y/o tejido enfermo se detectan después de la resección en comparación con la(s) célula(s) cancerosa(s), célula(s) precancerosa(s), célula(s) necrótica(s), célula(s) infectada(s) y/o tejido enfermo identificado(s) antes de la resección.
- En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, el margen quirúrgico puede ser el margen entre la(s) ubicación(ones) de una o más de células cancerosas, células precancerosas, células necróticas, células infectadas y tejido enfermo, y la(s) ubicación(ones) de tejido sano o normal, en un sujeto.
- (d) Métodos para reducir el riesgo de nueva extirpación de un tejido
- También se describen en la presente descripción, pero no forman parte de la invención, métodos para reducir el riesgo de nueva extirpación de un tejido de un sujeto que incluyen: (a) poner en contacto una muestra de tejido obtenida del sujeto con una matriz que comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende un (i) dominio de captura que se une específicamente a un analito de la muestra de tejido y (ii) un código de barras espacial; (b) determinar (i) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al analito específicamente unido al dominio de captura o un complemento de la misma, y (ii) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial o un complemento

de la misma, y usar las secuencias de ácido nucleico determinadas de (i) y (ii) para identificar la presencia del analito en una ubicación en la muestra de tejido; (c) comparar la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del analito en ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido, y determinar el margen quirúrgico basándose en la comparación y (d) reseca tejido del sujeto mediante el uso del margen quirúrgico determinado en la etapa (c), en donde el método da como resultado una reducción en el riesgo de una futura nueva extirpación del tejido en el sujeto.

También se describen en la presente descripción, pero no forman parte de la invención, métodos para reducir el riesgo de una nueva extirpación de un tejido de un sujeto, el método comprende: reseca tejido del sujeto mediante el uso de un margen quirúrgico previamente determinado mediante el uso de un método que comprende las etapas de: (a) poner en contacto una muestra de tejido obtenida del sujeto con una matriz que comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende un (i) dominio de captura que se une específicamente a un analito de la muestra de tejido y (ii) un código de barras espacial; (b) determinar (i) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al analito específicamente unido al dominio de captura o un complemento de la misma, y (ii) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial o un complemento de la misma, y usar las secuencias de ácido nucleico determinadas de (i) y (ii) para identificar la presencia del analito en una ubicación en la muestra de tejido; (c) comparar la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del analito en ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido, y determinar el margen quirúrgico basándose en la comparación.

Por ejemplo, cuando un médico pone en práctica el método, los datos obtenidos pueden proporcionarle orientación sobre dónde reseca los márgenes del tejido, para reducir de esta manera la probabilidad de que pueda ser necesaria una resección adicional; el médico tendrá más confianza a la hora de capturar los márgenes de tejido para una resección más completa. En algunas modalidades, el analito es un ADN o ARN. En algunas modalidades, el analito es una molécula de ARN mensajero (ARNm). En algunas modalidades, el analito es un ADN genómico. En algunas modalidades, el analito comprende una secuencia de longitud completa de un biomarcador descrito en la presente descripción. En algunas modalidades, el analito comprende un fragmento de la secuencia de un biomarcador descrito en la presente descripción. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, cada una de la pluralidad de sondas de captura comprende (i) un dominio de captura que se une específicamente a un analito de la muestra de tejido y (ii) un código de barras espacial. La sonda de captura puede ser cualquier sonda de captura descrita en la presente descripción. En algunas modalidades, el dominio de captura de la sonda de captura comprende una secuencia que es sustancialmente complementaria (por ejemplo, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % complementaria) a una porción de la secuencia del analito de la muestra de tejido. En algunas modalidades, el dominio de captura puede tener un total de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 125 nucleótidos (o cualquiera de los subintervalos de este intervalo descrito en la presente descripción). En algunas modalidades, la secuencia que es sustancialmente complementaria a una porción de la secuencia del analito puede ser una secuencia aleatoria. En algunas modalidades, la secuencia que es sustancialmente complementaria a una porción de la secuencia del analito puede incluir una secuencia de oligonucleótidos poli(T) (por ejemplo, al menos 5 T contiguas, al menos 10 T contiguas o al menos 15 T contiguas).

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la etapa (b) comprende secuenciar (i) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al analito específicamente unido al dominio de captura o un complemento del mismo, y (ii) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial o un complemento del mismo. En algunas modalidades, la secuenciación es secuenciación de alto rendimiento, secuenciación por hibridación o cualquiera de los otros métodos de secuenciación descritos en la presente descripción o conocidos en la técnica. Por ejemplo, la secuenciación puede implicar uno o más de amplificación de ácido nucleico, la ligazón o adición de uno o más adaptadores de secuenciación, escisión de la sonda de captura de la matriz, extensión de la sonda de captura mediante el uso del ADNc unido como plantilla, y generación de un ácido nucleico de hebra única que comprende una secuencia que es complementaria a toda o parte de la sonda de captura extendida. Los métodos no limitantes para determinar la secuencia de (i) toda o una parte de la secuencia del ácido nucleico diana, o un complemento de la misma, o (ii) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial, o un complemento de la misma, se describen en la presente descripción o son conocidos en la técnica.

También se describen en la presente descripción, pero no forman parte de la invención, métodos para reducir el riesgo de nueva extirpación de un tejido de un sujeto que incluyen: (a) poner en contacto una muestra de tejido obtenida del sujeto con una pluralidad de agentes de captura del analito, en donde un analito el agente de captura de la pluralidad de agentes de captura del analito comprende un código de barras del resto de unión al analito, una secuencia de captura del analito y un resto de unión al analito que se une específicamente a un analito; (b) disponer la muestra de tejido en una matriz, en donde la matriz comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende un código de barras espacial y un dominio de captura que se une específicamente a la secuencia de captura del analito; (c) determinar (i) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras del resto de unión al analito o un complemento de la misma, y (ii) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial o un complemento de la misma y usar las secuencias de ácido nucleico determinadas de (i) y (ii) para identificar la presencia del analito en una ubicación en la muestra de tejido; (d) comparar la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del analito en ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido, y determinar el margen quirúrgico

basándose en la comparación; y (e) resecar tejido del sujeto mediante el uso del margen quirúrgico determinado en la etapa (d), donde el método da como resultado una reducción en el riesgo de una futura nueva extirpación del tejido en el sujeto. En algunas modalidades, el analito es una proteína.

5 También se describen en la presente descripción, pero no forman parte de la invención, métodos para reducir el riesgo de una nueva extirpación de un tejido de un sujeto, el método comprende: resecar tejido del sujeto mediante el uso de un margen quirúrgico previamente determinado mediante el uso de un método que comprende las etapas de: (a) poner en contacto una muestra de tejido obtenida del sujeto con una pluralidad de agentes de captura del analito, en donde un agente de captura del analito de la pluralidad de agentes de captura del analito comprende un código de barras de resto de unión al analito, una secuencia de captura del analito y un resto de unión al analito que se une específicamente a un analito; (b) disponer la muestra de tejido en una matriz, en donde la matriz comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende un código de barras espacial y un dominio de captura que se une específicamente a la secuencia de captura del analito; (c) determinar (i) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras del resto de unión al analito o un complemento de la misma, y (ii) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial o un complemento de la misma y usar las secuencias de ácido nucleico determinadas de (i) y (ii) para identificar la presencia del analito en una ubicación en la muestra de tejido; (d) comparar la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del analito en ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido, y determinar el margen quirúrgico basándose en la comparación.

15 En algunas modalidades, el analito es una proteína de longitud completa. En algunas modalidades, el analito es un fragmento de una proteína. En algunas modalidades, el analito es un subproducto de una proteína. En algunas modalidades, la proteína es cualquiera de los biomarcadores de cáncer ilustrativos descritos en la presente descripción.

20 En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, cada uno de la pluralidad de agentes de captura del analito comprende un código de barras del resto de unión al analito, una secuencia de captura del analito y un resto de unión al analito que se une específicamente a un analito. En algunas modalidades, el resto de unión al analito es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno (por ejemplo, un Fab). También puede usarse como resto de unión al analito cualquier otro resto de unión a proteínas adecuado conocido en la técnica. En algunas modalidades, el código de barras del resto de unión al analito puede ser cualquier código de barras descrito en la presente descripción. En algunas modalidades, la secuencia de captura del analito puede ser cualquier secuencia de captura del analito descrita en la presente descripción. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, cada una de la pluralidad de sondas de captura comprende un código de barras espacial y un dominio de captura que se une específicamente a la secuencia de captura del analito. La sonda de captura puede ser cualquier sonda de captura descrita en la presente descripción. En algunas modalidades, el dominio de captura de la sonda de captura comprende una secuencia que es sustancialmente complementaria (por ejemplo, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % complementaria) a una porción de la secuencia de captura del analito. En algunas modalidades, el dominio de captura puede tener un total de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 125 nucleótidos (o cualquiera de los subintervalos de este intervalo descrito en la presente descripción). En algunas modalidades, la secuencia que es sustancialmente complementaria a una porción de la secuencia de captura del analito puede ser una secuencia aleatoria. En algunas modalidades, la secuencia que es sustancialmente complementaria a una porción de la secuencia de captura del analito puede incluir una secuencia de oligonucleótidos poli(T) (por ejemplo, al menos 5 T contiguas, al menos 10 T contiguas o al menos 15 T contiguas).

25 En algunas modalidades, la determinación de la secuencia se realiza mediante secuenciación. En algunas modalidades, la secuenciación es secuenciación de alto rendimiento, secuenciación por hibridación o cualquiera de los otros métodos de secuenciación descritos en la presente descripción o conocidos en la técnica. Por ejemplo, la secuenciación puede implicar uno o más de amplificación de ácido nucleico, la ligazón o adición de uno o más adaptadores de secuenciación, escisión de la sonda de captura de la matriz, extensión de la sonda de captura mediante el uso de la secuencia de captura del analito unida como plantilla, y generar un ácido nucleico de hebra única que comprende una secuencia que es complementaria a toda o parte de la sonda de captura extendida. Los métodos no limitantes para determinar la secuencia de (i) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras del resto de unión al analito, o un complemento de la misma, o (ii) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial, o un complemento de la misma, se describen en la presente descripción o son conocidos en la técnica.

30 En algunas modalidades, el tejido resecado es o comprende un tumor (por ejemplo, un tumor maligno o benigno). En algunas modalidades, el tumor es un tumor sólido. En algunas modalidades, se sospecha que el sujeto tiene cáncer. En algunas modalidades, el sujeto se ha diagnosticado o identificado previamente con un cáncer (por ejemplo, cualquiera de los cánceres ilustrativos descritos en la presente descripción).

35 En algunas modalidades, el tejido resecado puede incluir un tumor (por ejemplo, un tumor maligno) de cualquiera de los tipos de cáncer descritos en la presente descripción.

En algunas modalidades, el analito es un biomarcador tumoral. En algunas modalidades, el analito es un antígeno tumoral. Los antígenos tumorales ilustrativos incluyen, pero sin limitarse a, cualquiera de los antígenos tumorales ilustrativos descritos en la presente descripción.

5 En algunas modalidades, el tejido resecado es o comprende un tejido infectado, un tejido necrótico o un tejido enfermo. En algunas modalidades, el analito puede estar asociado con una infección, necrosis, inflamación o enfermedad. En la técnica se conocen ejemplos no limitantes de dichos analitos.

10 En algunas modalidades, el tejido resecado está infectado por una bacteria (por ejemplo, cualquiera de las bacterias ilustrativas descritas en la presente descripción), un parásito o protozoos (por ejemplo, cualquiera de los parásitos o protozoos ilustrativos descritos en la presente descripción), un hongo (por ejemplo, cualquiera de los hongos ilustrativos descritos en la presente descripción), o un virus (por ejemplo, cualquiera de los virus ilustrativos descritos en la presente descripción).

15 En algunas modalidades, los métodos proporcionados en la presente descripción comprenden comparar la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del analito en ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido, y determinar el tamaño y el sitio de un tejido a resecar del sujeto basándose en la comparación. En algunas modalidades, la(s) ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido es/son ubicación(ones) de referencia. En algunas modalidades, la(s) ubicación(ones) de referencia en la muestra de tejido es/son ubicaciones de tejido sano. En algunas modalidades, la(s) ubicación(ones) de referencia en la muestra de tejido es/son ubicaciones de tejido no canceroso. En algunas modalidades, la(s) ubicación(ones) de referencia en la muestra de tejido es/son ubicaciones de tejido no tumoral. En algunas modalidades, la(s) ubicación(ones) de referencia en la muestra de tejido es/son ubicaciones de tejido no tumoral. En algunas modalidades, la(s) ubicación(ones) de referencia en la muestra de tejido es/son ubicaciones sin anomalías tales como tumor, cáncer, necrosis, inflamación, infección o enfermedad.

25 En algunas modalidades, la presencia del analito en la ubicación de la muestra de tejido es significativamente diferente de la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s) en el tejido. En algunas modalidades, la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido es significativamente mayor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s) de la muestra de tejido. En algunas modalidades, la presencia del analito en la ubicación de la muestra de tejido es significativamente menor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido.

30 En algunas modalidades, se determina que la ubicación en la muestra de tejido se reseca si la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido es significativamente diferente de la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s). En algunas modalidades, se determina que la ubicación en la muestra de tejido se reseca si la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido es significativamente mayor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s). En algunas modalidades, se determina que la ubicación en la muestra de tejido se reseca si la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido es significativamente menor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s).

35 En algunas modalidades, la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido es aproximadamente 0,1 veces a aproximadamente 100 veces (por ejemplo, o cualquiera de los subintervalos de este intervalo descritos en la presente descripción) mayor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s).

40 En algunas modalidades, la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido es aproximadamente 1 % a aproximadamente 99 % (por ejemplo, o cualquiera de los subintervalos de este intervalo descritos en la presente descripción) menor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s).

45 En algunas modalidades, se evalúa la presencia de ciertos biomarcadores asociados con un cáncer y/o enfermedad (por ejemplo, biomarcadores de cáncer de mama en carcinoma ductal) en una ubicación en una muestra de tejido. Si la presencia de ciertos biomarcadores asociados con un cáncer y/o una enfermedad está por debajo de un valor umbral para esos biomarcadores, la ubicación en la muestra de tejido se considera "clara". Si la presencia de ciertos biomarcadores asociados con un cáncer y/o enfermedad está por encima de un valor umbral para esos biomarcadores, la ubicación en la muestra de tejido se considera dentro del margen del tejido a resecar.

50 En algunas modalidades, el método comprende además comparar la presencia de uno o más analitos adicionales en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del uno o más analitos adicionales en la(s) ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido. En algunas modalidades, la presencia de un total de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 000 (por ejemplo, o cualquiera de los subintervalos de este intervalo descritos en la presente descripción) analitos en la ubicación se compara con la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s).

55 En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, las células mutantes se identifican de acuerdo con la presencia del uno o más analitos en la ubicación en la muestra de tejido. En algunas modalidades, una célula mutante se identifica de acuerdo con la presencia de uno o más biomarcadores descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, una célula mutante se identifica de acuerdo con la presencia de uno o más biomarcadores de superficie celular, por ejemplo, un receptor de superficie celular, en la ubicación en la muestra de tejido.

- 5 En algunas modalidades, una célula dentro de una ubicación en la muestra de tejido se identifica como una célula mutante si la presencia del uno o más analitos en la ubicación en la muestra de tejido son significativamente diferentes de la presencia del(de los) analito(s) en la(s) ubicación(ones) diferente(s). En algunas modalidades, una célula dentro de una ubicación en la muestra de tejido se identifica como una célula mutante si la presencia del uno o más analitos en la ubicación en la muestra de tejido es significativamente mayor que la presencia del(de los) analito(s) en la(s) ubicación(ones) diferente(s). En algunas modalidades, se determina que la(s) célula(s) mutante(s) dentro de la muestra de tejido se reseca(n) si la presencia del(de los) analito(s) en la ubicación en la muestra de tejido es significativamente menor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s).
- 10 En algunas modalidades, una ubicación en la muestra de tejido comprende aproximadamente 1 a aproximadamente 100 000 células.
- El código de barras espacial de la sonda de captura puede ser cualquier código de barras espacial descrito en la presente descripción.
- 15 En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la matriz puede ser cualquiera de los tipos de matrices descritos en la presente descripción. Por ejemplo, la matriz comprende un portaobjetos. En algunas modalidades, la sonda de captura se une al portaobjetos (por ejemplo, por su extremo 5').
- En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la matriz es una matriz de perlas. En algunas modalidades, un extremo 5' de la sonda de captura se une a una perla de la matriz de perlas.
- 20 En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, el método comprende extender un extremo 3' de la sonda de captura mediante el uso del analito específicamente unido o el código de barras del agente de unión al analito como plantilla para generar una sonda de captura extendida.
- 25 En algunas modalidades, se usan métodos adicionales en combinación con los métodos descritos en la presente descripción para determinar el sitio y el tamaño del tejido a resecar en un sujeto. En algunas modalidades, se usan modalidades de obtención de imágenes médicas tal como la tomografía computarizada (CT) y la obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI) en combinación con los métodos descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, se usa una tomografía por emisión de positrones (PET) en combinación con los métodos descritos en la presente descripción. Por ejemplo, puede realizarse una exploración inicial de un paciente con cáncer y/o la obtención de imágenes de una muestra de tejido de un paciente con cáncer mediante el uso de, por ejemplo, MRI, CT y/o PET antes de los métodos descritos en la presente descripción, y una evaluación preliminar del margen quirúrgico. La información inicial puede proporcionar orientación sobre, por ejemplo, dónde obtener la muestra de tejido para usar en los métodos descritos en la presente descripción, el tamaño de la muestra de tejido y/o el número de muestras de tejido necesarias. En otro ejemplo, puede realizarse una exploración y/u obtención de imágenes de seguimiento mediante el uso de, por ejemplo, MRI, CT y/o PET después de realizar los métodos descritos en la presente descripción. La exploración y/u obtención de imágenes de seguimiento proporcionan información sobre, por ejemplo, la eliminación del tejido canceroso y/o enfermo, y si hay tejido canceroso y/o enfermo residual. También puede usarse cualquier otro método adecuado conocido en la técnica en combinación con los métodos descritos en la presente descripción.
- 30 35
- 40 En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, al menos una porción del tejido reseca incluye célula(s) cancerosa(s), célula(s) precancerosa(s), célula(s) necrótica(s), célula(s) infectada(s) y/o tejido enfermo. En algunas modalidades, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 99 % o el 100 % del tejido reseca incluye una o más células cancerosas, células precancerosas, células necróticas, células infectadas y tejido enfermo.
- 45 En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, el margen quirúrgico puede ser el margen entre la(s) ubicación(ones) de una o más de células cancerosas, células precancerosas, células necróticas, células infectadas y tejido enfermo, y la(s) ubicación(ones) de tejido sano o normal, en un sujeto.
- 50 En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente descripción son más precisos para determinar el margen quirúrgico de un tejido a resecar que los métodos tradicionales, tales como métodos de obtención de imágenes o exploración.
- 55 En algunas modalidades, una nueva extirpación incluye extirpaciones de tejido adicionales durante el procedimiento quirúrgico inicial para obtener la muestra de tejido. En algunas modalidades, una nueva extirpación incluye extirpaciones de tejido adicionales durante un procedimiento futuro.
- En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente descripción dan como resultado una reducción (por ejemplo, al menos una reducción del 5 %, al menos una reducción del 10 %, al menos una reducción del 15 %, al menos una reducción del 20 %, al menos una reducción del 25 %, al menos una reducción del 30 %, al menos una reducción del 35 %, al menos una reducción del 40 %, al menos una reducción del 45 %, al menos una reducción del 50 %, al menos una reducción del 55 %, al menos una reducción del 60 %, al menos una reducción del 65 %, al menos una reducción del 70 %, al menos una reducción del 75 %, al menos una reducción del 80 %, al menos una reducción del 85 %, al menos una reducción del 90 %, al menos una reducción del 95 %, o al menos una reducción del 99 %, o

una reducción de aproximadamente 1 % a aproximadamente un 5 %, una reducción de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 10 %, una reducción de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 99 %, una reducción de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 90 %, una reducción de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 80 %, una reducción de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 70 %, una reducción de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 60 %, una reducción de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 50 %, una reducción de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 40 %, una reducción de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 30 %, una reducción de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 20 %, una reducción de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 15 %, una reducción de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 99 %, una reducción de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 90 %, una reducción de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 80 %, una reducción de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 70 %, una reducción de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 60 %, una reducción de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 50 %, una reducción de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 40 %, una reducción de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 30 %, una reducción de aproximadamente un 30 % a aproximadamente un 99 %, una reducción de aproximadamente un 30 % a aproximadamente un 90 %, una reducción de aproximadamente un 30 % a aproximadamente un 80 %, una reducción de aproximadamente un 30 % a aproximadamente un 70 %, una reducción de aproximadamente un 30 % a aproximadamente un 60 %, una reducción de aproximadamente un 30 % a aproximadamente un 50 %, una reducción de aproximadamente un 30 % a aproximadamente un 40 %, una reducción de aproximadamente un 40 % a aproximadamente un 99 %, una reducción de aproximadamente un 40 % a aproximadamente un 90 %, una reducción de aproximadamente un 40 % a aproximadamente un 80 %, una reducción de aproximadamente un 40 % a aproximadamente un 70 %, una reducción de aproximadamente un 40 % a aproximadamente un 60 %, una reducción de aproximadamente un 40 % a aproximadamente un 50 %, una reducción de aproximadamente un 40 % a aproximadamente un 99 %, una reducción de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 90 %, una reducción de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 80 %, una reducción de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 70 %, una reducción de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 65 %, una reducción de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 60 %, una reducción de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 55 %, una reducción de aproximadamente un 60 % a aproximadamente un 99 %, una reducción de aproximadamente un 60 % a aproximadamente un 90 %, una reducción de aproximadamente un 60 % a aproximadamente un 80 %, una reducción de aproximadamente un 60 % a aproximadamente un 75 %, una reducción de aproximadamente un 60 % a aproximadamente un 70 %, una reducción de aproximadamente un 60 % a aproximadamente un 65 %, una reducción de aproximadamente un 70 % a aproximadamente un 99 %, una reducción de aproximadamente un 70 % a aproximadamente un 95 %, una reducción de aproximadamente un 70 % a aproximadamente un 90 %, una reducción de aproximadamente un 70 % a aproximadamente un 85 %, una reducción de aproximadamente un 70 % a aproximadamente un 80 %, una reducción de aproximadamente un 70 % a aproximadamente un 75 %, una reducción de aproximadamente un 80 % a aproximadamente un 99 %, una reducción de aproximadamente un 80 % a aproximadamente un 95 %, una reducción de aproximadamente un 80 % a aproximadamente un 90 %, una reducción de aproximadamente un 80 % a aproximadamente un 85 %, una reducción de aproximadamente un 90 % a aproximadamente un 99 %, una reducción de aproximadamente un 90 % a aproximadamente un 95 %, o una reducción de aproximadamente un 95 % a aproximadamente un 99 %) en el riesgo de una futura nueva extirpación del tejido en el sujeto (por ejemplo, en comparación con un sujeto similar que se ha sometido a una resección basándose en un método de obtención de imágenes o mediante la evaluación visual del médico durante la resección).

Un ejemplo no limitante de un método para identificar un margen quirúrgico de un tejido a resecar se representa en la Figura 4. Brevemente, se extirpa un tejido de biopsia de un sujeto y se obtienen imágenes de posibles células de tejido tumoral u otras células relacionadas con enfermedades. Después de obtener imágenes, se secciona el tejido y una o más secciones de tejido se someten a los métodos descritos en la presente descripción para la determinación espacial y la ubicación de células de interés en un tejido. Por ejemplo, la expresión genética a lo largo de los márgenes de una sección de tejido indicativa de cáncer o un estado patológico y/o la ubicación de receptores a lo largo de los márgenes de una sección de tejido indicativa de cáncer o un estado patológico se determina mediante una matriz espacial. Adicionalmente, las mutaciones conocidas asociadas con un cáncer o estado patológico pueden identificarse espacialmente a lo largo de los márgenes de una sección de tejido. Puede usarse el análisis de expresión génica y/o la presencia de receptores y/o el estado mutacional de las células dentro de los márgenes del tejido para determinar si un cirujano ha resecado suficientemente el tejido. Por ejemplo, la presencia de uno o más genes, receptores y/o mutaciones indicativas de un cáncer o estado patológico en una sección de margen de tejido analizada espacialmente indicaría que la resección del tejido canceroso o enfermo no fue completa, como tal podría ser necesario una resección más expandida. Cuando los márgenes de la sección de tejido están ausentes de los biomarcadores que se usaron para indicar un cáncer o un estado patológico, entonces una resección podría considerarse exitosa para esa ubicación.

(e) Métodos para reducir la tasa de recurrencia de una anomalía tisular

En la presente descripción se describen, pero no forman parte de la invención, métodos para reducir la tasa de recurrencia de una anomalía tisular en un sujeto que incluyen: (a) poner en contacto una muestra de tejido obtenida del sujeto con una matriz que comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende un (i) dominio de captura que se une específicamente a un analito de la muestra de tejido y (ii) un código de barras espacial; (b) determinar (i) toda o una parte de una secuencia de ácido

nucleico correspondiente al analito específicamente unido al dominio de captura o un complemento de la misma, y (ii) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial o un complemento de la misma, y usar las secuencias de ácido nucleico determinadas de (i) y (ii) para identificar la presencia del analito en una ubicación en la muestra de tejido; (c) comparar la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del analito en ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido, y determinar el margen quirúrgico basándose en la comparación; (d) reseca tejido del sujeto mediante el uso del margen quirúrgico determinado en la etapa (c), en donde el método da como resultado una reducción en la tasa de recurrencia de una anomalía tisular en el sujeto.

También se describen en la presente descripción, pero no forman parte de la invención, métodos para reducir la tasa de recurrencia de una anomalía tisular en un sujeto, el método comprende: reseca tejido del sujeto mediante el uso de un margen quirúrgico determinado previamente mediante el uso de un método que comprende las etapas de: (a) poner en contacto una muestra de tejido obtenida del sujeto con una matriz que comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende un (i) dominio de captura que se une específicamente a un analito de la muestra de tejido y (ii) un código de barras espacial; (b) determinar (i) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al analito específicamente unido al dominio de captura o un complemento de la misma, y (ii) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial o un complemento de la misma, y usar las secuencias de ácido nucleico determinadas de (i) y (ii) para identificar la presencia del analito en una ubicación en la muestra de tejido; (c) comparar la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del analito en ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido, y determinar el margen quirúrgico basándose en la comparación.

Por ejemplo, los métodos descritos en la presente descripción permiten a un médico identificar los márgenes del tumor tisular con confianza de manera que la resección del tejido aumentará la probabilidad de que el tumor completo o la anomalía tisular se haya eliminado del sujeto, para reducir de esta manera la tasa de recurrencia del tejido anormal o tumor en el sujeto.

En algunas modalidades, el analito es un ADN o ARN. En algunas modalidades, el analito es una molécula de ARN mensajero (ARNm). En algunas modalidades, el analito es un ADN genómico. En algunas modalidades, el analito comprende una secuencia de longitud completa de un biomarcador descrito en la presente descripción. En algunas modalidades, el analito comprende un fragmento de la secuencia de un biomarcador descrito en la presente descripción. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, cada una de la pluralidad de sondas de captura comprende (i) un dominio de captura que se une específicamente a un analito de la muestra de tejido y (ii) un código de barras espacial. La sonda de captura puede ser cualquier sonda de captura descrita en la presente descripción. En algunas modalidades, el dominio de captura de la sonda de captura comprende una secuencia que es sustancialmente complementaria (por ejemplo, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % complementaria) a una porción de la secuencia del analito de la muestra de tejido. En algunas modalidades, el dominio de captura puede tener un total de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 125 nucleótidos (o cualquiera de los subintervalos de este intervalo descrito en la presente descripción). En algunas modalidades, la secuencia que es sustancialmente complementaria a una porción de la secuencia del analito puede ser una secuencia aleatoria. En algunas modalidades, la secuencia que es sustancialmente complementaria a una porción de la secuencia del analito puede incluir una secuencia de oligonucleótidos poli(T) (por ejemplo, al menos 5 T contiguas, al menos 10 T contiguas o al menos 15 T contiguas).

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la etapa (b) comprende secuenciar (i) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al analito específicamente unido al dominio de captura o un complemento del mismo, y (ii) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial o un complemento del mismo. En algunas modalidades, la secuenciación es secuenciación de alto rendimiento, secuenciación por hibridación o cualquiera de los otros métodos de secuenciación descritos en la presente descripción o conocidos en la técnica. Por ejemplo, la secuenciación puede implicar uno o más de amplificación de ácido nucleico, la ligazón o adición de uno o más adaptadores de secuenciación, escisión de la sonda de captura de la matriz, extensión de la sonda de captura mediante el uso del ADNc unido como plantilla, y generación de un ácido nucleico de hebra única que comprende una secuencia que es complementaria a toda o parte de la sonda de captura extendida. Los métodos no limitantes para determinar la secuencia de (i) toda o una parte de la secuencia del ácido nucleico diana, o un complemento de la misma, o (ii) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial, o un complemento de la misma, se describen en la presente descripción o son conocidos en la técnica.

También se describen en la presente descripción, pero no forman parte de la invención, métodos para reducir la tasa de recurrencia de una anomalía tisular en un sujeto que incluyen: (a) poner en contacto una muestra de tejido obtenida del sujeto con una pluralidad de agentes de captura del analito, en donde un agente de captura del analito de la pluralidad de agentes de captura del analito comprende un código de barras del resto de unión al analito, una secuencia de captura del analito y un resto de unión al analito que se une específicamente a un analito; (b) disponer la muestra de tejido en una matriz, en donde la matriz comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende un código de barras espacial y un dominio de captura que se une específicamente a la secuencia de captura del analito; (c) determinar (i) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras del resto de unión al analito o un complemento de la

misma, y (ii) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial o un complemento de la misma y usar las secuencias de ácido nucleico determinadas de (i) y (ii) para identificar la presencia del analito en una ubicación en la muestra de tejido; (d) comparar la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del analito en ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido, y determinar el margen quirúrgico basándose en la comparación; y (e) reseca tejido del sujeto mediante el uso del margen quirúrgico determinado en la etapa (d), donde el método da como resultado una reducción en la tasa de recurrencia de una anomalía tisular en el sujeto.

También se describen en la presente descripción, pero no forman parte de la invención, métodos para reducir la tasa de recurrencia de una anomalía tisular en un sujeto, el método comprende: reseca tejido del sujeto mediante el uso de un margen quirúrgico determinado previamente mediante el uso de un método que comprende las etapas de: (a) poner en contacto una muestra de tejido obtenida del sujeto con una pluralidad de agentes de captura del analito, en donde un agente de captura del analito de la pluralidad de agentes de captura del analito comprende un código de barras del resto de unión al analito, una secuencia de captura del analito y un resto de unión al analito que se une específicamente a un analito; (b) disponer la muestra de tejido en una matriz, en donde la matriz comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende un código de barras espacial y un dominio de captura que se une específicamente a la secuencia de captura del analito; (c) determinar (i) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras del resto de unión al analito o un complemento de la misma, y (ii) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial o un complemento de la misma y usar las secuencias de ácido nucleico determinadas de (i) y (ii) para identificar la presencia del analito en una ubicación en la muestra de tejido; (d) comparar la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del analito en ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido, y determinar el margen quirúrgico basándose en la comparación.

En algunas modalidades, el analito es una proteína. En algunas modalidades, el analito es una proteína de longitud completa. En algunas modalidades, el analito es un fragmento de una proteína. En algunas modalidades, el analito es un subproducto de una proteína. En algunas modalidades, la proteína es cualquiera de los biomarcadores de cáncer ilustrativos descritos en la presente descripción.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, cada uno de la pluralidad de agentes de captura del analito comprende un código de barras del resto de unión al analito, una secuencia de captura del analito y un resto de unión al analito que se une específicamente a un analito. En algunas modalidades, el resto de unión al analito es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno (por ejemplo, un Fab). También puede usarse como resto de unión al analito cualquier otro resto de unión a proteínas adecuado conocido en la técnica. En algunas modalidades, el código de barras del resto de unión al analito puede ser cualquier código de barras descrito en la presente descripción. En algunas modalidades, la secuencia de captura del analito puede ser cualquier secuencia de captura del analito descrita en la presente descripción. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, cada una de la pluralidad de sondas de captura comprende un código de barras espacial y un dominio de captura que se une específicamente a la secuencia de captura del analito. La sonda de captura puede ser cualquier sonda de captura descrita en la presente descripción. En algunas modalidades, el dominio de captura de la sonda de captura comprende una secuencia que es sustancialmente complementaria (por ejemplo, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % complementaria) a una porción de la secuencia de captura del analito. En algunas modalidades, el dominio de captura puede tener un total de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 125 nucleótidos (o cualquiera de los subintervalos de este intervalo descrito en la presente descripción). En algunas modalidades, la secuencia que es sustancialmente complementaria a una porción de la secuencia de captura del analito puede ser una secuencia aleatoria. En algunas modalidades, la secuencia que es sustancialmente complementaria a una porción de la secuencia de captura del analito puede incluir una secuencia de oligonucleótidos poli(T) (por ejemplo, al menos 5 T contiguas, al menos 10 T contiguas o al menos 15 T contiguas).

En algunas modalidades, la determinación de la secuencia se realiza mediante secuenciación. En algunas modalidades, la secuenciación es secuenciación de alto rendimiento, secuenciación por hibridación o cualquiera de los otros métodos de secuenciación descritos en la presente descripción o conocidos en la técnica. Por ejemplo, la secuenciación puede implicar uno o más de amplificación de ácido nucleico, la ligazón o adición de uno o más adaptadores de secuenciación, escisión de la sonda de captura de la matriz, extensión de la sonda de captura mediante el uso de la secuencia de captura del analito unida como plantilla, y generar un ácido nucleico de hebra única que comprende una secuencia que es complementaria a toda o parte de la sonda de captura extendida. Los métodos no limitantes para determinar la secuencia de (i) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras del resto de unión al analito, o un complemento de la misma, o (ii) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial, o un complemento de la misma, se describen en la presente descripción o son conocidos en la técnica.

En algunas modalidades, una anomalía en el tejido reseca es o comprende un tumor (por ejemplo, un tumor maligno o benigno). En algunas modalidades, el tumor es un tumor sólido. En algunas modalidades, se sospecha que el sujeto tiene cáncer. En algunas modalidades, el sujeto se ha diagnosticado o identificado previamente con un cáncer (por ejemplo, cualquiera de los cánceres ilustrativos descritos en la presente descripción).

En algunas modalidades, el tejido resecado puede incluir un tumor, por ejemplo, un tumor (por ejemplo, un tumor maligno) de cualquiera de los tipos de cáncer descritos en la presente descripción.

5 En algunas modalidades, el analito es un biomarcador tumoral. En algunas modalidades, el analito es un antígeno tumoral. Los antígenos tumorales ilustrativos incluyen, pero sin limitarse a, cualquiera de los antígenos tumorales ilustrativos descritos en la presente descripción.

En algunas modalidades, el tejido resecado es o comprende un tejido infectado, un tejido necrótico o un tejido enfermo. En algunas modalidades, el analito puede estar asociado con una infección, necrosis, inflamación o enfermedad. En la técnica se conocen ejemplos no limitantes de dichos analitos.

10 En algunas modalidades, el tejido resecado está infectado por una bacteria (por ejemplo, cualquiera de las bacterias ilustrativas descritas en la presente descripción), un parásito o protozoos (por ejemplo, cualquiera de los parásitos o protozoos ilustrativos descritos en la presente descripción), un hongo (por ejemplo, cualquiera de los hongos ilustrativos descritos en la presente descripción), o un virus (por ejemplo, cualquiera de los virus ilustrativos descritos en la presente descripción).

15 En algunas modalidades, los métodos proporcionados en la presente descripción comprenden comparar la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del analito en ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido, y determinar el tamaño y el sitio de un tejido a resecar del sujeto basándose en la comparación. En algunas modalidades, la(s) ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido es/son ubicación(ones) de referencia. En algunas modalidades, la(s) ubicación(ones) de referencia en la muestra de tejido es/son ubicaciones de tejido sano. En algunas modalidades, la(s) ubicación(ones) de referencia en la muestra de tejido es/son ubicaciones de tejido no canceroso. En algunas modalidades, la(s) ubicación(ones) de referencia en la muestra de tejido es/son ubicaciones de tejido no tumoral. En algunas modalidades, la(s) ubicación(ones) de referencia en la muestra de tejido es/son ubicaciones sin anomalías tales como tumor, cáncer, necrosis, inflamación, infección o enfermedad.

25 En algunas modalidades, la presencia del analito en la ubicación de la muestra de tejido es significativamente diferente de la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s) en el tejido. En algunas modalidades, la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido es significativamente mayor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s) de la muestra de tejido. En algunas modalidades, la presencia del analito en la ubicación de la muestra de tejido es significativamente menor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido.

30 En algunas modalidades, se determina que la ubicación en la muestra de tejido se reseca si la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido es significativamente diferente de la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s). En algunas modalidades, se determina que la ubicación en la muestra de tejido se reseca si la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido es significativamente mayor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s). En algunas modalidades, se determina que la ubicación en la muestra de tejido se reseca si la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido es significativamente menor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s).

35 En algunas modalidades, la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido es aproximadamente 0,1 veces a aproximadamente 100 veces (por ejemplo, o cualquiera de los subintervalos de este intervalo descritos en la presente descripción) mayor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s).

40 En algunas modalidades, la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido es aproximadamente 1 % a aproximadamente 99 % (por ejemplo, o cualquiera de los subintervalos de este intervalo descritos en la presente descripción) menor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s).

45 En algunas modalidades, se evalúa la presencia de ciertos biomarcadores asociados con un cáncer y/o enfermedad (por ejemplo, biomarcadores de cáncer de mama en carcinoma ductal) en una ubicación en una muestra de tejido. Si la presencia de ciertos biomarcadores asociados con un cáncer y/o una enfermedad está por debajo de un valor umbral para esos biomarcadores, la ubicación en la muestra de tejido se considera "clara". Si la presencia de ciertos biomarcadores asociados con un cáncer y/o enfermedad está por encima de un valor umbral para esos biomarcadores, la ubicación en la muestra de tejido se considera dentro del margen del tejido a resecar.

50 En algunas modalidades, el método comprende además comparar la presencia de uno o más analitos adicionales en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del uno o más analitos adicionales en la(s) ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido. En algunas modalidades, la presencia de un total de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 000 (por ejemplo, o cualquiera de los subintervalos de este intervalo descritos en la presente descripción) analitos en la ubicación se compara con la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s).

55 En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, las células mutantes se identifican de acuerdo con la presencia del uno o más analitos en la ubicación en la muestra de tejido. En algunas modalidades, una célula mutante se identifica de acuerdo con la presencia de uno o más biomarcadores descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, una célula mutante se identifica de acuerdo con la presencia de uno

o más biomarcadores de superficie celular, por ejemplo, un receptor de superficie celular, en la ubicación en la muestra de tejido.

5 En algunas modalidades, una célula dentro de una ubicación en la muestra de tejido se identifica como una célula mutante si la presencia del uno o más analitos en la ubicación en la muestra de tejido son significativamente diferentes de la presencia del(de los) analito(s) en la(s) ubicación(ones) diferente(s). En algunas modalidades, una célula dentro de una ubicación en la muestra de tejido se identifica como una célula mutante si la presencia del uno o más analitos en la ubicación en la muestra de tejido es significativamente mayor que la presencia del(de los) analito(s) en la(s) ubicación(ones) diferente(s). En algunas modalidades, se determina que la(s) célula(s) mutante(s) dentro de la ubicación en la muestra de tejido se reseca(n) si la presencia del(de los) analito(s) en la ubicación en la muestra de tejido es significativamente menor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s).

10 En algunas modalidades, una ubicación en la muestra de tejido comprende aproximadamente 1 a aproximadamente 100 000 células.

El código de barras espacial de la sonda de captura puede ser cualquier código de barras espacial descrito en la presente descripción.

15 En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la matriz puede ser cualquiera de los tipos de matrices descritos en la presente descripción. Por ejemplo, la matriz comprende un portaobjetos. En algunas modalidades, la sonda de captura se une al portaobjetos (por ejemplo, por su extremo 5').

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la matriz es una matriz de perlas. En algunas modalidades, un extremo 5' de la sonda de captura se une a una perla de la matriz de perlas.

20 En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, el método comprende extender un extremo 3' de la sonda de captura mediante el uso del analito específicamente unido o el código de barras del agente de unión al analito como plantilla para generar una sonda de captura extendida.

25 En algunas modalidades, se usan métodos adicionales en combinación con los métodos descritos en la presente descripción para determinar el sitio y el tamaño del tejido a resecar en un sujeto. En algunas modalidades, se usan modalidades de obtención de imágenes médicas tal como la tomografía computarizada (CT) y la obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI) en combinación con los métodos descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, se usa una tomografía por emisión de positrones (PET) en combinación con los métodos descritos en la presente descripción. Por ejemplo, puede realizarse una exploración inicial de un paciente con cáncer y/o la obtención de imágenes de una muestra de tejido de un paciente con cáncer mediante el uso de, por ejemplo, MRI, CT y/o PET antes de los métodos descritos en la presente descripción, y una evaluación preliminar del margen quirúrgico. La información inicial puede proporcionar orientación sobre, por ejemplo, dónde obtener la muestra de tejido para usar en los métodos descritos en la presente descripción, el tamaño de la muestra de tejido y/o el número de muestras de tejido necesarias. En otro ejemplo, puede realizarse una exploración y/u obtención de imágenes de seguimiento mediante el uso de, por ejemplo, MRI, CT y/o PET después de realizar los métodos descritos en la presente descripción. La exploración y/u obtención de imágenes de seguimiento proporcionan información sobre, por ejemplo, la eliminación del tejido canceroso y/o enfermo, y si hay tejido canceroso y/o enfermo residual. También puede usarse cualquier otro método adecuado conocido en la técnica en combinación con los métodos descritos en la presente descripción.

40 En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, al menos una porción del tejido resecado incluye célula(s) cancerosa(s), célula(s) precancerosa(s), célula(s) necrótica(s), célula(s) infectada(s) y/o tejido enfermo. En algunas modalidades, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 99 % o el 100 % del tejido resecado incluye una o más células cancerosas, células precancerosas, células necróticas, células infectadas y tejido enfermo.

45 En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, el margen quirúrgico puede ser el margen entre la(s) ubicación(ones) de una o más de células cancerosas, células precancerosas, células necróticas, células infectadas y tejido enfermo, y la(s) ubicación(ones) de tejido sano o normal, en un sujeto.

50 En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente descripción dan como resultado una reducción (por ejemplo, al menos una reducción del 5 %, al menos una reducción del 10 %, al menos una reducción del 15 %, al menos una reducción del 20 %, al menos una reducción del 25 %, al menos una reducción del 30 %, al menos una reducción del 35 %, al menos una reducción del 40 %, al menos una reducción del 45 %, al menos una reducción del 50 %, al menos una reducción del 55 %, al menos una reducción del 60 %, al menos una reducción del 65 %, al menos una reducción del 70 %, al menos una reducción del 75 %, al menos una reducción del 80 %, al menos una reducción del 85 %, al menos una reducción del 90 %, al menos una reducción del 95 % o al menos al menos una reducción del 99 %, o una reducción de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 99 % (por ejemplo, o cualquiera de los subintervalos de este intervalo descritos en la presente descripción) en la tasa de recurrencia de una anomalía tisular (por ejemplo, cualquiera de los cánceres descritos en la presente descripción) en el sujeto (por ejemplo, en comparación con un sujeto similar que se ha sometido a una resección basándose en un método de obtención de imágenes o mediante la evaluación visual del médico durante la resección).

(f) Métodos para tratar a un sujeto mediante la escisión o evitando la escisión de un nervio o vaso sanguíneo

También se describen en la presente descripción, pero no forman parte de la invención, métodos para tratar a un sujeto que incluyen: (a) poner en contacto una muestra de tejido obtenida del sujeto con una matriz que comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende un (i) dominio de captura que se une específicamente a un analito de la muestra de tejido y (ii) un código de barras espacial; (b) determinar (i) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al analito específicamente unido al dominio de captura o un complemento de la misma, y (ii) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial o un complemento de la misma, y usar las secuencias de ácido nucleico determinadas de (i) y (ii) para identificar la presencia del analito en una ubicación en la muestra de tejido; (c) comparar la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del analito en ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido, y determinar el margen quirúrgico basándose en la comparación; y (d) extirpar un nervio o vaso sanguíneo que esté dentro del margen quirúrgico determinado en el sujeto, o evitar la extirpación de un nervio o vaso sanguíneo fuera del margen quirúrgico determinado en el sujeto.

También se describen en la presente descripción, pero no forman parte de la invención, métodos para tratar a un sujeto, el método comprende: extirpar un nervio o vaso sanguíneo que está dentro de un margen quirúrgico en el sujeto, o evitar la extirpación de un nervio o vaso sanguíneo fuera del margen quirúrgico en el sujeto, en donde el margen quirúrgico se determinó previamente mediante el uso de un método que comprende las etapas de: (a) poner en contacto una muestra de tejido obtenida del sujeto con una matriz que comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende un (i) dominio de captura que se une específicamente a un analito de la muestra de tejido y (ii) un código de barras espacial; (b) determinar (i) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al analito específicamente unido al dominio de captura o un complemento de la misma, y (ii) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial o un complemento de la misma, y usar las secuencias de ácido nucleico determinadas de (i) y (ii) para identificar la presencia del analito en una ubicación en la muestra de tejido; (c) comparar la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del analito en ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido, y determinar el margen quirúrgico basándose en la comparación.

Por ejemplo, cuando un médico pone en práctica el método, los datos obtenidos pueden proporcionarle información sobre la ubicación exacta del tejido canceroso o enfermo y, por lo tanto, proporcionar el margen quirúrgico preciso del tejido a resecar. Mediante el uso de la información del margen quirúrgico preciso proporcionada por el método descrito en la presente descripción, el médico puede lograr, por ejemplo, una extirpación más completa y precisa, para tratar de esta manera al sujeto que la necesita.

En algunas modalidades, el analito es un ADN o ARN. En algunas modalidades, el analito es una molécula de ARN mensajero (ARNm). En algunas modalidades, el analito es un ADN genómico. En algunas modalidades, el analito comprende una secuencia de longitud completa de un biomarcador descrito en la presente descripción. En algunas modalidades, el analito comprende un fragmento de la secuencia de un biomarcador descrito en la presente descripción. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, cada una de la pluralidad de sondas de captura comprende (i) un dominio de captura que se une específicamente a un analito de la muestra de tejido y (ii) un código de barras espacial. La sonda de captura puede ser cualquier sonda de captura descrita en la presente descripción. En algunas modalidades, el dominio de captura de la sonda de captura comprende una secuencia que es sustancialmente complementaria (por ejemplo, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % complementaria) a una porción de la secuencia del analito de la muestra de tejido. En algunas modalidades, el dominio de captura puede tener un total de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 125 nucleótidos (o cualquiera de los subintervalos de este intervalo descrito en la presente descripción). En algunas modalidades, la secuencia que es sustancialmente complementaria a una porción de la secuencia del analito puede ser una secuencia aleatoria. En algunas modalidades, la secuencia que es sustancialmente complementaria a una porción de la secuencia del analito puede incluir una secuencia de oligonucleótidos poli(T) (por ejemplo, al menos 5 T contiguas, al menos 10 T contiguas o al menos 15 T contiguas).

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la etapa (b) comprende secuenciar (i) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al analito específicamente unido al dominio de captura o un complemento del mismo, y (ii) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial o un complemento del mismo. En algunas modalidades, la secuenciación es secuenciación de alto rendimiento, secuenciación por hibridación o cualquiera de los otros métodos de secuenciación descritos en la presente descripción o conocidos en la técnica. Por ejemplo, la secuenciación puede implicar uno o más de amplificación de ácido nucleico, la ligazón o adición de uno o más adaptadores de secuenciación, escisión de la sonda de captura de la matriz, extensión de la sonda de captura mediante el uso del ADNc unido como plantilla, y generación de un ácido nucleico de hebra única que comprende una secuencia que es complementaria a toda o parte de la sonda de captura extendida. Los métodos no limitantes para determinar la secuencia de (i) toda o una parte de la secuencia del ácido nucleico diana, o un complemento de la misma, o (ii) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial, o un complemento de la misma, se describen en la presente descripción o son conocidos en la técnica.

También se describen en la presente descripción, pero no forman parte de la invención, métodos para tratar a un sujeto que incluyen: (a) poner en contacto una muestra de tejido obtenida del sujeto con una pluralidad de agentes de captura del analito, en donde un agente de captura del analito de la pluralidad de agentes de captura del analito comprende un código de barras del resto de unión al analito, una secuencia de captura del analito y un resto de unión al analito que se une específicamente a un analito; (b) disponer la muestra de tejido en una matriz, en donde la matriz comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende un código de barras espacial y un dominio de captura que se une específicamente a la secuencia de captura del analito; (c) determinar (i) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras del resto de unión al analito o un complemento de la misma, y (ii) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial o un complemento de la misma y usar las secuencias de ácido nucleico determinadas de (i) y (ii) para identificar la presencia del analito en una ubicación en la muestra de tejido; (d) comparar la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del analito en ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido, y determinar el margen quirúrgico basándose en la comparación; y (e) extirpar un nervio o vaso sanguíneo que esté dentro del margen quirúrgico determinado en el sujeto, o evitar la extirpación de un nervio o vaso sanguíneo fuera del margen quirúrgico determinado en el sujeto.

También se describen en la presente descripción, pero no forman parte de la invención, métodos para tratar a un sujeto, el método comprende: extirpar un nervio o vaso sanguíneo que está dentro de un margen quirúrgico en el sujeto, o evitar la extirpación de un nervio o vaso sanguíneo fuera del margen quirúrgico en el sujeto, en donde el margen quirúrgico se determinó previamente mediante el uso de un método que comprende las etapas de: (a) poner en contacto una muestra de tejido obtenida del sujeto con una pluralidad de agentes de captura del analito, en donde un agente de captura del analito de la pluralidad de agentes de captura del analito comprende un código de barras del resto de unión al analito, una secuencia de captura del analito y un resto de unión al analito que se une específicamente a un analito; (b) disponer la muestra de tejido en una matriz, en donde la matriz comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende un código de barras espacial y un dominio de captura que se une específicamente a la secuencia de captura del analito; (c) determinar (i) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras del resto de unión al analito o un complemento de la misma, y (ii) toda o una parte de una secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial o un complemento de la misma y usar las secuencias de ácido nucleico determinadas de (i) y (ii) para identificar la presencia del analito en una ubicación en la muestra de tejido; (d) comparar la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del analito en ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido, y determinar el margen quirúrgico basándose en la comparación.

En algunas modalidades, el analito es una proteína. En algunas modalidades, el analito es una proteína de longitud completa. En algunas modalidades, el analito es un fragmento de una proteína. En algunas modalidades, el analito es un subproducto de una proteína. En algunas modalidades, la proteína es cualquiera de los biomarcadores de cáncer ilustrativos descritos en la presente descripción.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, cada uno de la pluralidad de agentes de captura del analito comprende un código de barras del resto de unión al analito, una secuencia de captura del analito y un resto de unión al analito que se une específicamente a un analito. En algunas modalidades, el resto de unión al analito es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno (por ejemplo, un Fab). También puede usarse como resto de unión al analito cualquier otro resto de unión a proteínas adecuado conocido en la técnica. En algunas modalidades, el código de barras del resto de unión al analito puede ser cualquier código de barras descrito en la presente descripción. En algunas modalidades, la secuencia de captura del analito puede ser cualquier secuencia de captura del analito descrita en la presente descripción. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, cada una de la pluralidad de sondas de captura comprende un código de barras espacial y un dominio de captura que se une específicamente a la secuencia de captura del analito. La sonda de captura puede ser cualquier sonda de captura descrita en la presente descripción. En algunas modalidades, el dominio de captura de la sonda de captura comprende una secuencia que es sustancialmente complementaria (por ejemplo, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % complementaria) a una porción de la secuencia de captura del analito. En algunas modalidades, el dominio de captura puede tener un total de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 125 nucleótidos (o cualquiera de los subintervalos de este intervalo descrito en la presente descripción). En algunas modalidades, la secuencia que es sustancialmente complementaria a una porción de la secuencia de captura del analito puede ser una secuencia aleatoria. En algunas modalidades, la secuencia que es sustancialmente complementaria a una porción de la secuencia de captura del analito puede incluir una secuencia de oligonucleótidos poli(T) (por ejemplo, al menos 5 T contiguas, al menos 10 T contiguas o al menos 15 T contiguas).

En algunas modalidades, la determinación de la secuencia se realiza mediante secuenciación. En algunas modalidades, la secuenciación es secuenciación de alto rendimiento, secuenciación por hibridación o cualquiera de los otros métodos de secuenciación descritos en la presente descripción o conocidos en la técnica. Por ejemplo, la secuenciación puede implicar uno o más de amplificación de ácido nucleico, la ligazón o adición de uno o más adaptadores de secuenciación, escisión de la sonda de captura de la matriz, extensión de la sonda de captura mediante el uso de la secuencia de captura del analito unida como plantilla, y generar un ácido nucleico de hebra única que comprende una secuencia que es complementaria a toda o parte de la sonda de captura extendida. Los métodos no limitantes para determinar la secuencia de (i) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico

correspondiente al código de barras del resto de unión al analito, o un complemento de la misma, o (ii) toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al código de barras espacial, o un complemento de la misma, se describen en la presente descripción o son conocidos en la técnica.

5 En algunas modalidades, el tejido a resecar es o comprende un tumor (por ejemplo, un tumor maligno o benigno). En algunas modalidades, el tumor es un tumor sólido. En algunas modalidades, se sospecha que el sujeto tiene cáncer. En algunas modalidades, el sujeto se ha diagnosticado o identificado previamente con un cáncer (por ejemplo, cualquiera de los cánceres ilustrativos descritos en la presente descripción).

En algunas modalidades, el tejido a resecar puede incluir un tumor (por ejemplo, un tumor maligno) de cualquiera de los tipos de cáncer descritos en la presente descripción.

10 En algunas modalidades, el analito es un biomarcador tumoral. En algunas modalidades, el analito es un antígeno tumoral. Los antígenos tumorales ilustrativos incluyen, pero sin limitarse a, cualquiera de los antígenos tumorales ilustrativos descritos en la presente descripción.

15 En algunas modalidades, el tejido a resecar es o comprende un tejido infectado, un tejido necrótico o un tejido enfermo. En algunas modalidades, el analito puede estar asociado con una infección, necrosis, inflamación o enfermedad. En la técnica se conocen ejemplos no limitantes de dichos analitos.

20 En algunas modalidades, el tejido a resecar está infectado por una bacteria (por ejemplo, cualquiera de las bacterias ilustrativas descritas en la presente descripción), un parásito o protozoos (por ejemplo, cualquiera de los parásitos o protozoos ilustrativos descritos en la presente descripción), un hongo (por ejemplo, cualquier de los hongos ilustrativos descritos en la presente descripción), o un virus (por ejemplo, cualquiera de los virus ilustrativos descritos en la presente descripción).

25 En algunas modalidades, los métodos proporcionados en la presente descripción comprenden comparar la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del analito en ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido, y determinar el tamaño y el sitio de un tejido a resecar del sujeto basándose en la comparación. En algunas modalidades, la(s) ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido es/son ubicación(ones) de referencia. En algunas modalidades, la(s) ubicación(ones) de referencia en la muestra de tejido es/son ubicaciones de tejido sano. En algunas modalidades, la(s) ubicación(ones) de referencia en la muestra de tejido es/son ubicaciones de tejido no canceroso. En algunas modalidades, la(s) ubicación(ones) de referencia en la muestra de tejido es/son ubicaciones de tejido no tumoral. En algunas modalidades, la(s) ubicación(ones) de referencia en la muestra de tejido es/son ubicaciones sin anomalías tales como tumor, cáncer, necrosis, inflamación, infección o enfermedad.

30 En algunas modalidades, la presencia del analito en la ubicación de la muestra de tejido es significativamente diferente de la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s) en el tejido. En algunas modalidades, la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido es significativamente mayor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s) de la muestra de tejido. En algunas modalidades, la presencia del analito en la ubicación de la muestra de tejido es significativamente menor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s) en la muestra de tejido.

35 En algunas modalidades, se determina que la ubicación en la muestra de tejido se reseca si la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido es significativamente diferente de la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s). En algunas modalidades, se determina que la ubicación en la muestra de tejido se reseca si la presencia del analito en la muestra de tejido es significativamente mayor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s). En algunas modalidades, se determina que la ubicación en la muestra de tejido se reseca si la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido es significativamente menor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s).

40 En algunas modalidades, la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido es aproximadamente 0,1 veces a aproximadamente 100 veces (por ejemplo, o cualquiera de los subintervalos de este intervalo descritos en la presente descripción) mayor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s).

En algunas modalidades, la presencia del analito en la ubicación en la muestra de tejido es aproximadamente 1 % a aproximadamente 99 % (por ejemplo, o cualquiera de los subintervalos de este intervalo descritos en la presente descripción) menor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s).

45 En algunas modalidades, se evalúa la presencia de ciertos biomarcadores asociados con un cáncer y/o enfermedad (por ejemplo, biomarcadores de cáncer de mama en carcinoma ductal) en una ubicación en una muestra de tejido. Si la presencia de ciertos biomarcadores asociados con un cáncer y/o una enfermedad está por debajo de un valor umbral para esos biomarcadores, la ubicación en la muestra de tejido se considera "clara". Si la presencia de ciertos biomarcadores asociados con un cáncer y/o enfermedad está por encima de un valor umbral para esos biomarcadores, la ubicación en la muestra de tejido se considera dentro del margen del nervio y/o vaso sanguíneo a resecar.

50 En algunas modalidades, el método comprende además comparar la presencia de uno o más analitos adicionales en la ubicación en la muestra de tejido con la presencia del uno o más analitos adicionales en la(s) ubicación(ones)

diferente(s) en la muestra de tejido. En algunas modalidades, la presencia de un total de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 000 (por ejemplo, o cualquiera de los subintervalos de este intervalo descritos en la presente descripción) analitos en la ubicación se compara con la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s).

5 En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, las células mutantes se identifican de acuerdo con la presencia del uno o más analitos en la ubicación en la muestra de tejido. En algunas modalidades, una célula mutante se identifica de acuerdo con la presencia de uno o más biomarcadores descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, una célula mutante se identifica de acuerdo con la presencia de uno o más biomarcadores de superficie celular, por ejemplo, un receptor de superficie celular, en la ubicación en la muestra de tejido.

10 En algunas modalidades, una célula dentro de una ubicación en la muestra de tejido se identifica como una célula mutante si la presencia del uno o más analitos en la ubicación en la muestra de tejido son significativamente diferentes de la presencia del(de los) analito(s) en la(s) ubicación(ones) diferente(s). En algunas modalidades, una célula dentro de una ubicación en la muestra de tejido se identifica como una célula mutante si la presencia del uno o más analitos en la ubicación en la muestra de tejido es significativamente mayor que la presencia del(de los) analito(s) en la(s) ubicación(ones) diferente(s). En algunas modalidades, se determina que la(s) célula(s) mutante(s) dentro de la

15 ubicación en la muestra de tejido se reseca(n) si la presencia del(de los) analito(s) en la ubicación en la muestra de tejido es significativamente menor que la presencia del analito en la(s) ubicación(ones) diferente(s).

En algunas modalidades, una ubicación en la muestra de tejido comprende aproximadamente 1 a aproximadamente 100 000 células.

20 El código de barras espacial de la sonda de captura puede ser cualquier código de barras espacial descrito en la presente descripción.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la matriz puede ser cualquiera de los tipos de matrices descritos en la presente descripción. Por ejemplo, la matriz comprende un portaobjetos. En algunas modalidades, la sonda de captura se une al portaobjetos (por ejemplo, por su extremo 5').

25 En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, la matriz es una matriz de perlas. En algunas modalidades, un extremo 5' de la sonda de captura se une a una perla de la matriz de perlas.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, el método comprende extender un extremo 3' de la sonda de captura mediante el uso del analito específicamente unido o el código de barras del agente de unión al analito como plantilla para generar una sonda de captura extendida.

30 En algunas modalidades, se usan métodos adicionales en combinación con los métodos descritos en la presente descripción para determinar el sitio y el tamaño del tejido a resecar en un sujeto. En algunas modalidades, se usan modalidades de obtención de imágenes médicas tal como la tomografía computarizada (CT) y la obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI) en combinación con los métodos descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, se usa una tomografía por emisión de positrones (PET) en combinación con los métodos descritos

35 en la presente descripción. Por ejemplo, puede realizarse una exploración inicial de un paciente con cáncer y/o la obtención de imágenes de una muestra de tejido de un paciente con cáncer mediante el uso de, por ejemplo, MRI, CT y/o PET antes de los métodos descritos en la presente descripción, y una evaluación preliminar del margen quirúrgico. La información inicial puede proporcionar orientación sobre, por ejemplo, dónde obtener la muestra de tejido para usar en los métodos descritos en la presente descripción, el tamaño de la muestra de tejido y/o el número de muestras de tejido necesarias. En otro ejemplo, puede realizarse una exploración y/u obtención de imágenes de seguimiento mediante el uso de, por ejemplo, MRI, CT y/o PET después de realizar los métodos descritos en la presente descripción. La exploración y/u obtención de imágenes de seguimiento proporcionan información sobre, por ejemplo, la eliminación del tejido canceroso y/o enfermo, y si hay tejido canceroso y/o enfermo residual. También puede usarse cualquier otro método adecuado conocido en la técnica en combinación con los métodos descritos en la presente

40 descripción.

45

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, al menos una porción del tejido a resecar incluye célula(s) cancerosa(s), célula(s) precancerosa(s), célula(s) necrótica(s), célula(s) infectada(s) y/o tejido enfermo. En algunas modalidades, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 99 % o el 100 % del tejido a resecar incluye una o más células cancerosas, células precancerosas,

50 células necróticas, células infectadas y tejido enfermo.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción, el margen quirúrgico puede ser el margen entre la(s) ubicación(ones) de una o más de células cancerosas, células precancerosas, células necróticas, células infectadas y tejido enfermo, y la(s) ubicación(ones) de tejido sano o normal, en un sujeto.

55 En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente descripción comprenden extirpar un nervio y/o vaso sanguíneo que se encuentra dentro del margen quirúrgico determinado en el sujeto. En algunas modalidades, se extirpa al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 99 % del nervio y/o vaso sanguíneo que está dentro del margen quirúrgico determinado.

En algunas modalidades, la extirpación de un nervio y/o vaso sanguíneo se considera exitosa cuando menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 %, menos del 5 % o cero nervio y/o vaso sanguíneo que está dentro del margen quirúrgico determinado se detecta después de la extirpación en comparación con el nervio y/o vaso sanguíneo identificado que está dentro del margen quirúrgico determinado antes de la resección.

5 En algunas modalidades, el tratamiento se considera exitoso cuando menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 %, menos del 5 %, o cero nervio y/o vaso sanguíneo que esté dentro del margen quirúrgico determinado se detecta después de la extirpación en comparación con el nervio y/o vaso sanguíneo identificado que está dentro del margen quirúrgico determinado antes de la resección.

10 En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente descripción comprenden evitar la extirpación de un nervio y/o vaso sanguíneo fuera del margen quirúrgico determinado en el sujeto. En algunas modalidades, se extirpa no más del 20 %, no más del 15 %, no más del 10 %, no más del 8 %, no más del 6 %, no más del 4 %, no más del 2 % o no más del 1 % del nervio y/o vaso sanguíneo fuera del margen quirúrgico determinado.

15 El término "presencia" como se usa en la presente se refiere a la existencia y/o nivel(es) de cualquier(as) objeto(s) (por ejemplo, un analito) que se mide, cuantifica y/o compara en cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar un margen quirúrgico de un tejido a resecar en un sujeto, el método comprende:
 - (a) poner en contacto una sección de tejido obtenida del sujeto con un sustrato que comprende una pluralidad de sondas de captura fijadas al sustrato, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende (i) un dominio de captura que se hibrida con un analito de la sección de tejido y (ii) un código de barras espacial;
 - (b) permeabilizar la sección de tejido e hibridar el analito con el dominio de captura;
 - (c) determinar (i) toda o una parte de una secuencia correspondiente al analito hibridado con el dominio de captura o un complemento del mismo, y (ii) la secuencia de código de barras espacial o un complemento de la misma, y usar las secuencias determinadas de (i) y (ii) para identificar el analito en una ubicación en la sección de tejido; y
 - (d) comparar el analito en la ubicación en la sección de tejido con el analito en una o más ubicaciones diferentes en la sección de tejido, y determinar el margen quirúrgico del tejido a resecar del sujeto basándose en la comparación.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el analito es ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN).
3. Un método para determinar un margen quirúrgico de un tejido a resecar en un sujeto, el método comprende:
 - (a) poner en contacto una sección de tejido obtenida del sujeto con una pluralidad de agentes de captura del analito, en donde un agente de captura del analito de la pluralidad de agentes de captura del analito comprende: un resto de unión al analito que se une específicamente a un analito, un código de barras del resto de unión al analito, y una secuencia de captura del analito;
 - (b) disponer la sección de tejido obtenida del sujeto en un sustrato que comprende una pluralidad de sondas de captura fijadas al sustrato, en donde una sonda de captura de la pluralidad de sondas de captura comprende (i) un dominio de captura que se hibrida con la secuencia de captura del analito y (ii) un código de barras espacial;
 - (c) permeabilizar la sección de tejido e hibridar la secuencia de captura del analito con el dominio de captura;
 - (d) determinar (i) toda o una parte de una secuencia correspondiente al analito hibridado con el dominio de captura o un complemento de la misma, y (ii) la secuencia de código de barras espacial o un complemento de la misma, y usar las secuencias determinadas de (i) y (ii) para identificar el analito en una ubicación en la sección de tejido; y
 - (e) comparar el analito en la ubicación en la sección de tejido con el analito en una o más ubicaciones diferentes en la sección de tejido, y determinar el margen quirúrgico del tejido a resecar del sujeto basándose en la comparación.
4. El método de la reivindicación 3, en donde el analito es una proteína.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el analito en la ubicación en la sección de tejido aumenta en comparación con el analito en una o más ubicaciones diferentes en la sección de tejido.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el analito en la ubicación en la sección de tejido disminuye en comparación con el analito en la una o más ubicaciones diferentes en la sección de tejido.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la una o más ubicaciones diferentes en la sección de tejido son ubicaciones de referencia, opcionalmente en donde las ubicaciones de referencia en la sección de tejido son ubicaciones de tejido no canceroso y/o tejido no tumoral.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el tejido a resecar es un tumor, opcionalmente en donde el tejido a resecar es un tejido infectado, un tejido necrótico o un tejido enfermo, opcionalmente en donde el tejido a resecar está infectado con una bacteria, un virus, un hongo, un parásito y/o protozoos.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la sonda de captura comprende además uno o más dominios funcionales, un identificador molecular único, un dominio de escisión o sus combinaciones.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde comparar el analito en la ubicación en la sección de tejido con el analito en la una o más ubicaciones diferentes en la sección de tejido comprende además determinar el tamaño y el sitio del tejido a resecar del sujeto.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el método da como resultado una tasa reducida de nueva extirpación del tejido, y/o en donde el método da como resultado una tasa reducida de recurrencia de anomalías del tejido en el sujeto.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde se sospecha que el sujeto tiene o se le diagnostica cáncer.

13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde la sección de tejido se tiñó previamente con hematoxilina y eosina, inmunohistoquímica y/o inmunofluorescencia.

5 14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, que comprende además identificar la ubicación de un segundo analito en la sección de tejido, el método comprende además:

 hibridar el segundo analito con el dominio de captura; y

determinar (iii) toda o una parte de una secuencia del segundo analito hibridado con el dominio de captura o un complemento de la misma, y (iv) la secuencia de código de barras espacial o un complemento de la misma, y usar las secuencias determinadas de (iii) y (iv) para identificar la ubicación del segundo analito en la sección de tejido.

10 15. El método de la reivindicación 14, en donde cuando el primer analito es una proteína, entonces el segundo analito es ARN o cuando el primer analito es ARN, entonces el segundo analito es una proteína.

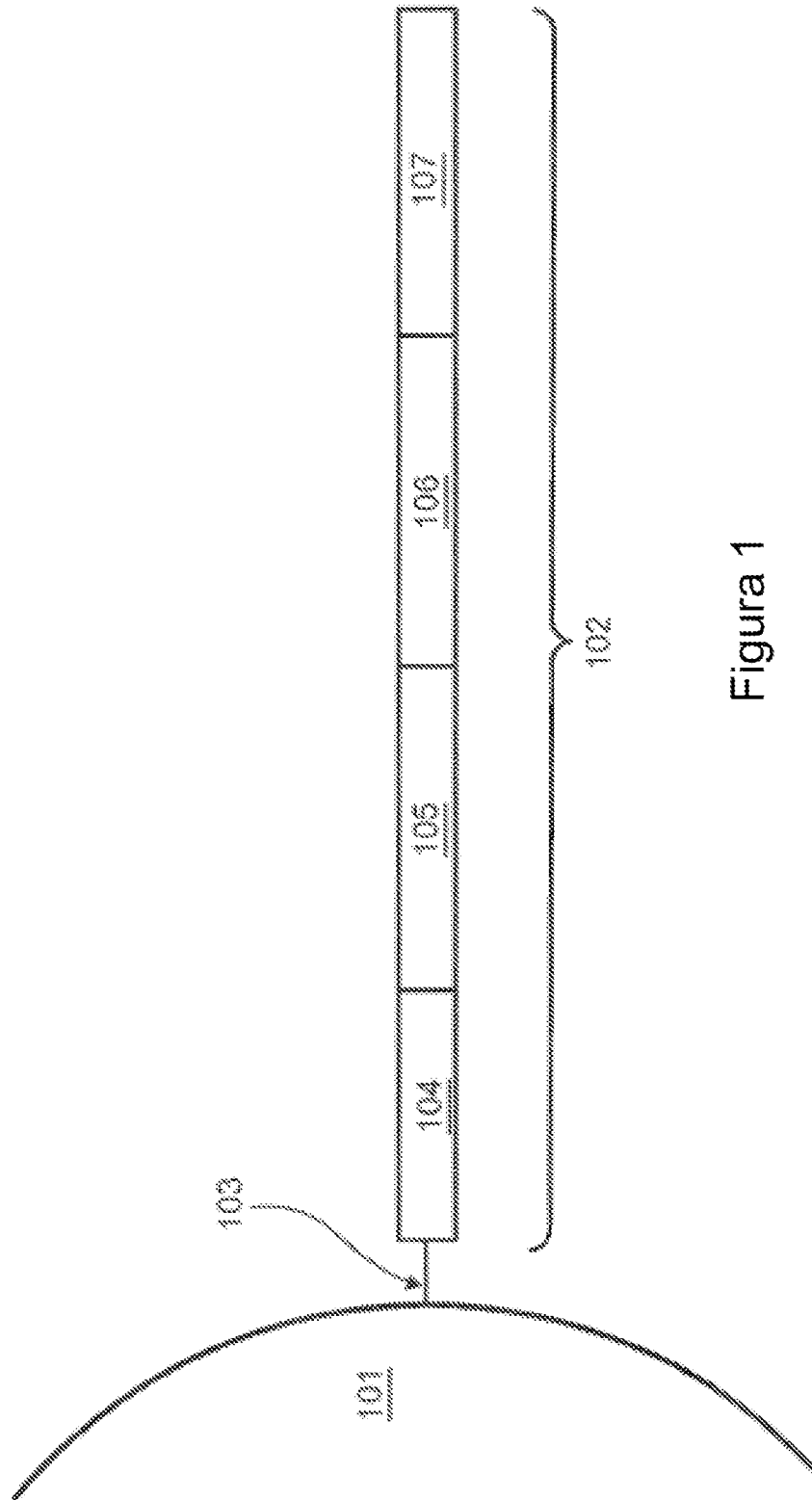


Figura 1

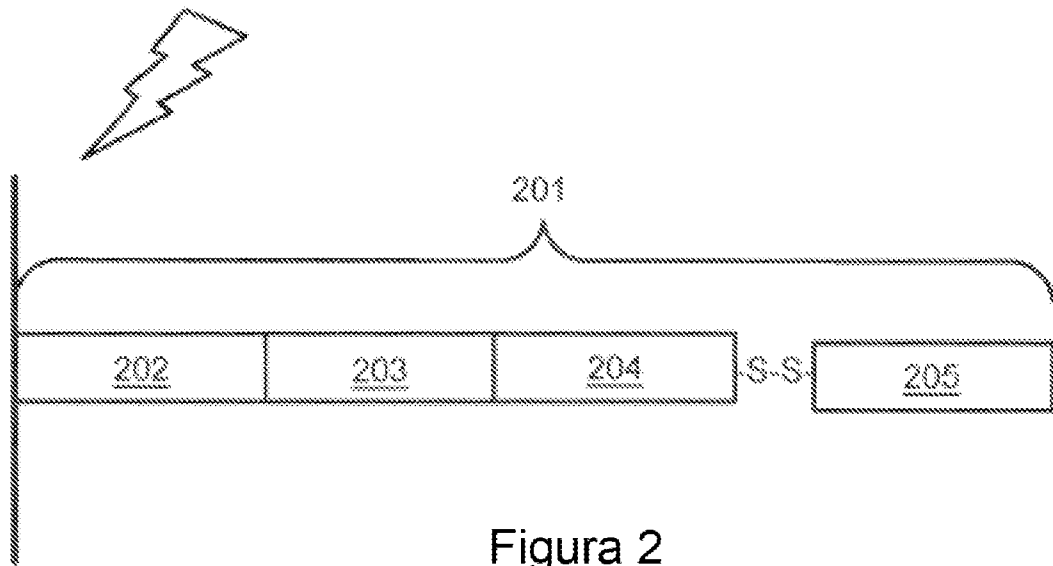


Figura 2

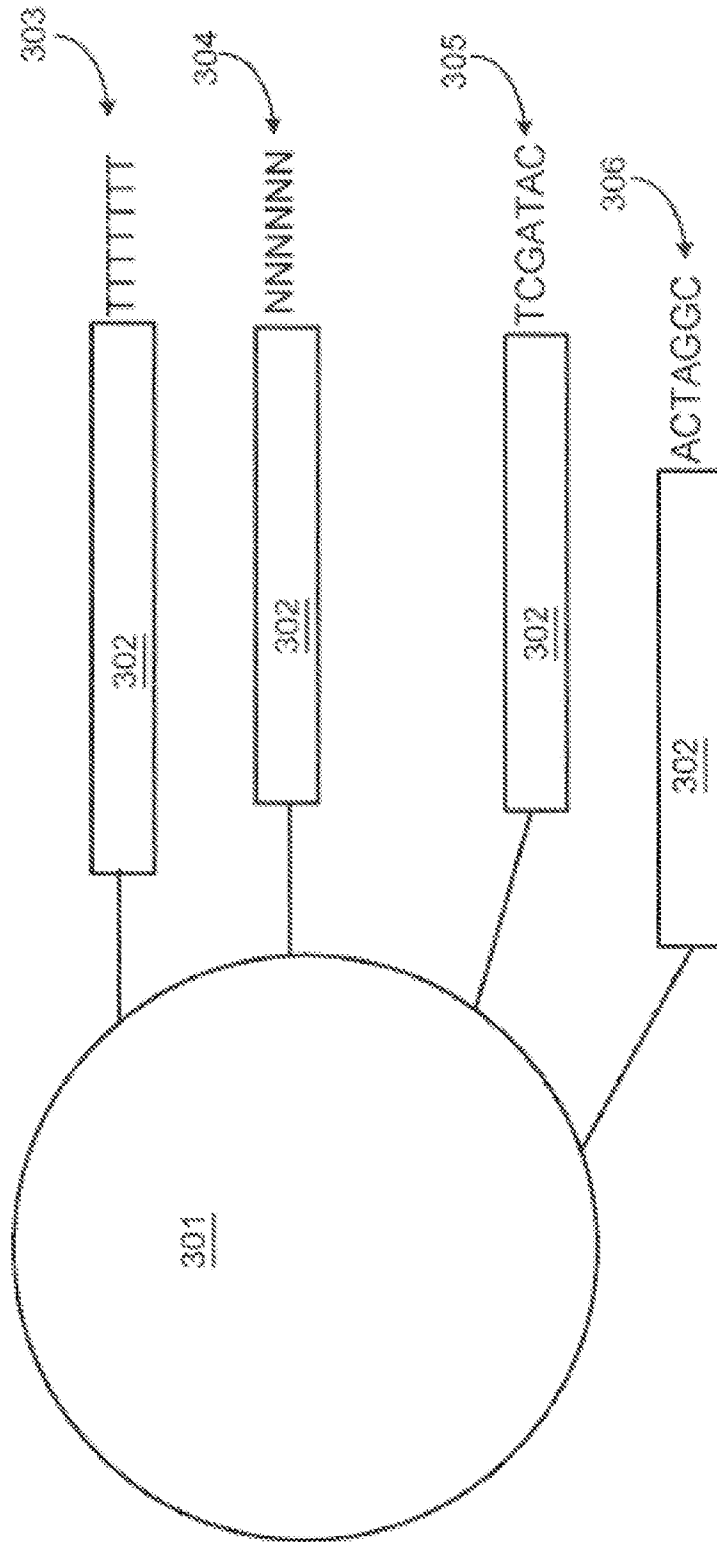


Figura 3

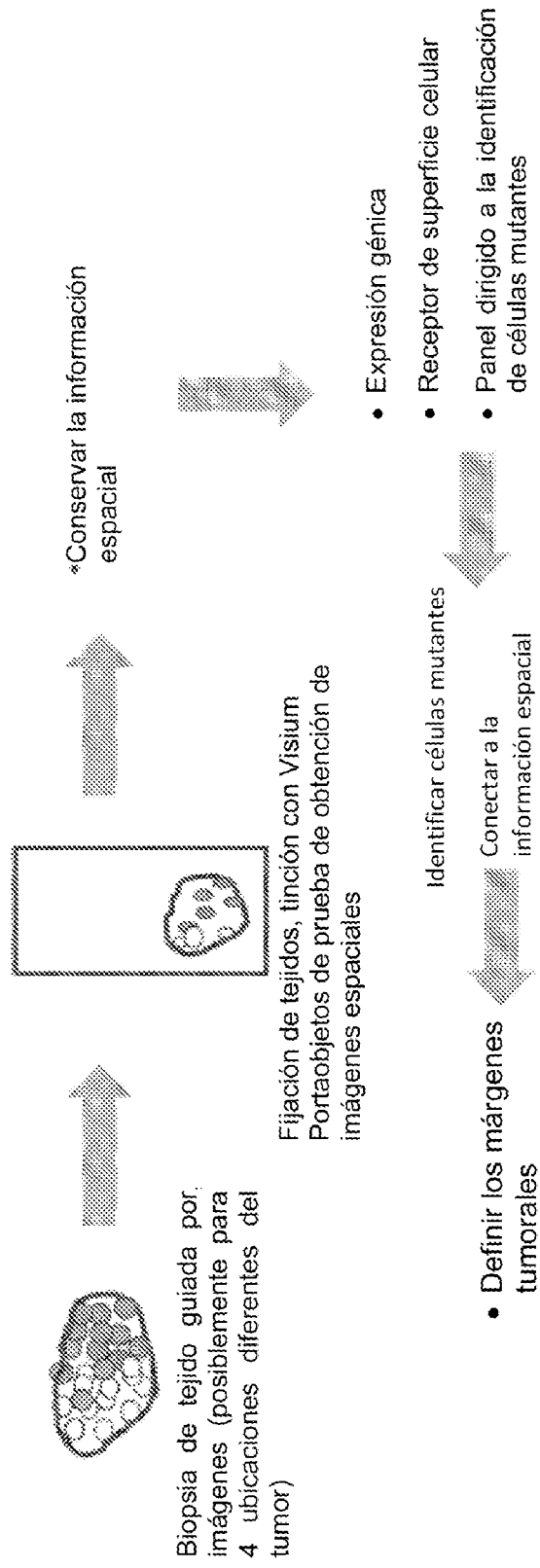


Figura 4