



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020023259-9 A2



(22) Data do Depósito: 16/05/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 23/02/2021

(54) Título: BIOMARCADORES DE ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL NO SANGUE

(51) Int. Cl.: G01N 33/68.

(30) Prioridade Unionista: 16/05/2018 EP 18305600.1.

(71) Depositante(es): INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE); CENTRE HOSPITALIER RÉGIONAL ET UNIVERSITAIRE DE BREST; ÉTABLISSEMENT FRANÇAIS DU SANG; UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE.

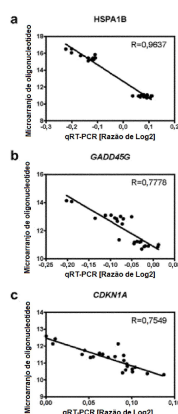
(72) Inventor(es): SERGE TIMSIT; EMMANUELLE GENIN.

(86) Pedido PCT: PCT EP2019062653 de 16/05/2019

(87) Publicação PCT: WO 2019/219831 de 21/11/2019

(85) Data da Fase Nacional: 13/11/2020

(57) Resumo: BIOMARCADORES DE ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL NO SANGUE Acidente vascular cerebral é um distúrbio devastador que contribui significativamente para os custos de morte, invalidez e saúde. O desafio atual é prevenir a morte celular tardia, com terapia concomitante para ampliar a janela terapêutica. Um método de diagnóstico potencial para acidente vascular cerebral é o uso de RNA no sangue como um biomarcador, que é um campo emergente na medicina. Nesse documento, foi explorada a expressão de genes após o início da isquemia cerebral no cérebro e no sangue. O estudo de dados de expressão de microarranjo de macacos do gênero *Macaca* do cérebro e do sangue revelou que as amostras isquêmicas e não isquêmicas podem ser distinguidas com base em seus perfis de expressão, e a maioria dos genes expressados de forma altamente diferencial é regulada positivamente no cenário isquêmico 6 horas após a isquemia. Uma comparação de genes expressados diferencialmente no cérebro e no sangue revelou uma sobreposição significativa dos padrões de expressão gênica. Os dados mostraram que existe uma assinatura comum entre o cérebro isquêmico e o sangue e apoiam o desenvolvimento da transcriptômica do sangue como uma ferramenta para a perfilação de expressão do transcriptoma de biópsia para caracterizar (...).



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para:
"BIOMARCADORES DE ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL NO SANGUE"

Campo da invenção

[001] A presente invenção se refere a biomarcadores sanguíneos de acidente vascular cerebral e seus usos, em particular, para monitorar a eficiência de terapias em acidente vascular cerebral isquêmico, para fins de diagnóstico, prognóstico de curto e longo prazo, bem como para avaliação de risco.

Fundamentos da invenção

[002] O AVC é a segunda causa de morte em todo o mundo e a terceira causa de deficiência (McKay & Mensah, **2005**. *The atlas of heart disease and stroke* (1ª ed.). Genebra: World Health Organization). A isquemia cerebral focal, isto é, acidente vascular cerebral isquêmico, leva a lesão grave e rápida do tecido no centro do infarto. Após a lesão inicial, a morte das células cerebrais progride lentamente, estendendo-se para uma área heterogênea ao redor do núcleo chamada de penumbra (Astrup *et al.*, **1977**. *Stroke*. **8(1)**:51-7). Salvar a penumbra isquêmica melhora os resultados em termos de deficiência (Emberson *et al.*, **2014**. *Lancet*. **384(9958)**: 1929-35).

[003] Até o momento, a única solução terapêutica de emergência é a recanalização por trombólise e/ou trombectomia. No entanto, devido à janela de intervenção

curta (<6 horas para recanalização e 4h30 para trombólise) e risco de transformação hemorrágica, apenas uma pequena porcentagem de pacientes com AVC isquêmico agudo são elegíveis para este tratamento. Por exemplo, estima-se que entre todos os pacientes que chegam dentro de 6 horas em um centro de AVC abrangente, apenas 10,5% são endovasculares elegíveis para trombectomia de acordo com os critérios da AHA/ASA (Vanacker et al., 2016. *Stroke*. **47 (7)**: 1844-9).

[004] Portanto, o desenvolvimento de uma nova estratégia terapêutica que amplie a janela terapêutica é um grande problema de saúde pública. Embora vários ensaios clínicos tenham falhado antes, desde o advento da recanalização, a neuroproteção associada à recanalização permanece uma estratégia potencialmente promissora para ampliar a janela terapêutica. Evidências crescentes sugerem que proteínas periféricas, ácidos nucleicos ou lipídios podem ser usados para confirmar o diagnóstico de AVC isquêmico e monitorar a progressão da doença. Até o momento, no entanto, nenhum foi implementado na prática clínica (Kim et al., 2013. *J Stroke*. **15 (1)**: 27-37).

[005] Os testes de biomarcadores referem-se a exames de imagem, químicos ou outros testes biológicos que podem ser usados para avaliar qualitativamente ou medir quantitativamente a presença ou ausência de um ou vários marcadores, indicativos da presença, progresso ou gravidade

de uma doença, ou dos efeitos de um tratamento. A imagem do sistema nervoso central (SNC) fez grandes progressos, mas a identificação de marcadores biológicos periféricos, por outro lado, está menos avançada. Identificar biomarcadores sanguíneos para serem aplicados como biomarcadores robustos para doenças e tratamento do SNC é um dos desafios mais importantes da neurologia moderna, pois o sangue não tem contato direto com o cérebro.

[006] O uso de RNA no sangue como um marcador diagnóstico é um campo emergente que é apoiado por sua aplicação clínica no diagnóstico de câncer de mama, doença arterial coronariana e doença infecciosa (Rothstein & Jickling, **2013**. *Biomark Med.* **7** (1): 37-47). Além disso, o RNA no sangue pode ser usado como um diagnóstico complementar para avaliar o efeito de um agente neuroprotetor nos primeiros ensaios clínicos. Estudos de RNA como um biomarcador diagnóstico no AVC isquêmico agudo são raros, incluindo apenas um pequeno número de pacientes, entre os quais apenas alguns pacientes na fase aguda do infarto (Tang et al., **2006**. *J Cereb Blood Flow Metab.* **26**(8):1089-102; Stamova et al., **2010**. *Stroke.* **41** (10): 2171-7) para codificação de RNA. Recentemente, tem havido um crescente interesse específico no RNA não codificante como biomarcadores potenciais no AVC como fator de risco, mas não na fase aguda do infarto com AVC (Mick et al., **2017**. *Stroke.*

48 (4): 828-834).

[007] A análise do transcriptoma tem sido usada em muitos estudos experimentais com isquemia cerebral para medir as mudanças na expressão gênica. A maioria dos estudos transcriptômicos experimentais foi realizada em ratos e camundongos em modelos de isquemia focal ou global (para uma revisão, ver *Cox-Limpens et al., 2014. Brain Res. 1564*: 85-100). Além da isquemia, o pré-condicionamento também tem sido usado como uma ferramenta para estudar a proteção cerebral endógena em roedores. Resultados de estudos de microarranjo que examinaram o transcriptoma nesses roedores mostraram que genes iniciais imediatos, genes de resposta ao estresse, genes de apoptose, genes de transdução de sinal, genes de neurotransmissão, genes de canais iônicos, genes de inflamação, genes do citoesqueleto, genes ribossomais e genes de fatores neurotróficos sofrem expressão mudanças durante a isquemia cerebral (*Schmidt-Kastner et al., 2002. Brain Res Mol Brain Res. 108 (1-2)*: 81-93; Büttner et al., 2009. *Brain Res. 1252*: 1-14; Wang et al., 2011. *Brain Res. 1372*: 13-21; Wang et al., 2012. *Neuroscience. 220*: 100-8; Lu et al., 2004. *J Neurosci Res. 77(6)*:843-57). No entanto, até onde sabemos, apenas alguns experimentos foram realizados em primatas (*Cook et al., 2012. Nature. 483 (7388)*: 213-7; Cook e Tymianski, 2012. *Neurotherapeutics. 9 (2)*: 371-9). Os primatas representam modelos únicos para estudar a isquemia

cerebral, uma vez que possuem genomas altamente semelhantes aos humanos, bem como homologia anatômica. Por exemplo, tanto os primatas quanto os humanos têm cérebros não lissencefálicos (ou seja, que exibem convoluções no córtex; girencefálico), ao contrário dos roedores, que não apresentam. Além disso, os transcriptomas do córtex cerebral, tanto em humanos quanto em chimpanzés, são muito semelhantes entre si e diferem mais entre os indivíduos do que entre as regiões dentro de um indivíduo (*Khaitovich et al.*, **2004**. *Genome Res.* **14** (8): 1462-73).

[008] Quatro razões principais para a falta de sucesso na tradução de terapias neuroprotetoras de estudos em animais para aplicação em humanos foram identificadas (Moretti et al., **2015**. *Pharmacol Ther.* **146**: 23-34; Timsit & Menn, **2012**. *Clin Pharmacol Ther.* **91** (2): 327-32):

a má qualidade dos estudos pré-clínicos:

para estudos pré-clínicos, o desafio neste campo está sendo progressivamente superado por meio do desenvolvimento de critérios de pontuação de qualidade em estudos pré-clínicos, por exemplo, os critérios STAIR (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR), **1999**. *Stroke*. **30** (12): 2752-8; Fisher et al., **2009**. *Stroke*. **40** (6): 2244-50); e de estudos cegos randomizados em humanos (Llovera et al., **2015**. *Sci Transl Med.* **7** (299): 299ra121).

a ausência de biomarcadores biológicos de

farmacodinâmica associados no início do desenvolvimento clínico:

biomarcadores companheiros para desenvolver drogas são cada vez mais usados. Para ganhar confiança se a eficácia pode ser alcançada em pacientes doentes com doses seguras, antes dos grandes investimentos necessários em estágios posteriores, estudos clínicos de fase Ib de duração relativamente curta são conduzidos em um pequeno número de pacientes com a doença relevante. Esta é a aplicação mais importante de alguns dos biomarcadores farmacodinâmicos (Zhao *et al.*, **2015**. *Clin Chem.* **61** (11): 1343-53).

a ausência de biomarcadores de imagem preditivos em estudos humanos de fase II para estimar a penumbra:

a seleção de pacientes com base em imagens cerebrais para identificar pacientes adequados para tromboectomia agora é instrumental, conforme mostrado no estudo DAWN para salvar a penumbra em pacientes selecionados (Jovin *et al.*, **2017**. *Int J Stroke.* **12** (6): 641-652; Chaisinanunkul *et al.*, **2015**. *Stroke.* **46** (8): 2238-43; Nogueira *et al.*, **2018**. *N Engl J Med.* **378** (1): 11-21). Apenas alguns estudos em neuroproteção realizaram a seleção com base nas características da penumbra (para uma revisão, ver Donnan *et al.*, **2009**. *Lancet Neurol.* **8** (3): 261-9). Hoje, este novo conceito pode oferecer um caminho útil para a intervenção terapêutica (Hillis & Baron, 2015. *Front Neurol.* **6**:85) enquanto espera pela recanalização

ou reperfusão.

a ausência de recanalização *in fine*:

a trombectomia está se tornando o tratamento padrão na fase aguda do AVC isquêmico, embora seu uso precise ser disseminado. Estima-se que entre todos os pacientes que chegam dentro de 6 horas em um centro de AVC abrangente, apenas 10,5% são endovasculares elegíveis para trombectomia de acordo com os critérios da AHA/ASA (Vanacker et al., 2016. *Stroke*. **47 (7)**: 1844-9).

[009] Uma melhor compreensão dos padrões de expressão gênica em tecidos submetidos à isquemia cerebral pode melhorar as técnicas de diagnóstico. Aqui, os inventores exploraram a expressão de genes após o início da isquemia cerebral no cérebro e no sangue. O estudo de dados de expressão de microarranjo de macacos do cérebro e do sangue revelou que amostras isquêmicas e não isquêmicas podem ser distinguidas com base em seus perfis de expressão, e a maioria dos genes expressados de forma altamente diferencial são regulados positivamente no cenário isquêmico 6 horas após a isquemia. Uma comparação de genes expressos diferencialmente no cérebro e no sangue revelou uma sobreposição significativa dos padrões de expressão gênica. Surpreendentemente, os dados mostraram que existe uma assinatura de codificação comum entre o cérebro isquêmico e o sangue, o que apoia o desenvolvimento da transcriptômica

do sangue como uma ferramenta de perfil de expressão do transcriptoma de biópsia para caracterizar pacientes com AVC isquêmico, para desenvolver um biomarcador companheiro para a avaliação de drogas de neuroproteção em pacientes.

Sumário

[0010] A presente invenção se refere a um método para diagnosticar um AVC em um indivíduo, compreendendo:

determinar uma assinatura em uma amostra obtida do indivíduo medindo os níveis de expressão de pelo menos dois biomarcadores selecionados do grupo que consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*,

de preferência com a condição de que os pelo menos dois biomarcadores não consistam em *DUSP1* e *ADM*;

comparar a assinatura determinada na etapa i) com uma assinatura de referência; e

diagnosticar o indivíduo como sendo afetado com um acidente vascular cerebral quando os níveis de expressão de pelo menos dois biomarcadores na assinatura são mais elevados do que os níveis de expressão dos mesmos, pelo menos, dois biomarcadores na assinatura de referência.

[0011] Em uma modalidade, a etapa i) do método de diagnóstico de um AVC em um indivíduo compreende medir os níveis de expressão de pelo menos três biomarcadores selecionados do grupo que consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*.

[0012] Em uma modalidade, a etapa i) do método de diagnóstico de um AVC em um indivíduo compreende medir os níveis de expressão de *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*.

[0013] Em uma modalidade, a assinatura de referência é obtida medindo os níveis de expressão dos biomarcadores em uma população de referência de indivíduos substancialmente saudáveis.

[0014] Em uma modalidade, o método para diagnosticar um AVC em um indivíduo de acordo com a presente invenção visa distinguir um AVC de um simulado de AVC.

[0015] A presente invenção se refere ainda a um método para determinar se um indivíduo que sofre de um acidente vascular cerebral irá obter uma resposta com uma terapia, compreendendo:

[0016] determinar uma assinatura em uma amostra obtida do indivíduo medindo os níveis de expressão de pelo menos dois biomarcadores selecionados do grupo que consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*;

de preferência com a condição de que os pelo menos dois biomarcadores não consistam em *DUSP1* e *ADM*

comparar a assinatura determinada na etapa i) com uma assinatura de referência; e

concluir que o indivíduo atinge uma resposta quando os níveis de expressão de pelo menos dois biomarcadores na

assinatura são inferiores aos níveis de expressão dos mesmos, pelo menos, dois biomarcadores na assinatura de referência.

[0017] Em uma modalidade, a etapa i) do método para determinar se um indivíduo que sofre de um acidente vascular cerebral alcançará uma resposta com uma terapia compreende medir os níveis de expressão de nove biomarcadores selecionados de *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *G0S2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*.

[0018] Em uma modalidade, a assinatura de referência é obtida medindo os níveis de expressão dos biomarcadores em uma amostra obtida do mesmo indivíduo antes do início da referida terapia.

[0019] A presente invenção se refere a um método para determinar se um indivíduo está em risco de ter um acidente vascular cerebral, compreendendo:

[0020] determinar uma assinatura em uma amostra obtida do indivíduo medindo os níveis de expressão de pelo menos dois biomarcadores selecionados do grupo que consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *G0S2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*;

de preferência com a condição de que os pelo menos dois biomarcadores não consistam em *DUSP1* e *ADM*

comparar a assinatura determinada na etapa i) com uma assinatura de referência; e

concluir que o indivíduo está em risco de ter acidente vascular cerebral quando os níveis de expressão de pelo menos

três biomarcadores na assinatura são mais elevados do que os níveis de expressão dos mesmos, pelo menos, três biomarcadores na assinatura de referência.

[0021] Em uma modalidade, a etapa i) do método para determinar se um indivíduo com risco de sofrer de um AVC compreende medir os níveis de expressão de nove biomarcadores selecionados de *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *G0S2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*.

[0022] Em uma modalidade, a assinatura de referência é obtida medindo os níveis de expressão dos biomarcadores em uma população de referência de indivíduos substancialmente saudáveis.

[0023] Em uma modalidade, o indivíduo sofreu um AVC e o método para determinar se um indivíduo está em risco de ter um acidente vascular cerebral é para determinar se o indivíduo está em risco de ter um AVC recorrente.

[0024] Em uma modalidade pertencente a qualquer um dos métodos da invenção, acidente vascular cerebral é acidente vascular cerebral isquêmico, ataque isquêmico transitório ou um acidente vascular cerebral hemorrágico.

[0025] Em uma modalidade pertencente a qualquer um dos métodos da invenção, a amostra é uma amostra de sangue, amostra de plasma ou amostra de soro.

[0026] Em uma modalidade pertencente a qualquer um dos métodos da invenção, a amostra não é uma amostra de cérebro.

Definições

[0027] Na presente invenção, os seguintes termos têm os seguintes significados:

[0028] "**Acidente vascular cerebral**", conforme usado neste documento, refere-se a qualquer condição decorrente de uma interrupção, diminuição ou interrupção do fluxo sanguíneo ou de oxigênio para qualquer parte do cérebro. Em particular, o termo "**acidente vascular cerebral**"; abrange, sem limitação, acidente vascular cerebral isquêmico, ataque isquêmico transitório (TIA) e acidente vascular cerebral hemorrágico.

[0029] "**AVC isquêmico**" (ou "IS") é um episódio de disfunção neurológica causada por isquemia focal no cérebro, medula espinhal ou retina com evidência de infarto agudo (Easton et al., 2009. **Stroke**. 40 (6): 2276-2293). Existem pelo menos quatro causas diferentes de interrupção do fluxo sanguíneo:

um coágulo de sangue em um vaso sanguíneo;

um coágulo de sangue nos seios venosos durais, que drena o sangue do cérebro;

um êmbolo obstruindo um vaso sanguíneo; e/ou

uma queda repentina da pressão arterial.

[0030] Os sintomas do AVC podem persistir, e frequentemente persistem além de 24 horas se o paciente sobreviver ao dano inicial.

[0031] "**Ataque isquêmico transitório**" ou "**TIA**", também chamado de mini-AVC, é um episódio transitório de disfunção neurológica causada por cérebro focal, medula espinhal ou isquemia retinal sem evidência de infarto agudo. Os sintomas de TIA podem inicialmente ser iguais aos de um acidente vascular cerebral, exceto que os sintomas duram pouco tempo, normalmente menos de uma hora ou no máximo 24 horas. Mesmo que um TIA seja temporário e geralmente não cause danos ao tecido cerebral, um paciente com TIA é aconselhado a procurar ajuda profissional imediatamente devido à semelhança dos sintomas e porque o TIA é um fator de risco para AVC isquêmico subsequente.

[0032] "**AVC hemorrágico**" refere-se a um AVC resultante de qualquer ruptura em qualquer vasculatura do cérebro.

[0033] Exemplos de distúrbios neurológicos agudos que incluem acidente vascular cerebral ou envolvem etiologia ou sintomas como aqueles observados com acidente vascular cerebral estão listados acima e incluem, sem limitação, isquemia cerebral ou infarto (incluindo oclusão embólica e oclusão trombótica), reperfusão após isquemia aguda, lesão hipóxia isquêmica perinatal, parada cardíaca, bem como hemorragias intracranianas de qualquer tipo (como, *por exemplo*, epidural, subdural, subaracnoide e intracerebral).

[0034] "**Indivíduo**", conforme usado neste documento, refere-se a um indivíduo a ser diagnosticado ou tratado de

acordo com os métodos da presente invenção. Os indivíduos incluem, porém, sem limitação, mamíferos (*por exemplo*, murinos, símios, equinos, bovinos, porcinos, caninos, felinos e semelhantes), de preferência primatas e, com mais preferência, humanos. No contexto da invenção, o termo "**paciente**" geralmente se refere a um indivíduo que busca ou procurou um diagnóstico ou tratamento de acordo com os métodos da presente invenção.

[0035] "**Tratar**" ou "**tratamento**", tal como aqui utilizado, refere-se a aliviar uma condição específica (como um acidente vascular cerebral), eliminar ou reduzir os sintomas de uma condição (como um acidente vascular cerebral), retardar ou eliminar a progressão de uma condição (como um AVC), e prevenir ou retardar a ocorrência inicial de uma condição (como um AVC) em um indivíduo, ou prevenir ou retardar a recorrência de uma condição (como um AVC) em um indivíduo previamente afetado.

[0036] "**Diagnosticar**" ou "**diagnóstico**", conforme usado neste documento, refere-se à avaliação do desenvolvimento ou progressão de uma condição (como um acidente vascular cerebral). Como é conhecido por um versado na técnica, a avaliação pode ser realizada com precisão para um indivíduo estatisticamente significativo, embora se pretenda ser precisa para 100% dos sujeitos a serem diagnosticados. A significância estatística pode ser facilmente determinada

por um versado na técnica usando métodos amplamente conhecidos na técnica, *por exemplo*, determinação do intervalo de confiança, determinação do valor p , teste t , teste de Mann-Whitney e semelhantes. Os intervalos de confiança preferidos são 90% ou mais, 95% ou mais, 97% ou mais, 98% ou mais e 99%. Um valor de p preferido é 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 ou 0,0001. De preferência, os resultados do diagnóstico de acordo com a presente invenção serão precisos para 60% ou mais, 70% ou mais, 80% ou mais, ou 90% ou mais de um grupo de indivíduos.

[0037] "**Prognóstico**" ou "**prognóstico**", conforme usado neste documento, refere-se a prever o resultado para um indivíduo com uma condição (como um acidente vascular cerebral), após um determinado tratamento ou intervenção.

[0038] "**Amostra de sangue**", tal como aqui utilizado, significa qualquer amostra de sangue derivada ou obtida de um indivíduo. As coletas de amostras de sangue podem ser realizadas por métodos bem conhecidos dos versados na técnica. Em algumas modalidades, a amostra de sangue é uma amostra de sangue total, uma amostra de soro ou uma amostra de plasma.

[0039] "**Biomarcador**", tal como aqui utilizado, refere-se a um conjunto de produtos de expressão gênica (*por exemplo*, mRNA e/ou proteína) que está associado a tecido cerebral ou lesão de células neurais e que pode ser

correlacionado com acidente vascular cerebral, mas de preferência não está correlacionado com outros tipos de lesão. Esses biomarcadores específicos de acidente vascular cerebral identificados no sangue pelos Inventores incluem *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*. Estes biomarcadores específicos são descritos em detalhes a seguir.

[0040] No presente relatório descritivo, o nome de cada um dos genes de interesse refere-se ao nome internacionalmente reconhecido do gene correspondente, conforme encontrado em sequências de genes reconhecidas internacionalmente e bancos de dados de sequências de proteínas, em particular no banco de dados do HUGO Gene Nomenclature Committee, que está disponível no seguinte endereço da Internet: <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/index.html>.

[0041] No presente relatório descritivo, o nome de cada um dos vários biomarcadores de interesse também pode se referir ao nome internacionalmente reconhecido do gene correspondente, conforme encontrado nas sequências de genes internacionalmente reconhecidas e bancos de dados de sequências de proteínas ENTRE ID, Genbank, TrEMBL ou ENSEMBL. Através destas bases de dados de sequências reconhecidas internacionalmente, as sequências de ácido nucleico correspondentes a cada um dos genes de interesse aqui

descritos podem ser recuperadas por um especialista na técnica.

[0042] "**PTGS2**", tal como aqui utilizado, tem o seu significado geral na técnica e refere-se ao gene da prostaglandina-endoperóxido sintase 2 (Gene ID: 5743). Uma sequência de aminoácidos humana exemplificativa codificada pelo gene "**PTGS2**" é representada pela sequência de referência NCBI NP_000954.1 (SEQ ID NO: 1). Uma sequência de mRNA humano exemplar do gene "**PTGS2**" é representada pela sequência de referência NCBI NM_000963.4 (SEQ ID NO: 2), com a sequência de codificação (CDS) variando do resíduo 134 ao resíduo 1948 da SEQ ID NO: 2.

[0043] "**HMOX1**", tal como aqui utilizado, tem o seu significado geral na técnica e refere-se ao gene heme oxigenase 1 (Gene ID: 3162). Uma sequência de aminoácidos humana exemplificativa codificada pelo gene "**HMOX1**" é representada pela sequência de referência NCBI NP_002124.1 (SEQ ID NO: 3). Uma sequência de mRNA humano exemplar do gene "**HMOX1**" é representada pela sequência de referência NCBI NM_002133.3 (SEQ ID NO: 4), com a sequência de codificação (CDS) variando do resíduo 79 ao resíduo 945 da SEQ ID NO: 4.

[0044] "**LDLR**", conforme usado neste documento, tem seu significado geral na técnica e se refere ao gene do receptor de lipoproteína de baixa densidade (Gene ID: 3949). Uma

sequência de aminoácidos humana exemplificativa codificada pelo gene "**LDLR**" é representada pela sequência de referência NCBI NP_000518.1 (SEQ ID NO: 5). Uma sequência de mRNA humano exemplar do gene "**LDLR**" é representada pela sequência de referência NCBI NM_000527.4 (SEQ ID NO: 6), com a sequência de codificação (CDS) variando do resíduo 188 ao resíduo 2770 da SEQ ID NO: 6.

[0045] "**HSPA1B**", tal como aqui utilizado, tem o seu significado geral na técnica e refere-se ao gene 1B do membro da família A da proteína de choque térmico (Hsp70) (Gene ID: 3304). Uma sequência de aminoácidos humana exemplificativa codificada pelo gene "**HSPA1B**" é representada pela sequência de referência NCBI NP_005337.2 (SEQ ID NO: 7). Uma sequência de mRNA humano exemplar do gene "**HSPA1B**" é representada pela sequência de referência NCBI NM_005346.5 (SEQ ID NO: 8), com a sequência de codificação (CDS) variando do resíduo 214 ao resíduo 2139 da SEQ ID NO: 8.

[0046] "**GOS2**", tal como aqui utilizado, tem o seu significado geral na técnica e refere-se ao gene G0/G1 switch 2 (Gene ID: 50486). Uma sequência de aminoácidos humana exemplificativa codificada pelo gene "**GOS2**" é representada pela sequência de referência NCBI NP_056529.1 (SEQ ID NO: 9). Uma sequência de mRNA humano exemplar do gene "**GOS2**" é representada pela sequência de referência NCBI NM_015714.4 (SEQ ID NO: 10), com a sequência de codificação (CDS)

variando do resíduo 171 ao resíduo 482 da SEQ ID NO: 10.

[0047] "**BAG3**", tal como aqui utilizado, tem o seu significado geral na técnica e refere-se ao gene atano gene 3 associado a BCL2 (Gene ID: 9531). Uma sequência de aminoácidos humana exemplificativa codificada pelo gene "**BAG3**" é representada pela sequência de referência NCBI NP_004272.2 (SEQ ID NO: 11). Uma sequência de mRNA humano exemplar do gene "**BAG3**" é representada pela sequência de referência NCBI NM_004281.3 (SEQ ID NO: 12), com a sequência de codificação (CDS) variando do resíduo 307 ao resíduo 2034 da SEQ ID NO: 12.

[0048] "**TM4SF1**", tal como aqui utilizado, tem o seu significado geral na técnica e refere-se ao gene 1 de seis membros da família transmembrana 4L (Gene ID: 4071). Uma sequência de aminoácidos humana exemplificativa codificada pelo gene "**TM4SF1**" é representada pela sequência de referência NCBI XP_016861874.1 (SEQ ID NO: 13). Uma sequência de mRNA humano exemplar do gene "**TM4SF1**" é representada pela sequência de referência NCBI XM_017006385.2 (SEQ ID NO: 14), com a sequência de codificação (CDS) variando do resíduo 235 ao resíduo 954 da SEQ ID NO: 14.

[0049] "**DUSP1**", conforme usado neste documento, tem seu significado geral na técnica e se refere ao gene da fosfatase 1 de especificidade dupla (Gene ID: 1843) Uma sequência de aminoácidos humana exemplificativa codificada pelo gene

"**DUSP1**" é representada pela sequência de referência NCBI NP_004408.1 (SEQ ID NO: 15). Uma sequência de mRNA humano exemplar do gene "**DUSP1**" é representada pela sequência de referência NCBI NM_004417.4 (SEQ ID NO: 16), com a sequência de codificação (CDS) variando do resíduo 244 ao resíduo 1347 da SEQ ID NO: 16.

[0050] "**ADM**", tal como aqui utilizado, tem o seu significado geral na técnica e refere-se ao gene da adrenomedulina (Gene ID: 133). Uma sequência de aminoácidos humana exemplificativa codificada pelo gene "**ADM**" é representada pela sequência de referência NCBI NP_001115.1 (SEQ ID NO: 17). Uma sequência de mRNA humano exemplar do gene "**ADM**" é representada pela sequência de referência NCBI NM_001124.3 (SEQ ID NO: 18), com a sequência de codificação (CDS) variando do resíduo 179 ao resíduo 736 da SEQ ID NO: 18.

Descrição detalhada

[0051] A presente invenção se refere a uma assinatura de acidente vascular cerebral, em que a referida assinatura compreende biomarcadores cujos níveis de expressão são específicos ou indicativos de um acidente vascular cerebral. Esses biomarcadores serão doravante referidos como um "**biomarcador de AVC**".

[0052] Em uma modalidade, a assinatura da invenção é específica ou indicativa de acidente vascular cerebral. Em

uma modalidade, a assinatura da invenção é específica ou indicativa de acidente vascular cerebral isquêmico, miniacidente vascular cerebral (também conhecido como ataque isquêmico transitório, TIA) e/ou acidente vascular cerebral hemorrágico (em particular, acidente vascular cerebral hemorrágico causado por hemorragia intracerebral). Em uma modalidade, a assinatura da invenção é específica ou indicativa de acidente vascular cerebral isquêmico. Em uma modalidade, a assinatura da invenção é específica ou indicativa de ataque isquêmico transitório. Em uma modalidade, a assinatura da invenção é específica ou indicativa de acidente vascular cerebral hemorrágico (em particular, acidente vascular cerebral hemorrágico causado por hemorragia intracerebral).

[0053] Em uma modalidade, a assinatura da invenção compreende ou consiste em pelo menos um biomarcador de acidente vascular cerebral. Em uma modalidade, a assinatura da invenção compreende ou consiste em pelo menos dois biomarcadores de acidente vascular cerebral. Em uma modalidade, a assinatura da invenção compreende ou consiste em pelo menos três biomarcadores de acidente vascular cerebral. Em uma modalidade, a assinatura da invenção compreende ou consiste em pelo menos quatro biomarcadores de acidente vascular cerebral. Em uma modalidade, a assinatura da invenção compreende ou consiste em pelo menos cinco

biomarcadores de acidente vascular cerebral. Em uma modalidade, a assinatura da invenção compreende ou consiste em pelo menos seis biomarcadores de acidente vascular cerebral. Em uma modalidade, a assinatura da invenção compreende ou consiste em pelo menos sete biomarcadores de acidente vascular cerebral. Em uma modalidade, a assinatura da invenção compreende ou consiste em pelo menos oito biomarcadores de acidente vascular cerebral. Em uma modalidade, a assinatura da invenção compreende ou consiste em pelo menos nove biomarcadores de acidente vascular cerebral.

[0054] Em uma modalidade, os biomarcadores de AVC são selecionados do grupo que compreende ou consiste em *HSPA1B*, *NPAS4*, *DNAJB1*, *ATF3*, *HSPB1*, *RRAD*, *NR4A1*, *CYR61*, *C-FOS*, *GADD45G*, *RGS1*, *ARC*, *EGR4*, *PTGS2*, *RGS2*, *CCL3*, *BAG3*, *EGR2*, *HSPA4L*, *ADM*, *TM4SF1*, *EGR1*, *DUSP1*, *BTG2*, *LOC715456*, *HMOX1*, *LDLR*, *DNAJA4*, *MCL1*, *HSPA6*, *GADD45B*, *IL6*, *ADFP*, *HES4*, *DUSP5*, *GEM* e *GOS2*.

[0055] Em uma modalidade, os biomarcadores de acidente vascular cerebral são selecionados a partir do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*.

[0056] Em uma modalidade, os biomarcadores de acidente vascular cerebral são selecionados do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3* e

TM4SF1.

[0057] Em uma modalidade, a assinatura da invenção compreende ou consiste em pelo menos um biomarcador de acidente vascular cerebral selecionado do grupo que compreende ou consiste em *HSPA1B*, *NPAS4*, *DNAJB1*, *ATF3*, *HSPB1*, *RRAD*, *NR4A1*, *CYR61*, *C-FOS*, *GADD45G*, *RGS1*, *ARC*, *EGR4*, *PTGS2*, *RGS2*, *CCL3*, *BAG3*, *EGR2*, *HSPA4L*, *ADM*, *TM4SF1*, *EGR1*, *DUSP1*, *BTG2*, *LOC715456*, *HMOX1*, *LDLR*, *DNAJA4*, *MCL1*, *HSPA6*, *GADD45B*, *IL6*, *ADFP* e *HES4*, *IL6*, *ADFP* e *HES4*, *HES4* *GOS2*.

[0058] Em uma modalidade, a assinatura da invenção compreende ou consiste em pelo menos um biomarcador de acidente vascular cerebral selecionado do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*.

[0059] Em uma modalidade, a assinatura da invenção compreende ou consiste em pelo menos um biomarcador de acidente vascular cerebral selecionado do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3* e *TM4SF1*.

[0060] Em uma modalidade, a assinatura da invenção compreende ou consiste em pelo menos dois biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados do grupo que compreende ou consiste em *HSPA1B*, *NPAS4*, *DNAJB1*, *ATF3*, *HSPB1*, *RRAD*, *NR4A1*, *CYR61*, *C-FOS*, *GADD45G*, *RGS1*, *ARC*, *EGR4*, *PTGS2*, *RGS2*, *CCL3*, *BAG3*, *EGR2*, *HSPA4L*, *ADM*, *TM4SF1*, *EGR1*, *DUSP1*,

BTG2, LOC715456, HMOX1, LDLR, DNAJA4, MCL1, HSPA6, GADD45B, IL6, ADFP e HES4, IL6, ADFP e HES4, HES4 GOS2.

[0061] Em uma modalidade, a assinatura da invenção compreende ou consiste em pelo menos dois biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2, HMOX1, LDLR, HSPA1B, GOS2, BAG3, TM4SF1, DUSP1* e *ADM*.

[0062] Em uma modalidade, a assinatura da invenção compreende ou consiste em pelo menos dois biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2, HMOX1, LDLR, HSPA1B, GOS2, BAG3* e *TM4SF1*.

[0063] Em uma modalidade, a assinatura da invenção compreende ou consiste em pelo menos dois biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2, HMOX1, LDLR, HSPA1B, GOS2, BAG3, TM4SF1, DUSP1* e *ADM*, com a condição de que em pelo menos dois biomarcadores não consistem em *DUSP1* e *ADM*.

[0064] Em uma modalidade, a assinatura da invenção compreende ou consiste em pelo menos três biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados do grupo que compreende ou consiste em *HSPA1B, NPAS4, DNAJB1, ATF3, HSPB1, RRAD, NR4A1, CYR61, C-FOS, GADD45G, RGS1, ARC, EGR4, PTGS2, RGS2, CCL3, BAG3, EGR2, HSPA4L, ADM, TM4SF1, EGR1, DUSP1, BTG2, LOC715456, HMOX1, LDLR, DNAJA4, MCL1, HSPA6, GADD45B,*

IL6, *ADFP* e *HES4*, *IL6*, *ADFP* e *HES4*, *HES4* *GOS2*.

[0065] Em uma modalidade, a assinatura da invenção compreende ou consiste em pelo menos três biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*.

[0066] Em uma modalidade, a assinatura da invenção compreende ou consiste em pelo menos três biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3* e *TM4SF1*.

[0067] Em uma modalidade, a assinatura da invenção compreende ou consiste em pelo menos quatro biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados do grupo que compreende ou consiste em *HSPA1B*, *NPAS4*, *DNAJB1*, *ATF3*, *HSPB1*, *RRAD*, *NR4A1*, *CYR61*, *C-FOS*, *GADD45G*, *RGS1*, *ARC*, *EGR4*, *PTGS2*, *RGS2*, *CCL3*, *BAG3*, *EGR2*, *HSPA4L*, *ADM*, *TM4SF1*, *EGR1*, *DUSP1*, *BTG2*, *LOC715456*, *HMOX1*, *LDLR*, *DNAJA4*, *MCL1*, *HSPA6*, *GADD45B*, *IL6*, *ADFP*, *HES4*, *DUSP5*, *GEM* e *GOS2*.

[0068] Em uma modalidade, a assinatura da invenção compreende ou consiste em pelo menos quatro biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*.

[0069] Em uma modalidade, a assinatura da invenção

compreende ou consiste em pelo menos quatro biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3* e *TM4SF1*.

[0070] Em uma modalidade, a assinatura da invenção compreende ou consiste em pelo menos cinco biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados do grupo que compreende ou consiste em *HSPA1B*, *NPAS4*, *DNAJB1*, *ATF3*, *HSPB1*, *RRAD*, *NR4A1*, *CYR61*, *C-FOS*, *GADD45G*, *RGS1*, *ARC*, *EGR4*, *PTGS2*, *RGS2*, *CCL3*, *BAG3*, *EGR2*, *HSPA4L*, *ADM*, *TM4SF1*, *EGR1*, *DUSP1*, *BTG2*, *LOC715456*, *HMOX1*, *LDLR*, *DNAJA4*, *MCL1*, *HSPA6*, *GADD45B*, *IL6*, *ADFP*, *HES4*, *DUSP5*, *GEM* e *GOS2*.

[0071] Em uma modalidade, a assinatura da invenção compreende ou consiste em pelo menos cinco biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*.

[0072] Em uma modalidade, a assinatura da invenção compreende ou consiste em pelo menos cinco biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3* e *TM4SF1*.

[0073] Em uma modalidade, a assinatura da invenção compreende ou consiste em pelo menos seis biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados do grupo que

compreende ou consiste em *HSPA1B*, *NPAS4*, *DNAJB1*, *ATF3*, *HSPB1*, *RRAD*, *NR4A1*, *CYR61*, *C-FOS*, *GADD45G*, *RGS1*, *ARC*, *EGR4*, *PTGS2*, *RGS2*, *CCL3*, *BAG3*, *EGR2*, *HSPA4L*, *ADM*, *TM4SF1*, *EGR1*, *DUSP1*, *BTG2*, *LOC715456*, *HMOX1*, *LDLR*, *DNAJA4*, *MCL1*, *HSPA6*, *GADD45B*, *IL6*, *ADFP*, *HES4*, *DUSP5*, *GEM* e *G0S2*.

[0074] Em uma modalidade, a assinatura da invenção compreende ou consiste em pelo menos seis biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *G0S2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*.

[0075] Em uma modalidade, a assinatura da invenção compreende ou consiste em pelo menos seis biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *G0S2*, *BAG3* e *TM4SF1*.

[0076] Em uma modalidade, a assinatura da invenção compreende ou consiste em pelo menos sete biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados do grupo que compreende ou consiste em *HSPA1B*, *HSPA1B*, *NPAS4*, *DNAJB1*, *ATF3*, *HSPB1*, *RRAD*, *NR4A1*, *CYR61*, *C-FOS*, *GADD45G*, *RGS1*, *ARC*, *EGR4*, *PTGS2*, *RGS2*, *CCL3*, *BAG3*, *EGR2*, *HSPA4L*, *ADM*, *TM4SF1*, *EGR1*, *DUSP1*, *BTG2*, *LOC715456*, *HMOX1*, *LDLR*, *DNAJA4*, *MCL1*, *HSPA6*, *GADD45B*, *IL6*, *ADFP*, *HES4*, *DUSP5*, *GEM* e *G0S2*.

[0077] Em uma modalidade, a assinatura da invenção compreende ou consiste em pelo menos sete biomarcadores de

acidente vascular cerebral selecionados do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*.

[0078] Em uma modalidade, a assinatura da invenção compreende ou consiste em pelo menos sete biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3* e *TM4SF1*.

[0079] Em uma modalidade, a assinatura da invenção compreende ou consiste em pelo menos oito biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados do grupo que compreende ou consiste em *HSPA1B*, *NPAS4*, *DNAJB1*, *ATF3*, *HSPB1*, *RRAD*, *NR4A1*, *CYR61*, *C-FOS*, *GADD45G*, *RGS1*, *ARC*, *EGR4*, *PTGS2*, *RGS2*, *CCL3*, *BAG3*, *EGR2*, *HSPA4L*, *ADM*, *TM4SF1*, *EGR1*, *DUSP1*, *BTG2*, *LOC715456*, *HMOX1*, *LDLR*, *DNAJA4*, *MCL1*, *HSPA6*, *GADD45B*, *IL6*, *ADFP*, *HES4*, *DUSP5*, *GEM* e *GOS2*.

[0080] Em uma modalidade, a assinatura da invenção compreende ou consiste em pelo menos oito biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*.

[0081] Em uma modalidade, a assinatura da invenção compreende ou consiste em pelo menos nove biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados do grupo que compreende ou consiste em *HSPA1B*, *NPAS4*, *DNAJB1*, *ATF3*, *HSPB1*,

RRAD, NR4A1, CYR61, C-FOS, GADD45G, RGS1, ARC, EGR4, PTGS2, RGS2, CCL3, BAG3, EGR2, HSPA4L, ADM, TM4SF1, EGR1, DUSP1, BTG2, LOC715456, HMOX1, LDLR, DNAJA4, MCL1, HSPA6, GADD45B, IL6, ADFP, HES4, DUSP5, GEM e GOS2.

[0082] Em uma modalidade, a assinatura da invenção compreende ou consiste em pelo menos nove biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2, HMOX1, LDLR, HSPA1B, GOS2, BAG3, TM4SF1, DUSP1* e *ADM*.

[0083] A presente invenção, portanto, também se refere a uma assinatura de acidente vascular cerebral que compreende ou consiste em um ou vários biomarcadores cujo (s) nível (is) de expressão é/são diferentes entre um indivíduo afetado com um acidente vascular cerebral e um indivíduo substancialmente saudável.

[0084] Em uma modalidade, a assinatura da invenção é específica ou indicativa de acidente vascular cerebral se o nível de expressão de pelo menos um biomarcador de acidente vascular cerebral selecionado do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2, HMOX1, LDLR, HSPA1B, GOS2, BAG3, TM4SF1, DUSP1* e *ADM* é regulado positivamente, em comparação com uma assinatura de referência.

[0085] Em uma modalidade, a assinatura da invenção é específica ou indicativa de acidente vascular cerebral se o nível de expressão de pelo menos um biomarcador de acidente

vascular cerebral selecionado a partir do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3* e *TM4SF1* é regulado positivamente, em comparação com uma assinatura de referência.

[0086] Em uma modalidade, a assinatura da invenção é específica ou indicativa de acidente vascular cerebral se o nível de expressão de pelo menos dois biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados a partir do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM* é regulado positivamente, em comparação com uma assinatura de referência; de preferência com a condição de que os pelo menos dois biomarcadores não consistam em *DUSP1* e *ADM*.

[0087] Em uma modalidade, a assinatura da invenção é específica ou indicativa de acidente vascular cerebral se o nível de expressão de pelo menos dois biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados a partir do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3* e *TM4SF1* é regulado positivamente, em comparação com uma assinatura de referência.

[0088] Em uma modalidade, a assinatura da invenção é específica ou indicativa de acidente vascular cerebral se o nível de expressão de pelo menos três biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*,

BAG3, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM* é regulado positivamente, em comparação com uma assinatura de referência.

[0089] Em uma modalidade, a assinatura da invenção é específica ou indicativa de acidente vascular cerebral se o nível de expressão de pelo menos três biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados a partir do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3* e *TM4SF1* é regulado positivamente, em comparação com uma assinatura de referência.

[0090] Em uma modalidade, a assinatura da invenção é específica ou indicativa de acidente vascular cerebral se o nível de expressão de pelo menos quatro biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM* é regulado positivamente, em comparação com uma assinatura de referência.

[0091] Em uma modalidade, a assinatura da invenção é específica ou indicativa de acidente vascular cerebral se o nível de expressão de pelo menos quatro biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados a partir do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3* e *TM4SF1* é regulado positivamente, em comparação com uma assinatura de referência.

[0092] Em uma modalidade, a assinatura da invenção é específica ou indicativa de acidente vascular cerebral se o

nível de expressão de pelo menos cinco biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM* é regulado positivamente, em comparação com uma assinatura de referência.

[0093] Em uma modalidade, a assinatura da invenção é específica ou indicativa de acidente vascular cerebral se o nível de expressão de pelo menos cinco biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados a partir do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3* e *TM4SF1* é regulado positivamente, em comparação com uma assinatura de referência.

[0094] Em uma modalidade, a assinatura da invenção é específica ou indicativa de acidente vascular cerebral se o nível de expressão de pelo menos seis biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM* é regulado positivamente, em comparação com uma assinatura de referência.

[0095] Em uma modalidade, a assinatura da invenção é específica ou indicativa de acidente vascular cerebral se o nível de expressão de pelo menos seis biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados a partir do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3* e *TM4SF1* é regulado positivamente, em comparação

com uma assinatura de referência.

[0096] Em uma modalidade, a assinatura da invenção é específica ou indicativa de acidente vascular cerebral se o nível de expressão de pelo menos sete biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM* é regulado positivamente, em comparação com uma assinatura de referência.

[0097] Em uma modalidade, a assinatura da invenção é específica ou indicativa de acidente vascular cerebral se o nível de expressão de pelo menos sete biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados a partir do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3* e *TM4SF1* é regulado positivamente, em comparação com uma assinatura de referência.

[0098] Em uma modalidade, a assinatura da invenção é específica ou indicativa de acidente vascular cerebral se o nível de expressão de pelo menos oito biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM* é regulado positivamente, em comparação com uma assinatura de referência.

[0099] Em uma modalidade, a assinatura da invenção é específica ou indicativa de acidente vascular cerebral se o nível de expressão de pelo menos nove biomarcadores de

acidente vascular cerebral selecionados do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM* é regulado positivamente, em comparação com uma assinatura de referência.

[00100] Em uma modalidade, o nível de expressão dos biomarcadores de acidente vascular cerebral da invenção em uma amostra de um indivíduo, de preferência uma amostra de fluido corporal, com mais preferência uma amostra de sangue, pode ser determinado usando protocolos padrão conhecidos na técnica.

[00101] Em uma modalidade, o nível de expressão dos biomarcadores de acidente vascular cerebral da invenção corresponde aos seus níveis de transcrição (*isto é*, a expressão do mRNA) ou aos seus níveis de tradução (*isto é*, expressão da proteína).

[00102] Em uma modalidade, o nível de expressão dos biomarcadores de acidente vascular cerebral é avaliado no nível da proteína, *isto é*, no nível da tradução, em uma amostra, de preferência uma amostra de fluido corporal, com mais preferência uma amostra de sangue de um indivíduo. Nesta modalidade, a assinatura de acordo com a presente invenção pode ser referida como uma assinatura proteômica.

[00103] Os métodos para determinar um nível de proteína em uma amostra são bem conhecidos na técnica. Exemplos de tais métodos incluem, porém, sem limitação,

imunohistoquímica, métodos multiplex (Luminex), western blot, ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), ELISA sanduíche, ensaio de imunoabsorção fluorescente (FLISA), imunoensaio enzimático (EIA), radioimunoensaio (RIA), espectrometria de massa (MS), um microarranjo e semelhantes, ou qualquer combinação dos mesmos.

[00104] A espectrometria de massa (MS) pode ser usada para resolver diferentes formas de uma proteína porque as diferentes formas normalmente têm massas diferentes que podem ser resolvidas por espectrometria de massa. Consequentemente, se uma forma de um polipeptídeo ou proteína é um biomarcador melhor para uma doença do que outra forma do biomarcador, a espectrometria de massa pode ser usada para detectar e medir especificamente a forma útil. MS pode incluir tempo de voo (TOF) MS (por exemplo, dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI) - TOF MS), dessorção/ionização a laser aprimorada por superfície (MELDI) MS, MS de ionização por eletroaspersão ou ion de transformação de Fourier ressonância ciclotron (FT-ICR) MS.

[00105] Os imunoensaios tipicamente compreendem o contato da amostra com um parceiro de ligação capaz de interagir seletivamente com o biomarcador na amostra. Em algumas modalidades, os parceiros de ligação são anticorpos, como, por exemplo, anticorpos monoclonais ou mesmo

aptâmeros. Por exemplo, a ligação pode ser detectada através do uso de um imunoensaio competitivo, um sistema de ensaio não competitivo usando técnicas como western blots, um radioimunoensaio, um ELISA, um imunoensaio "sanduíche", um ensaio de imunoprecipitação, uma reação de precipitina, um gel reação de precipitação de difusão, um ensaio de imunodifusão, um ensaio de aglutinação, um ensaio de fixação de complemento, um ensaio imunorradiométrico, um imunoensaio fluorescente, um imunoensaio de proteína A, um ensaio de imunoprecipitação, um ensaio imunohistoquímico, um ELISA de competição ou sanduíche, um radioimunoensaio, um Western blot ensaio, um ensaio imunohistológico, um ensaio imunocitoquímico, um ensaio dot blot, um ensaio de polarização de fluorescência, um ensaio de proximidade de cintilação, um ensaio de fluorescência resolvido no tempo homogêneo, uma análise IAsys e uma análise BIAcore. Os ensaios acima mencionados geralmente envolvem a ligação do parceiro (*isto é*, anticorpo ou aptâmero) a um suporte sólido. Os suportes sólidos que podem ser usados na prática da invenção incluem substratos, tais como nitrocelulose (*por exemplo*, em membrana ou forma de poço de microtitulação), cloreto de polivinil (*por exemplo*, folhas ou poços de microtitulação), látex de poliestireno (*por exemplo*, grânulos ou placas de microtitulação), polivinilideno fluoreto, papel diazotado, membranas de náilon, contas

ativadas, contas magneticamente responsivas e semelhantes.

[00106] Um ensaio multiplex pode incluir um phage display, um perfil de anticorpo ou um ensaio usando uma plataforma Luminex. Um microarranjo para analisar um perfil de polipeptídeos pode incluir microarranjos analíticos, microarranjos de proteínas funcionais ou microarranjos de proteínas de fase reversa. Em alguns casos, um perfil de polipeptídeos ou proteínas pode ser medido por uma varredura proteômica (*por exemplo*, uma varredura proteômica inteira) usando um microarranjo proteômico.

[00107] Em uma modalidade, o nível de expressão dos biomarcadores de acidente vascular cerebral é avaliado no nível do ácido nucleico (*isto é*, RNA), *isto é*, no nível da transcrição, em uma amostra, de preferência uma amostra de fluido corporal, mais preferivelmente uma amostra de sangue, de um indivíduo. Nesta modalidade, a assinatura de acordo com a presente invenção pode ser referida como uma assinatura transcriptômica.

[00108] Métodos para avaliar o nível de transcrição de um biomarcador são bem conhecidos na técnica. Exemplos de tais métodos incluem, porém, sem limitação, reação em cadeia da polimerase (PCR), RT-PCR, RT-qPCR, Northern Blot, técnicas de hibridização, tais como, por exemplo, o uso de microarranjo e sua combinação incluindo, mas não se limitando a, hibridização de amplicons obtidos por RT-PCR,

sequenciamento, como, por exemplo, sequenciamento de DNA de próxima geração (NGS) ou RNA-seq (também conhecido como "sequenciamento shotgun de transcriptoma completo") e semelhantes, ou qualquer combinação dos mesmos.

[00109] Métodos convencionais envolvem tipicamente reação em cadeia de polimerase (PCR). Por exemplo, os Documentos de Patente nº U.S.4.683.202, U.S.4.683.195, U.S.4.800.159 e U.S.4.965.188 revelam técnicas de PCR convencionais. PCR emprega tipicamente dois iniciadores de oligonucleotídeo que se ligam a uma sequência de ácido nucleico alvo selecionada. Iniciadores úteis na presente invenção incluem oligonucleotídeos com capacidade de atuar como um ponto de iniciação de síntese de ácido nucleico dentro da sequência de ácidos nucleicos alvo. Um iniciador pode ser purificado a partir de uma digestão de restrição por métodos convencionais, ou o mesmo pode ser produzido sinteticamente. PCR envolve o uso de uma polimerase termoestável. O termo "polimerase termoestável" se refere a uma enzima polimerase que é estável no calor, isto é, a enzima catalisa a formação de produtos de extensão de iniciador complementares a um formato e não desnatura de modo irreversível quando submetida às temperaturas elevadas pelo tempo necessário para efetuar desnaturação de ácidos nucleicos de formato de duas fitas. Polimerases termoestáveis foram isoladas dentre *Thermus fiavus*, *T.*

ruber, *T. thermophilus*, *T. aquaticus*, *T. lacteus*, *T. rubens*, *Bacillus stearothermophilus* e *Methanothermus fervidus*. Todavia, polimerases que não são termoestáveis também podem ser empregadas em ensaios de PCR visto que a enzima é reabastecida. Tipicamente, a polimerase é uma Taq polimerase (*isto é, Thermus aquaticus* polimerase).

[00110] PCR Quantitativo (qPCR) é tipicamente realizado em um termociclador com a capacidade de iluminar cada amostra com um feixe de luz de um comprimento de onda especificado e detectar a fluorescência emitida pelo fluoróforo excitado. O termociclador também tem capacidade de aquecer e resfriar rapidamente as amostras, tomando assim vantagem das propriedades físico-químicas dos ácidos nucleicos e polimerase térmica. De modo a detectar e medir a quantidade de amplicon (*isto é, sequência de ácidos nucleicos alvo amplificada*) na amostra, um sinal mensurável tem de ser gerado, que é proporcional à quantidade de produto amplificado. Todos os sistemas de detecção de corrente usam tecnologias fluorescentes. Alguns dos mesmos são técnicas não específicas, e consequentemente somente permitem a detecção de um alvo por vez.

[00111] Alternativamente, químicas de detecção específicas podem se distinguir entre amplificação não específica e amplificação alvo. Essas técnicas específicas podem ser usadas para multiplexar o ensaio, *isto é, detectar*

vários alvos diferentes no mesmo ensaio. Por exemplo, sondas SYBR® Green I, sondas de Fusão de Alta Resolução, sondas TaqMan®, sondas LNA® e sondas de Sinalizador Molecular podem ser adequadas. Sondas TaqMan® são o tipo mais amplamente usado de sondas. Os mesmos foram desenvolvidos por Roche (Basel, Suíça) e ABI (Foster City, E.U.A) a partir de um ensaio que originalmente usou uma sonda marcada por rádio (Holland *et al.*, **1991**. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88(16)**:7276-80), que consistiu em uma sequência de sonda de fita única que foi complementar a uma das fitas do amplicon. Um fluoróforo é fixado à terminação 5' da sonda e um supressor de fluorescência à terminação 3'. O fluoróforo é excitado pela máquina e passa sua energia, por meio de FRET (Transferência de Energia de Ressonância Fluorescente), ao supressor de fluorescência. Tradicionalmente, o par de FRET foi conjugado ao FAM como o fluoróforo e TAMRA como o supressor de fluorescência. Em uma sonda bem projetada, FAM não fluoresce à medida que o mesmo passa sua energia ao TAMRA. Visto que a fluorescência de TAMRA é detectada em um comprimento de onda diferente ao FAM, o nível de base de FAM é baixo. A sonda se liga ao amplicon durante cada etapa de anelamento do PCR. Quando a Taq polimerase se estende do iniciador que é ligado ao amplicon, o mesmo desloca a terminação 5' da sonda, que é então degradada pela atividade de 5'-3' exonuclease da Taq polimerase. A clivagem continua

até que a sonda restante derreta o amplicon. Esse processo libera o fluoróforo e o supressor de fluorescência na solução, separando espacialmente as mesmas (em comparação a quando as mesmas foram reunidas pela sonda). Isso causa um aumento irreversível de fluorescência a partir da FAM e uma diminuição no TAMRA.

[00112] Em algumas modalidades, o nível de expressão dos biomarcadores de acidente vascular cerebral no nível de ácido nucleico (*isto é*, RNA) é determinado por RNA-seq. Conforme usado, o termo "RNA-seq" ou "sequenciamento de transcriptoma" se refere ao sequenciamento realizado em RNA (ou cDNA) em vez de DNA, em que, tipicamente, a meta primária é expor níveis de expressão, detectar transcrições de fusão, fatiação alternativa, e outras alterações genômicas que podem ser melhor avaliadas a partir de RNA. RNA-seq tipicamente inclui todo o sequenciamento de transcriptoma. Conforme usado no presente documento, o termo "sequenciamento total de transcriptoma" se refere ao uso de tecnologias de sequenciamento de alto rendimento para sequenciar o transcriptoma inteiro de modo a obter informações acerca de um teor de RNA da amostra. O sequenciamento total de transcriptoma pode ser realizado com uma variedade de plataformas, por exemplo, o Genome Analyzer (Illumina, Inc., San Diego, Calif.) e o SOLiD™ Sequencing System (Life Technologies, Carlsbad, Calif.), no entanto,

qualquer plataforma útil para sequenciamento total de transcriptoma pode ser usada. Tipicamente, o RNA é extraído, e o RNA ribossômico pode ser deletado conforme descrito no Documento de Patente nº U.S.9.005.891. Bibliotecas de sequenciamento de cDNA podem ser preparadas, que são direcionais e usam com terminação única ou pareada kits comercialmente disponíveis tais como o Kit de Preparação de Biblioteca de mRNA-Seq ScriptSeq™ (Epicenter Biotechnologies, Madison, Wis.). As bibliotecas também podem ser marcadas com código de barras para sequenciamento por multiplex com uso de iniciadores de código de barras comercialmente disponíveis tais como os Iniciadores de Código de Barra de RNA-Seq junto à Epicenter Biotechnologies (Madison, Wis.). PCR é então realizado para gerar a segunda fita de cDNA para incorporar os códigos de barras e para amplificar as bibliotecas. Depois que as bibliotecas são quantificadas, as bibliotecas de sequenciamento podem ser sequenciadas. Tecnologias de sequenciamento de ácido nucleico são métodos adequados para análise de expressão. O princípio por trás desses métodos é que o número de vezes que uma sequência de DNA é detectada em uma amostra é diretamente relacionada aos níveis de RNA relativos correspondentes a essa sequência. Esses métodos são algumas vezes denominados pelo termo "Expressão de Gene Digital" ou DOE, para refletir a propriedade numérica discreta dos dados

resultantes. Métodos precoces que aplicam esse princípio foram Análise em Série de Expressão de Gene (SAGE) e Sequenciamento de Assinatura Massivamente paralela (MPSS). Consultar, por exemplo, Brenner et al. (2000. *Nat Biotechnol.* **18(6)**:630-634). Tipicamente, RNA-seq usa Sequenciamento de Próxima Geração (ou NGS). Conforme usado no presente documento, o termo "Sequenciamento de Próxima Geração" ou "NGS" se refere a uma técnica de sequenciamento relativamente nova conforme comparado à técnica Sanger tradicional de sequenciamento. Para uma revisão, consultar Shendure et al. (2008. *Nat Biotechnol.* **26(10)**:1135-45), que é incorporado por meio deste documento a título de referência a esta revelação. Para o propósito desta revelação, NGS pode incluir sequenciamento de arranjo cíclico, sequenciamento microeletroforético, sequenciamento por hibridização, entre outros. A título de exemplo, em um NGS típico com uso de métodos de arranjo cíclico, DNA genômico ou biblioteca de cDNA é primeiro preparada, e adaptadores comuns podem ser então ligados ao DNA ou cDNA genômico fragmentado. Diferentes protocolos podem ser usados para gerar bibliotecas de salto de etiquetas de combinação pareada com distribuição de distância controlável. Um arranjo de milhões de colônias de PCR espacialmente imobilizadas ou "polônias" é gerado com cada polônia consistindo em muitas cópias de um único fragmento de biblioteca de espingarda. Devido ao fato de que

as polônias são ligadas a um arranjo plano, um volume de reagente de escala de microlitro única pode ser aplicado para manipular as características de arranjo em paralelo, *por exemplo*, para hibridização de iniciador ou para reações de extensão enzimática. A detecção baseada em imageamento de marcações fluorescentes incorporadas com cada extensão pode ser usada para adquirir dados de sequenciamento em todos os recursos em paralelo. Sucessivas iterações de interrogação enzimática e imageamento também podem ser usadas para formar uma leitura de sequenciamento contígua para cada característica de arranjo.

[00113] Em uma modalidade, a decisão quanto à possibilidade de o nível de expressão de um determinado biomarcador de acidente vascular cerebral em uma amostra específica, preferivelmente, uma amostra de fluido corporal, com mais preferência uma amostra sanguínea, é regulada positivamente é tomada em comparação a uma assinatura de referência e/ou um valor de referência predeterminado.

[00114] Em uma modalidade, uma assinatura de referência compreende ou consiste em valores de referência predeterminados para cada um dos biomarcadores de acidente vascular cerebral de interesse, preferivelmente em pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou mais biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados a partir do grupo que compreende ou consiste em *HSPA1B*, *NPAS4*, *DNAJB1*, *ATF3*,

HSPB1, RRAD, NR4A1, CYR61, C-FOS, GADD45G, RGS1, ARC, EGR4, PTGS2, RGS2, CCL3, BAG3, EGR2, HSPA4L, ADM, TM4SF1, EGR1, DUSP1, BTG2, LOC715456, HMOX1, LDLR, DNAJA4, MCL1, HSPA6, GADD45B, IL6, ADFP, HES4, DUSP5, GEM e GOS2,

preferivelmente selecionados a partir do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2, HMOX1, LDLR, HSPA1B, GOS2, BAG3, TM4SF1, DUSP1* e *ADM*,

preferivelmente com a condição de que o pelo menos um ou dois biomarcadores de acidente vascular cerebral não consiste em *DUSP1* e/ou *ADM*.

[00115] Tipicamente, uma assinatura de referência pode ser tanto implementada no software ou um mediano geral ou outro meio aritmético através de medições pode ser construído.

[00116] Em uma modalidade, a assinatura de referência é derivada de uma medição anterior dos níveis de expressão de biomarcadores de acidente vascular cerebral de acordo com a invenção, em uma amostra de referência derivada do mesmo indivíduo, tal como, por exemplo, os níveis de expressão de biomarcadores de acidente vascular cerebral medidos um mês antes da medição subsequente dos níveis de expressão de biomarcadores de acidente vascular cerebral de acordo com a invenção, preferivelmente seis meses antes, com mais preferência, um ano antes ou mais; ou tal como, por exemplo, os níveis de expressão de biomarcadores de acidente vascular

cerebral medidos antes de iniciar uma terapia.

[00117] Em uma modalidade, a assinatura de referência é derivada da medição dos níveis de expressão de biomarcadores de acidente vascular cerebral de acordo com a invenção, em uma população de referência.

[00118] Em uma modalidade, a assinatura de referência pode ser relativa a uma assinatura derivada dos estudos de população, incluindo, sem limitação, tais indivíduos que têm faixa de idade similar, indivíduos no mesmo grupo étnico ou grupo étnico similar, similar histórico de câncer similar e similares.

[00119] Em uma modalidade, a assinatura de referência é derivada da medição dos níveis de expressão de biomarcadores de acidente vascular cerebral de acordo com a invenção, em uma amostra de controle derivada de um ou mais indivíduo (ou indivíduos) substancialmente saudável. Conforme usado no presente documento, um "**indivíduo substancialmente saudável**" não foi anteriormente diagnosticado ou identificado como tendo ou sofrendo um acidente vascular cerebral.

[00120] Em uma modalidade, a população de referência compreende indivíduos substancialmente saudáveis, preferivelmente pelo menos 50, com mais preferência pelo menos 100, com mais preferência pelo menos 200 e com ainda mais preferência pelo menos 500 indivíduos substancialmente

saudáveis.

[00121] Implicando-se uma multitude de amostras da população de referência, é concebível calcular um nível mediano e/ou médio de expressão para cada biomarcador de acidente vascular cerebral, respectivamente. Em relação a esses resultados, um biomarcador de acidente vascular cerebral pode ser monitorado como diferencial expressado. Em uma modalidade, a assinatura de referência corresponde aos níveis médios de expressão dos biomarcadores de acidente vascular cerebral da assinatura da invenção, medida na população de referência. Em uma modalidade, a assinatura de referência corresponde aos níveis medianos de expressão dos biomarcadores de acidente vascular cerebral da assinatura da invenção, medida na população de referência.

[00122] Em uma modalidade, a assinatura de referência é construída com uso de algoritmos e outros métodos de classificação estatística e estrutural. Amostras da população de referência são usadas para computar um perfil médio (*isto é*, uma assinatura de referência) do pelo menos um biomarcador de acidente vascular cerebral, preferivelmente pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 biomarcadores de acidente vascular cerebral de acordo com a invenção.

[00123] Em uma modalidade, um biomarcador de acidente vascular cerebral é considerado como expressado

diferencialmente entre um indivíduo a ser diagnosticado como sendo afetado ou não com um acidente vascular cerebral e um indivíduo substancialmente saudável se o fold change de expressão é pelo menos maior do que cerca de |1,1|, preferivelmente pelo menos maior do que cerca de |1,2|, cerca de |1,3|, cerca de |1,4|, cerca de |1,5|, cerca de |1,6|, cerca de |1,7|, cerca de |1,8|, cerca de |1,9|, cerca de |2,0|, cerca de |2,1|, cerca de |2,2|, cerca de |2,3|, cerca de |2,4|, cerca de |2,5|, cerca de |3,0|, cerca de |4,0|, cerca de |5,0| ou mais.

[00124] Em uma modalidade, um biomarcador de acidente vascular cerebral é considerado como expressado diferencialmente entre um indivíduo a ser diagnosticado como sendo afetado ou não com um acidente vascular cerebral e um indivíduo substancialmente saudável se o fold change de expressão é pelo menos maior do que cerca de 1,1, preferivelmente pelo menos maior do que cerca de 1,2, cerca de 1,3, cerca de 1,4, cerca de 1,5, cerca de 1,6, cerca de |1,7|, cerca de 1,8, cerca de 1,9, cerca de 2,0, cerca de 2,1, cerca de 2,2, cerca de 2,3, cerca de 2,4, cerca de 2,5, cerca de 3,0, cerca de 4,0, cerca de 5,0 ou mais.

[00125] Em uma modalidade, um biomarcador de acidente vascular cerebral é considerado como expressado diferencialmente entre um indivíduo a ser diagnosticado como sendo afetado ou não com um acidente vascular cerebral e um

indivíduo substancialmente saudável se o fold change de expressão de $\log_2$ é pelo menos maior do que cerca de |0,1|, preferivelmente pelo menos maior do que cerca de |0,2|, cerca de |0,3|, cerca de |0,4|, cerca de |0,5|, cerca de |0,6|, cerca de |0,7|, cerca de |0,8|, cerca de |0,9|, cerca de |1,0|, cerca de |1,1|, cerca de |1,2|, cerca de |1,3|, cerca de |1,4|, cerca de |1,5|, cerca de |1,6|, cerca de |1,7|, cerca de |1,8|, cerca de |1,9|, cerca de |2,0|, cerca de |2,1|, cerca de |2,2|, cerca de |2,3| ou mais.

[00126] Em uma modalidade, um biomarcador de acidente vascular cerebral é considerado como expressado diferencialmente entre um indivíduo a ser diagnosticado como sendo afetado ou não com um acidente vascular cerebral e um indivíduo substancialmente saudável se o fold change de expressão é pelo menos maior do que cerca de 0,1, preferivelmente pelo menos maior do que cerca de 0,2, cerca de 0,3, cerca de 0,4, cerca de 0,5, cerca de 0,6, cerca de 0,7, cerca de 0,8, cerca de 0,9, cerca de 1,0, cerca de 1,1, cerca de |1,2|, cerca de 1,3, cerca de 1,4, cerca de 1,5, cerca de 1,6, cerca de 1,7, cerca de 1,8, cerca de 1,9, cerca de 2,0, cerca de 2,1, cerca de 2,2, cerca de 2,3 ou mais.

[00127] Em uma modalidade, um biomarcador de acidente vascular cerebral é considerado como expressado diferencialmente entre um indivíduo a ser diagnosticado como sendo afetado ou não com um acidente vascular cerebral e um

indivíduo substancialmente saudável se o nível de expressão do dito biomarcador é pelo menos cerca de 0,5, cerca de 1, cerca de 1,5, cerca de 2, cerca de 2,5, cerca de 3, cerca de 3,5, cerca de 4, cerca de 5, cerca de 6, cerca de 7, cerca de 8, cerca de 9, cerca de 10, cerca de 15, cerca de 20, cerca de 30, cerca de 40, cerca de 50, ou cerca de 100 vezes maior do que o nível de expressão do mesmo biomarcador determinado no indivíduo substancialmente saudável, preferivelmente na população de referência.

[00128] Em uma modalidade, quando o nível de expressão de mais do que um biomarcador de acidente vascular cerebral é determinado em uma amostra, preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência uma amostra sanguínea, obtida a partir do indivíduo a ser diagnosticado como sendo afetado ou não com um acidente vascular cerebral, uma pontuação, que é uma pontuação compósita dos ditos níveis de expressão, pode ser calculada e comparada com um valor de referência predeterminado. Em uma modalidade, uma pontuação maior do que o valor de referência predeterminado indica que o indivíduo tem ou tivera um acidente vascular cerebral.

[00129] Tipicamente, o valor de referência predeterminado é um valor limítrofe ou um valor de corte. Tipicamente, um "valor limítrofe" ou "valor de corte" pode ser determinado experimental, empírica ou teoricamente. Um valor limítrofe também pode ser arbitrariamente selecionado

com base nas condições experimentais e/ou clínicas existentes, conforme seria reconhecido por um elemento de habilidade comum na técnica. Por exemplo, a medição retrospectiva em amostras de indivíduo de histórico apropriadamente armazenadas pode ser usada ao estabelecer o valor de referência predeterminado. O valor limítrofe tem de ser determinado de modo a obter a sensibilidade e especificidade ideais de acordo com a função do teste e o saldo de benefício/risco (consequências clínicas do falso positivo e falso negativo). Tipicamente, a sensibilidade e especificidade ideais (e então o valor limítrofe) pode ser determinado com uso de uma curva Característica Operacional de Receptor (ROC) com base em dados experimentais. Por exemplo, depois de determinar o nível de expressão do biomarcador da invenção em uma população de referência, pode-se usar análise algorítmica para o tratamento estatístico dos níveis de expressão determinados em amostras a serem testadas, e obter desse modo um padrão de classificação que tem significância para classificação de amostra. O nome completo da curva de ROC é curva característica de operador de receptor, que é também conhecida como curva característica de operação de receptor. Isso é principalmente usado para testes diagnósticos bioquímicos clínicos. A curva de ROC é um indicador compreensivo que reflete as variáveis contínuas da taxa de verdadeiro positivo (sensibilidade) e taxa de

falso positivo (1-especificidade). Isso revela a relação entre sensibilidade e especificidade com o método de composição de imagem. Uma série de diferentes valores de corte (limiares ou valores críticos, valores de limitação entre resultados normais ou anormais de teste de diagnóstico) são definidos como variáveis contínuas para calcular uma série de valores de sensibilidade e especificidade. Então a sensibilidade é usada como a coordenada vertical e especificidade é usada como a coordenada horizontal para desenhar uma curva. Quanto maior a área sob a curva (AUC), maior é a precisão de diagnóstico. Na curva de ROC, o ponto mais próximo à esquerda superior distante do diagrama de coordenada é um ponto crítico que tem tanto altos valores de sensibilidade quanto altos valores de especificidade. O valor de AUC da curva de ROC é entre 1,0 e 0,5. Quando $AUC > 0,5$, o resultado de diagnóstico melhora cada vez mais à medida que o AUC se aproxima de 1. Quando $0,5 < AUC < 0,7$, a precisão é baixa. Quando $0,7 < AUC < 0,9$, a precisão é moderada. Quando $AUC < 0,9$, a precisão é alta. Esse método algorítmico é preferivelmente realizado com um computador. Software e sistemas existentes na técnica podem ser usados para o desenho da curva de ROC, tais como: Software estatístico médico MedCalc 9.2.0.1, SPSS 9,0, ROCPOWER.SAS, DESIGNROC.FOR, MULTIREADER POWER.SAS, CREATE-ROC.SAS, GB STAT VI0.0 (Dynamic Microsystems, Inc. Silver Spring, Md.,

E.U.A), etc.

[00130] A presente invenção se refere adicionalmente a um método de diagnóstico de um acidente vascular cerebral em um indivíduo, com uso da assinatura de acidente vascular cerebral da invenção.

[00131] Em uma modalidade, o método de diagnóstico de um acidente vascular cerebral de acordo com a presente invenção é particularmente adequado para diagnosticar um acidente vascular cerebral isquêmico, um miniacidente vascular cerebral (ou ataque isquêmico transiente, TIA) e/ou um acidente vascular cerebral hemorrágico (em particular, acidente vascular cerebral hemorrágico causado por hemorragia intracerebral).

[00132] Em uma modalidade, o método de diagnóstico de um acidente vascular cerebral de acordo com a presente invenção é particularmente adequado para distinguir um acidente vascular cerebral de uma simulação de acidente vascular cerebral, que pode exibir alguns ou todos os mesmos sintomas que um acidente vascular cerebral, exceto que o mesmo não é um acidente vascular cerebral e isso não é um resultado de isquemia cerebral. Sem desejar se limitar a uma teoria, devido ao fato de que um nível elevado do biomarcador é o resultado de acidente vascular cerebral, um indivíduo que tem uma simulação de acidente vascular cerebral não terá um nível elevado do biomarcador (em outras palavras, devido

ao fato de que a assinatura da invenção é específica ou indicativa de um acidente vascular cerebral, um indivíduo que tem uma simulação de acidente vascular cerebral não exibirá a mesma assinatura).

[00133] Simulações de acidente vascular cerebral comuns incluem, porém, sem limitação, enxaqueca, síncope, distúrbio vestibular periférico e BPPV (vertigem posicional paroximal benigna), convulsão, manifestação/ansiedade funcional, amnésia global transiente, paralisia de Bell, doença/disfunção de nervo periférico, hipotensão postural, tumor, enfermidade viral, arritmia cardíaca, esclerose múltipla, relacionada a fármaco, hipoglicemia, mal de Parkinson, patologia retinal/ocular, patologia espinhal, neuralgia trigeminal, infecção de trato urinário, delírio, doença de neurônio motor, hemorragia subaracnoidea, hematoma subdural e similares (consultar Nadarajan *et al.*, **2014**. *Pract Neurol.* **14(1)**:23-31).

[00134] Consequentemente, o método de diagnóstico de um acidente vascular cerebral de acordo com a presente invenção fornece a vantagem de permitir um diagnóstico precoce e preciso de acidente vascular cerebral, que pode beneficiar um indivíduo submetida a ter acidente vascular cerebral pelo menos nos seguintes aspectos relacionados:

[00135] isso pode reduzir a taxa de diagnóstico incorreto de acidente vascular cerebral; e/ou

[00136] isso pode limitar a extensão de morte de tecido permitindo-se tratamento precoce e apropriado em um indivíduo em necessidade de tratamento.

[00137] Em uma modalidade, o método de diagnóstico de um acidente vascular cerebral de acordo com a presente invenção compreende uma etapa de fornecer uma amostra do indivíduo a ser diagnosticado como sendo afetado ou não com um acidente vascular cerebral.

[00138] O termo "**amostra**", conforme usado no presente documento, em geral, se refere a qualquer amostra que pode ser testada para níveis de expressão de um biomarcador, preferivelmente de marcadores de acidente vascular cerebral de acordo com a presente invenção.

[00139] Em uma modalidade, a amostra é uma amostra de fluido corporal. Exemplos de fluidos corporais incluem, porém, sem limitação, sangue, plasma, soro, linfa, fluido ascético, fluido cístico, urina, bile, muco, fluido seroso, sebo, exsudado de mamilo, fluido sinovial, fluido de lavagem broncoalveolar, expectoração, fluido amniótico, fluido peritoneal, fluido cerebroespinal, fluido pleural, fluido pericárdico, sêmen, saliva, lágrimas, remela, suor e macrófagos alveolares.

[00140] Em uma modalidade, a amostra é uma amostra sanguínea. O termo "**amostra sanguínea**", conforme usado no presente documento, abrange amostras sanguíneas inteiras,

amostras de soro e amostras de plasma.

[00141] Em uma modalidade, a amostra é uma amostra sanguínea, de plasma ou soro inteira.

[00142] Em uma modalidade, a amostra não é uma amostra de tecido corporal. Exemplos de tecidos corporais incluem, porém, sem limitação, cerebral, muscular, de nervo, cardíaco, pulmonar, hepático, pancreático, de baço, de timo, de esôfago, estomacal, de intestino, renal, de próstata, de testículo, de ovário, capilar, de pele, ósseo, de mama, de útero, de bexiga e de medula espinhal.

[00143] Em uma modalidade, a amostra não é uma amostra de tecido cerebral. Portanto, de acordo com essa modalidade, os métodos da invenção não compreendem uma etapa de fornecer uma amostra de tecido cerebral do indivíduo.

[00144] Em uma modalidade, a amostra não é uma amostra de biópsia. Em uma modalidade, a amostra não é uma amostra de biópsia cerebral.

[00145] Em uma modalidade, a amostra, preferivelmente, a amostra de fluido corporal, com mais preferência, a amostra sanguínea, foi anteriormente tomada do indivíduo, isto é, o método de diagnóstico de um acidente vascular cerebral de acordo com a presente invenção não compreende uma etapa de tomar ativamente uma amostra do indivíduo. Consequentemente, de acordo com essa modalidade, o método da invenção é um método não invasivo, isto é, um

método *in vitro*.

[00146] Em uma modalidade, o método de diagnóstico de um acidente vascular cerebral de acordo com a presente invenção compreende uma etapa de determinar a assinatura de acordo com a presente invenção, na dita amostra, preferivelmente amostra de fluido corporal, com mais preferência amostra sanguínea, do indivíduo.

[00147] Meios e métodos para determinar a assinatura de acordo com a presente invenção são detalhados acima no presente documento.

[00148] Em uma modalidade, a etapa de determinar a assinatura compreende uma subetapa de medir o nível de expressão de pelo menos um biomarcador de acidente vascular cerebral, preferivelmente pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 biomarcadores de acidente vascular cerebral de acordo com a presente invenção.

[00149] Em uma modalidade, o nível de expressão do pelo menos um biomarcador de acidente vascular cerebral, preferivelmente pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 biomarcadores de acidente vascular cerebral, é medido com uso de um microarranjo de DNA, de modo que os níveis de expressão de cada um dos biomarcadores de acidente vascular cerebral da assinatura da invenção fossem simultaneamente medidos.

[00150] Em uma modalidade, o nível de expressão do

pelo menos um biomarcador de acidente vascular cerebral, preferivelmente pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 biomarcadores de acidente vascular cerebral, é medido com uso de RNAseq.

[00151] Em uma modalidade, o nível de expressão do pelo menos um biomarcador de acidente vascular cerebral, preferivelmente, pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 biomarcadores de acidente vascular cerebral, é medido com uso de um CodeSet. CodeSets personalizados para um dado painel de marcadores (*por exemplo*, para os biomarcadores de acidente vascular cerebral revelados no presente documento) são comercialmente projetáveis. Os mesmos incluem, sem limitação, CodeSets personalizados nCounter® (NanoString) (Malkov *et al.*, **2009**. *BMC Res Notes*. **2**:80; Kulkarni, **2011**. *Curr Protoc Mol Biol*. **Capítulo 25**:Unit25B.10).

[00152] Em uma modalidade, quando o nível de expressão de mais do que um biomarcador de acidente vascular cerebral é determinado na dita amostra, preferivelmente amostra de fluido corporal, com mais preferência amostra sanguínea, do indivíduo a ser diagnosticado como sendo afetado ou não com um acidente vascular cerebral, uma pontuação compósita dos ditos níveis de expressão é calculada.

[00153] Em uma modalidade, o método de diagnóstico de um acidente vascular cerebral de acordo com a presente invenção compreende uma etapa de comparar a assinatura

determinada a partir da amostra, preferivelmente a amostra de fluido corporal, com mais preferência, a amostra sanguínea, do indivíduo, com uma assinatura de referência, conforme definido acima no presente documento.

[00154] Em uma modalidade, o método de diagnóstico de um acidente vascular cerebral de acordo com a presente invenção compreende uma etapa de comparar a assinatura determinada a partir da amostra, preferivelmente a amostra de fluido corporal, com mais preferência, a amostra sanguínea, do indivíduo, com um valor de referência predeterminado, conforme definido acima no presente documento.

[00155] Em uma modalidade, o método de diagnóstico de um acidente vascular cerebral de acordo com a presente invenção compreende uma etapa de comparar os níveis de expressão dos biomarcadores de acidente vascular cerebral na assinatura determinada a partir da amostra, preferivelmente a amostra de fluido corporal, com mais preferência, a amostra sanguínea, do indivíduo, com os níveis de expressão dos biomarcadores de acidente vascular cerebral em uma assinatura de referência, conforme definido acima no presente documento.

[00156] Em uma modalidade, o método de diagnóstico de um acidente vascular cerebral de acordo com a presente invenção compreende uma etapa de diagnosticar um acidente

vascular cerebral no indivíduo com base na correlação da assinatura em uma amostra, preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência uma amostra sanguínea, a partir do dito indivíduo comparado com a assinatura de referência.

[00157] Em uma modalidade, o indivíduo é diagnosticado com um acidente vascular cerebral quando a assinatura determinada a partir da amostra, preferivelmente a amostra de fluido corporal, com mais preferência, a amostra sanguínea, do indivíduo é considerado diferente da assinatura de referência, conforme definido acima no presente documento.

[00158] Em uma modalidade, a assinatura determinada a partir da amostra, preferivelmente a amostra de fluido corporal, com mais preferência, a amostra sanguínea, do indivíduo é considerada diferente da assinatura de referência se o fold change de expressão de pelo menos 1, preferivelmente pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 biomarcadores de acidente vascular cerebral conforme definido no presente documento for pelo menos maior do que cerca de |1,1|, preferivelmente pelo menos maior do que cerca de |1,2|, cerca de |1,3|, cerca de |1,4|, cerca de |1,5|, cerca de |1,6|, cerca de |1,7|, cerca de |1,8|, cerca de |1,9|, cerca de |2,0|, cerca de |2,1|, cerca de |2,2|, cerca de |2,3|, cerca de |2,4|, cerca de |2,5|, cerca de |3,0|,

cerca de |4,0|, cerca de |5,0| ou mais.

[00159] Em uma modalidade, a assinatura determinada a partir da amostra, preferivelmente a amostra de fluido corporal, com mais preferência, a amostra sanguínea, do indivíduo é considerada diferente da assinatura de referência se o fold change de expressão de pelo menos 1, preferivelmente pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 biomarcadores de acidente vascular cerebral conforme definido no presente documento for pelo menos maior do que cerca de 1,1, preferivelmente pelo menos maior do que cerca de 1,2, cerca de 1,3, cerca de 1,4, cerca de 1,5, cerca de 1,6, cerca de 1,7, cerca de 1,8, cerca de 1,9, cerca de 2,0, cerca de 2,1, cerca de 2,2, cerca de 2,3, cerca de 2,4, cerca de 2,5, cerca de 3,0, cerca de 4,0, cerca de 5,0 ou mais.

[00160] Em uma modalidade, a assinatura determinada a partir da amostra, preferivelmente a amostra de fluido corporal, com mais preferência, a amostra sanguínea, do indivíduo é considerada diferente da assinatura de referência se o fold change de expressão de $\log_2$ de pelo menos 1, preferivelmente pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 biomarcadores de acidente vascular cerebral conforme definido no presente documento é pelo menos maior do que cerca de |0,5|, preferivelmente pelo menos maior do que cerca de |0,1|, cerca de |0,2|, cerca de |0,3|, cerca de |0,4|, cerca de |0,5|, cerca de |0,6|, cerca de |0,7|, cerca de

|0,8|, cerca de |0,9|, cerca de |1,0|, cerca de |1,1|, cerca de |1,2|, cerca de |1,3|, cerca de |1,4|, cerca de |1,5|, cerca de |1,6|, cerca de |1,7|, cerca de |1,8|, cerca de |1,9|, cerca de |2,0|, cerca de |2,1|, cerca de |2,2|, cerca de |2,3| ou mais.

[00161] Em uma modalidade, a assinatura determinada a partir da amostra, preferivelmente a amostra de fluido corporal, com mais preferência, a amostra sanguínea, do indivíduo é considerada diferente da assinatura de referência se o fold change de expressão de $\log_2$ de pelo menos 1, preferivelmente pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 biomarcadores de acidente vascular cerebral conforme definido no presente documento é pelo menos maior do que cerca de 0.5, preferivelmente pelo menos maior do que cerca de 0,1, cerca de 0,2, cerca de 0,3, cerca de 0,4, cerca de 0,5, cerca de 0,6, cerca de 0,7, cerca de 0,8, cerca de 0,9, cerca de 1,0, cerca de 1,1, cerca de 1,2, cerca de 1,3, cerca de 1,4, cerca de 1,5, cerca de 1,6, cerca de 1,7, cerca de 1,8, cerca de 1,9, cerca de 2,0, cerca de 2,1, cerca de 2,2, cerca de 2,3 ou mais.

[00162] Em uma modalidade, a assinatura determinada a partir da amostra, preferivelmente a amostra de fluido corporal, com mais preferência, a amostra sanguínea, do indivíduo é considerada diferente da assinatura de referência se o nível de expressão de pelo menos 1,

preferivelmente pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 biomarcadores de acidente vascular cerebral conforme definido no presente documento é pelo menos cerca de 0,5, cerca de 1, cerca de 1,5, cerca de 2, cerca de 2,5, cerca de 3, cerca de 3,5, cerca de 4, cerca de 5, cerca de 6, cerca de 7, cerca de 8, cerca de 9, cerca de 10, cerca de 15, cerca de 20, cerca de 30, cerca de 40, cerca de 50, ou cerca de 100 vezes maior do que o nível de expressão do mesmo biomarcador determinado no indivíduo substancialmente saudável, preferivelmente, na população de referência.

[00163] Em uma modalidade, o indivíduo é diagnosticado com um acidente vascular cerebral quando o nível de expressão de pelo menos um, preferivelmente pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, ou 9 biomarcadores de acidente vascular cerebral de acordo com a invenção é maior do que o nível de expressão do mesmo biomarcador de acidente vascular cerebral em um indivíduo substancialmente saudável, preferivelmente em uma população de referência.

[00164] Em uma modalidade, o indivíduo é diagnosticado com um acidente vascular cerebral quando a pontuação compósita calculada para os níveis de expressão de mais do que um, preferivelmente pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, ou 9 biomarcadores de acidente vascular cerebral de acordo com a invenção, é maior do que o valor de referência predeterminado, *i.e.*, a pontuação compósita calculada para

os níveis de expressão dos mesmos biomarcadores em um indivíduo substancialmente saudável, preferivelmente em uma população de referência.

[00165] Em uma modalidade, o método de diagnóstico de um acidente vascular cerebral de acordo com a presente invenção compreende as etapas de:

fornecer uma amostra, preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência, uma amostra sanguínea, de um indivíduo a ser diagnosticado como sendo afetado ou não com um acidente vascular cerebral;

determinar a assinatura da presente invenção na dita amostra;

comparar a assinatura determinada na etapa ii) com uma assinatura de referência; e

diagnosticar o indivíduo como sendo afetado com um acidente vascular cerebral com base na correlação da assinatura com a assinatura de referência, conforme detalhado acima no presente documento.

[00166] Em uma modalidade, o método de diagnóstico de um acidente vascular cerebral de acordo com a presente invenção compreende as etapas de:

fornecer uma amostra, preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência, uma amostra sanguínea, de um indivíduo a ser diagnosticado como sendo afetado ou não com um acidente vascular cerebral;

determinar a assinatura na dita amostra, preferivelmente medindo-se o nível de expressão de pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou mais biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionado a partir do grupo que compreende ou consiste em *HSPA1B*, *NPAS4*, *DNAJB1*, *ATF3*, *HSPB1*, *RRAD*, *NR4A1*, *CYR61*, *C-FOS*, *GADD45G*, *RGS1*, *ARC*, *EGR4*, *PTGS2*, *RGS2*, *CCL3*, *BAG3*, *EGR2*, *HSPA4L*, *ADM*, *TM4SF1*, *EGR1*, *DUSP1*, *BTG2*, *LOC715456*, *HMOX1*, *LDLR*, *DNAJA4*, *MCL1*, *HSPA6*, *GADD45B*, *IL6*, *ADFP*, *HES4*, *DUSP5*, *GEM* e *GOS2*,

preferivelmente com a condição de que o pelo menos um ou dois biomarcadores de acidente vascular cerebral não consiste em *DUSP1* e/ou *ADM*;

comparar a assinatura determinada na etapa ii) com uma assinatura de referência; e

diagnosticar o indivíduo como sendo afetado com um acidente vascular cerebral com base na correlação da assinatura com a assinatura de referência, conforme detalhado acima no presente documento.

[00167] Em uma modalidade, o método de diagnóstico de um acidente vascular cerebral de acordo com a presente invenção compreende as etapas de:

fornecer uma amostra, preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência, uma amostra sanguínea, de um indivíduo a ser diagnosticado como sendo afetado ou não com um acidente vascular cerebral;

determinar a assinatura na dita amostra, preferivelmente medindo-se o nível de expressão de pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados a partir do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*,

preferivelmente com a condição de que o pelo menos um ou dois biomarcadores de acidente vascular cerebral não consiste em *DUSP1* e/ou *ADM*;

comparar a assinatura determinada na etapa ii) com uma assinatura de referência; e

diagnosticar o indivíduo como sendo afetado com um acidente vascular cerebral com base na correlação da assinatura com a assinatura de referência, conforme detalhado acima no presente documento.

[00168] Em uma modalidade, o método de diagnóstico de um acidente vascular cerebral de acordo com a presente invenção compreende as etapas de:

fornecer uma amostra, preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência, uma amostra sanguínea, de um indivíduo a ser diagnosticado como sendo afetado ou não com um acidente vascular cerebral;

determinar a assinatura na dita amostra, preferivelmente medindo-se o nível de expressão de pelo menos três biomarcadores de acidente vascular cerebral

selecionados a partir do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*;

comparar a assinatura determinada na etapa ii) com uma assinatura de referência; e

diagnosticar o indivíduo como sendo afetado com um acidente vascular cerebral com base na correlação da assinatura com a assinatura de referência, conforme detalhado acima no presente documento.

[00169] Em uma modalidade, o método de diagnóstico de um acidente vascular cerebral de acordo com a presente invenção compreende as etapas de:

fornecer uma amostra, preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência, uma amostra sanguínea, de um indivíduo a ser diagnosticado como sendo afetado ou não com um acidente vascular cerebral;

determinar a assinatura na dita amostra, preferivelmente medindo-se o nível de expressão de *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3* e *TM4SF1*;

comparar a assinatura determinada na etapa ii) com uma assinatura de referência; e

diagnosticar o indivíduo como sendo afetado com um acidente vascular cerebral com base na correlação da assinatura com a assinatura de referência, conforme detalhado acima no presente documento.

[00170] Em uma modalidade, o método de diagnóstico de

um acidente vascular cerebral de acordo com a presente invenção compreende as etapas de:

fornecer uma amostra, preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência, uma amostra sanguínea, de um indivíduo a ser diagnosticado como sendo afetado ou não com um acidente vascular cerebral;

determinar a assinatura na dita amostra, preferivelmente medindo-se o nível de expressão de *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*;

comparar a assinatura determinada na etapa ii) com uma assinatura de referência; e

diagnosticar o indivíduo como sendo afetado com um acidente vascular cerebral com base na correlação da assinatura com a assinatura de referência, conforme detalhado acima no presente documento.

[00171] Em uma modalidade, o método de diagnóstico de um acidente vascular cerebral de acordo com a presente invenção compreende as etapas de i) determinar o nível de expressão de pelo menos um nível de biomarcador selecionado a partir do grupo que consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM* em uma amostra, preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência uma amostra sanguínea, obtida do indivíduo ii) comparar o nível determinado na etapa i) com seu valor de referência predeterminado e iii) diagnosticar um acidente

vascular cerebral quando o nível de expressão determinado na etapa é maior do que o valor de referência predeterminado.

[00172] Em uma modalidade, a assinatura de referência é derivado ou obtido a partir de uma população de referência, preferivelmente uma referência que compreende pelo menos um indivíduo substancialmente saudável.

[00173] Em uma modalidade, o método de diagnóstico de um acidente vascular cerebral de acordo com a presente invenção é aplicado em um indivíduo que apresenta sintomas de acidente vascular cerebral sem ter passado pela triagem de rotina para regular todas as causas possíveis para acidente vascular cerebral.

[00174] Em uma modalidade, o método de diagnóstico de um acidente vascular cerebral de acordo com a presente invenção pode ser parte do conjunto de rotina de testes realizados em um indivíduo que apresenta sintomas de acidente vascular cerebral, tais como, sem limitação, cegueira em um olho, fraqueza em um braço ou perna, fraqueza em um lado inteiro do corpo, tontura, vertigem, visão dupla, fraqueza em ambos os lados do corpo, dificuldade de falar, fala arrastada, ou perda de coordenação.

[00175] Em uma modalidade, o método de diagnóstico de um acidente vascular cerebral de acordo com a presente invenção pode ser realizado adicionalmente a outras ferramentas de diagnóstico que incluem, em particular,

Tomografia Computadorizada (CT) e Imageamento de Ressonância Magnética (MRI).

[00176] A presente invenção se refere adicionalmente a um método de determinar a possibilidade de um indivíduo que sofre acidente vascular cerebral de alcançar uma resposta com uma terapia. A presente invenção se refere adicionalmente a um método de determinar a possibilidade de um indivíduo que sofre acidente vascular cerebral de alcançar uma resposta durante ou após a conclusão de uma terapia.

[00177] Em uma modalidade, o método de determinação da possibilidade de um indivíduo que sofre de acidente vascular cerebral alcançar uma resposta com uma terapia compreende as etapas de i) determinar o nível de expressão de pelo menos um biomarcador da presente invenção selecionado a partir do grupo que consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*, ii) comparar o nível de expressão determinado na etapa i) com um valor de referência predeterminado e iii) concluir que o indivíduo alcança uma resposta quando o nível determinado na etapa i) é menor do que o valor de referência predeterminado.

[00178] Em uma modalidade, o método de determinação da possibilidade de um indivíduo que sofre de acidente vascular cerebral alcançar uma resposta com uma terapia compreende etapas de fornecer uma amostra, preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência, uma

amostra sanguínea, do indivíduo, determinar a assinatura da presente invenção na dita amostra e comparar a dita assinatura com uma assinatura de referência. Essas etapas foram detalhadas acima no presente documento no quadro do método de diagnóstico de um acidente vascular cerebral e aplicar *mutatis mutandis* ao presente método.

[00179] Em uma modalidade, o método de determinação da possibilidade de um indivíduo que sofre de acidente vascular cerebral alcançar uma resposta com uma terapia compreende as etapas de:

fornecer uma amostra, preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência uma amostra sanguínea, do indivíduo;

determinar a assinatura da presente invenção na dita amostra;

comparar a assinatura determinada na etapa ii) com uma assinatura de referência; e

concluir que o indivíduo alcança uma resposta com base na correlação da assinatura com a assinatura de referência, conforme detalhado acima no presente documento.

[00180] Em uma modalidade, o método de determinação da possibilidade de um indivíduo que sofre de acidente vascular cerebral alcançar uma resposta com uma terapia compreende as etapas de:

fornecer uma amostra, preferivelmente uma amostra de

fluido corporal, com mais preferência uma amostra sanguínea, do indivíduo;

determinar a assinatura na dita amostra, preferivelmente medindo-se o nível de expressão de pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou mais biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionado a partir do grupo que compreende ou consiste em *HSPA1B*, *NPAS4*, *DNAJB1*, *ATF3*, *HSPB1*, *RRAD*, *NR4A1*, *CYR61*, *C-FOS*, *GADD45G*, *RGS1*, *ARC*, *EGR4*, *PTGS2*, *RGS2*, *CCL3*, *BAG3*, *EGR2*, *HSPA4L*, *ADM*, *TM4SF1*, *EGR1*, *DUSP1*, *BTG2*, *LOC715456*, *HMOX1*, *LDLR*, *DNAJA4*, *MCL1*, *HSPA6*, *GADD45B*, *IL6*, *ADFP*, *HES4*, *DUSP5*, *GEM* e *GOS2*,

preferivelmente com a condição de que o pelo menos um ou dois biomarcadores de acidente vascular cerebral não consiste em *DUSP1* e/ou *ADM*;

comparar a assinatura determinada na etapa ii) com uma assinatura de referência; e

concluir que o indivíduo alcança uma resposta com base na correlação da assinatura com a assinatura de referência, conforme detalhado acima no presente documento.

[00181] Em uma modalidade, o método de determinação da possibilidade de um indivíduo que sofre de acidente vascular cerebral alcançar uma resposta com uma terapia compreende as etapas de:

fornecer uma amostra, preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência uma amostra sanguínea,

do indivíduo;

determinar a assinatura na dita amostra, preferivelmente medindo-se o nível de expressão de pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados a partir do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*;

preferivelmente com a condição de que o pelo menos um ou dois biomarcadores de acidente vascular cerebral não consiste em *DUSP1* e/ou *ADM*;

comparar a assinatura determinada na etapa ii) com uma assinatura de referência; e

concluir que o indivíduo alcança uma resposta com base na correlação da assinatura com a assinatura de referência, conforme detalhado acima no presente documento.

[00182] Em uma modalidade, o método de determinação da possibilidade de um indivíduo que sofre de acidente vascular cerebral alcançar uma resposta com uma terapia compreende as etapas de:

fornecer uma amostra, preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência uma amostra sanguínea, do indivíduo;

determinar a assinatura na dita amostra, preferivelmente medindo-se o nível de expressão de pelo menos três biomarcadores de acidente vascular cerebral

selecionados a partir do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*;

comparar a assinatura determinada na etapa ii) com uma assinatura de referência; e

concluir que o indivíduo alcança uma resposta com base na correlação da assinatura com a assinatura de referência, conforme detalhado acima no presente documento.

[00183] Em uma modalidade, o método de determinação da possibilidade de um indivíduo que sofre de acidente vascular cerebral alcançar uma resposta com uma terapia compreende as etapas de:

fornecer uma amostra, preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência uma amostra sanguínea, do indivíduo;

determinar a assinatura na dita amostra, preferivelmente medindo-se o nível de expressão de *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3* e *TM4SF1*;

comparar a assinatura determinada na etapa ii) com uma assinatura de referência; e

concluir que o indivíduo alcança uma resposta com base na correlação da assinatura com a assinatura de referência, conforme detalhado acima no presente documento.

[00184] Em uma modalidade, o método de determinação da possibilidade de um indivíduo que sofre de acidente vascular cerebral alcançar uma resposta com uma terapia

compreende as etapas de:

fornecer uma amostra, preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência uma amostra sanguínea, do indivíduo;

determinar a assinatura na dita amostra, preferivelmente medindo-se o nível de expressão de *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*;

comparar a assinatura determinada na etapa ii) com uma assinatura de referência; e

concluir que o indivíduo alcança uma resposta com base na correlação da assinatura com a assinatura de referência, conforme detalhado acima no presente documento.

[00185] Em uma modalidade, a assinatura de referência é derivada ou obtida a partir de uma medição anterior de níveis de expressão de biomarcadores de acidente vascular cerebral de acordo com a invenção, em uma amostra de referência derivada do mesmo indivíduo, tal como, por exemplo, os níveis de expressão de biomarcadores de acidente vascular cerebral medidos antes do início de uma terapia.

[00186] Em uma modalidade, conclui-se que o indivíduo alcança uma resposta quando a assinatura determinada a partir da amostra, preferivelmente a amostra de fluido corporal, com mais preferência, a amostra sanguínea, do indivíduo é considerada diferente da assinatura de referência, conforme definido acima no presente documento.

[00187] Em uma modalidade, a assinatura determinada a partir da amostra, preferivelmente a amostra de fluido corporal, com mais preferência, a amostra sanguínea, do indivíduo é considerada diferente da assinatura de referência se o fold change de expressão de pelo menos 1, preferivelmente pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 biomarcadores de acidente vascular cerebral conforme definido no presente documento for pelo menos menor do que cerca de |1,1|, preferivelmente pelo menos menor do que cerca de |1,2|, cerca de |1,3|, cerca de |1,4|, cerca de |1,5|, cerca de |1,6|, cerca de |1,7|, cerca de |1,8|, cerca de |1,9|, cerca de |2,0|, cerca de |2,1|, cerca de |2,2|, cerca de |2,3|, cerca de |2,4|, cerca de |2,5|, cerca de |3,0|, cerca de |4,0|, cerca de |5,0| ou mais.

[00188] Em uma modalidade, a assinatura determinada a partir da amostra, preferivelmente a amostra de fluido corporal, com mais preferência, a amostra sanguínea, do indivíduo é considerada diferente da assinatura de referência se o fold change de expressão de pelo menos 1, preferivelmente pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 biomarcadores de acidente vascular cerebral conforme definido no presente documento for pelo menos menor do que cerca de 1,1, preferivelmente pelo menos menor do que cerca de 1,2, cerca de 1,3, cerca de 1,4, cerca de 1,5, cerca de 1,6, cerca de 1,7, cerca de 1,8, cerca de 1,9, cerca de 2,0,

cerca de 2,1, cerca de 2,2, cerca de 2,3, cerca de 2,4, cerca de 2,5, cerca de 3,0, cerca de 4,0, cerca de 5,0 ou mais.

[00189] Em uma modalidade, a assinatura determinada a partir da amostra, preferivelmente a amostra de fluido corporal, com mais preferência, a amostra sanguínea, do indivíduo é considerada diferente da assinatura de referência se o fold change de expressão de $\log_2$ de pelo menos 1, preferivelmente pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 biomarcadores de acidente vascular cerebral conforme definido no presente documento é pelo menos menor do que cerca de |0,1|, preferivelmente pelo menos menor do que cerca de |0,2|, cerca de |0,3|, cerca de |0,4|, cerca de |0,5|, cerca de |0,6|, cerca de |0,7|, cerca de |0,8|, cerca de |0,9|, cerca de |1,0|, cerca de |1,1|, cerca de |1,2|, cerca de |1,3|, cerca de |1,4|, cerca de |1,5|, cerca de |1,6|, cerca de |1,7|, cerca de |1,8|, cerca de |1,9|, cerca de |2,0|, cerca de |2,1|, cerca de |2,2|, cerca de |2,3| ou mais.

[00190] Em uma modalidade, a assinatura determinada a partir da amostra, preferivelmente a amostra de fluido corporal, com mais preferência, a amostra sanguínea, do indivíduo é considerada diferente da assinatura de referência se o fold change de expressão de $\log_2$ de pelo menos 1, preferivelmente pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 biomarcadores de acidente vascular cerebral conforme

definido no presente documento é pelo menos menor do que cerca de 0,1, preferivelmente pelo menos menor do que cerca de 0,2, cerca de 0,3, cerca de 0,4, cerca de 0,5, cerca de 0,6, cerca de 0,7, cerca de 0,8, cerca de 0,9, cerca de 1,0, cerca de 1,1, cerca de 1,2, cerca de 1,3, cerca de 1,4, cerca de 1,5, cerca de 1,6, cerca de 1,7, cerca de 1,8, cerca de 1,9, cerca de 2,0, cerca de 2,1, cerca de 2,2, cerca de 2,3 ou mais.

[00191] Em uma modalidade, a assinatura determinada a partir da amostra, preferivelmente a amostra de fluido corporal, com mais preferência, a amostra sanguínea, do indivíduo é considerada diferente da assinatura de referência se o nível de expressão de pelo menos 1, preferivelmente pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 biomarcadores de acidente vascular cerebral conforme definido no presente documento é pelo menos cerca de 0,5, cerca de 1, cerca de 1,5, cerca de 2, cerca de 2,5, cerca de 3, cerca de 3,5, cerca de 4, cerca de 5, cerca de 6, cerca de 7, cerca de 8, cerca de 9, cerca de 10, cerca de 15, cerca de 20, cerca de 30, cerca de 40, cerca de 50, ou cerca de 100 vezes menor do que o nível de expressão do mesmo biomarcador determinado no indivíduo substancialmente saudável, preferivelmente, na população de referência.

[00192] Em uma modalidade, a assinatura determinada a partir da amostra, preferivelmente a amostra de fluido

corporal, com mais preferência, a amostra sanguínea, do indivíduo é considerada diferente da assinatura de referência se o nível de expressão de pelo menos um, preferivelmente pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, ou 9 biomarcadores de acidente vascular cerebral de acordo com a invenção não é maior do que o nível de expressão do mesmo biomarcador de acidente vascular cerebral em um indivíduo substancialmente saudável, preferivelmente em uma população de referência.

[00193] Em uma modalidade, a assinatura determinada a partir da amostra, preferivelmente a amostra de fluido corporal, com mais preferência, a amostra sanguínea, do indivíduo é considerada diferente da assinatura de referência se a pontuação compósita calculada para os níveis de expressão de mais do que um, preferivelmente pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, ou 9 biomarcadores de acidente vascular cerebral de acordo com a invenção, não é maior do que o valor de referência predeterminado, *i.e.*, a pontuação compósita calculada para os níveis de expressão do mesmo biomarcadores em um indivíduo substancialmente saudável, preferivelmente em uma população de referência.

[00194] O método de determinar a possibilidade de um indivíduo que sofre de acidente vascular cerebral alcançar uma resposta com uma terapia é desse modo particularmente adequada para discriminar "respondedores" de "não

respondedores”.

[00195] Conforme usado no presente documento, o termo “**respondedor**” se refere a um indivíduo ou paciente que alcançará uma resposta terapêutica, isto é, um indivíduo no qual o acidente vascular cerebral é reduzido, aliviado ou curado. De acordo com a invenção, os respondedores têm uma resposta objetiva e, portanto, o termo não abrange indivíduos ou pacientes que têm um acidente vascular cerebral estabilizado de modo que a doença não esteja progredindo após a terapia.

[00196] Conforme usado no presente documento, o termo “**não respondedor**” (ou refratário(a)(s)) inclui indivíduos ou pacientes para os quais o acidente vascular cerebral não mostra redução ou aprimoramento após a terapia. De acordo com a invenção, o termo “não respondedor” também inclui indivíduos ou pacientes que têm um acidente vascular cerebral estabilizado.

[00197] Tipicamente, a caracterização do indivíduo como sendo um respondedor ou não respondedor pode ser realizado a título de referência a um padrão ou um conjunto de treinamento. O padrão pode ser o perfil de um indivíduo que é conhecido por ser um respondedor ou não respondedor, ou alternativamente pode ser um valor numérico. Tais padrões predeterminados podem ser fornecidos em qualquer forma adequada, tal como uma lista impressa ou diagrama, programa

de software de computador, ou outra mídia. Em algumas modalidades, o valor predeterminado é o nível de expressão determinado antes da terapia. Quando se conclui que o paciente é um não respondedor, o médico poderia tomar a decisão de parar a terapia para evitar quaisquer efeitos colaterais adversos adicionais.

[00198] Em uma modalidade, para propósitos de monitoramento, níveis de expressão podem ser medidos em múltiplos pontos de tempo, por exemplo, duas vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 6 vezes, 7 vezes, 8 vezes, 9 vezes, 10 vezes ou mais. Dessa maneira, o monitoramento de níveis de expressão ao longo do tempo seguindo ou durante a terapia pode fornecer uma medida do sucesso de tratamento, conforme deve ser esperado que níveis de expressão diminuirão mais rápido em indivíduos com tratamento bem sucedido relativo a um indivíduo não tratado para o qual níveis de expressão podem diminuir, embora mais lentamente.

[00199] Tipicamente, a terapia consiste em qualquer método conhecido pelo elemento versado. Opções de tratamento incluem, porém, sem limitação, procedimentos endovasculares e cirurgia, tal como trombectometria.

[00200] Conforme usado, no presente documento o termo "**trombectometria**" define qualquer remoção cirúrgica ou mecânica ou quebra de um coágulo. Tipicamente, três classes de dispositivos de trombectometria mecânicos são conhecidos:

recuperadores de bobina, dispositivos de aspiração, e recuperadores de stent. Outros dispositivos e métodos, atualmente sob desenvolvimento, são também incluídos na definição de trombectomia usada no presente documento. Tipicamente, um cateter é enviado ao sítio de bloqueio de fluxo sanguíneo para remover o coágulo sanguíneo. Combinação de trombectomia e trombólise pode ser administrada ao paciente. Adicionalmente, o acidente vascular cerebral isquêmico também pode ser tratado administrando-se um agente trombolítico para dissolver o coágulo sanguíneo ("trombólise").

[00201] Agentes antitrombóticos são adicionalmente divididos nos seguintes três subtipos: agentes anticoagulantes, fármacos antiplaquetas, e fármacos trombolíticos.

[00202] Exemplos de agentes anticoagulantes incluem, porém, sem limitação, cumarina, heparina, varfarina, acenocoumarol, femprocumona, atromentina, fenindiona, fondaparinux, idraparinux, inibidores de Xa de fator direto, inibidores de trombina direta, agentes terapêuticos de proteína antitrombina, batroxobina e hementina.

[00203] Exemplos de fármacos antiplaquetas incluem, porém, sem limitação, inibidores de ciclooxigenase irreversível (*por exemplo, aspirina ou triflusal*), inibidores de receptor de difosfato de adenosina (*por*

exemplo, clopidogrel, prasugrel, ticagrelor ou ticlopidina), inibidores de fosfodiesterase (*por exemplo*, cilostazol), inibidores de IIB/IIIA de glicoproteína (*por exemplo*, abciximab, eptifibatida ou tirofiban), inibidores de recaptação de adenosina (*por exemplo*, dipiridamol), e inibidores de tromboxano (*por exemplo*, inibidores de sintaxe de tromboxano ou antagonistas receptores de tromboxano).

[00204] Exemplos de fármacos trombolíticos incluem, porém, sem limitação, t-PA ativador de plasminogênio de tecido (alteplase e outros (desmoteplase, reteplase, tenecteplase, ...), anistreplase, estreptoquinase e uroquinase. t-PA pode ser opcionalmente administrado durante os procedimentos endovasculares.

[00205] Em uma modalidade, a terapia consiste em administrar um agente neuroprotetor.

[00206] Exemplos de agentes neuroprotetores tipicamente incluem, sem limitação, radicais antilivres, agentes antiglutamato e inibidores de CDK.

[00207] Em algumas modalidades, o agente neuroprotetor é um inibidor de quinase dependente de ciclina (CDK). Inibidores de CDK conhecidos podem ser classificados de acordo com sua capacidade de inibir CDKs em geral, ou de acordo com sua seletividade para uma CDK específica. Flavopiridol, *por exemplo*, atua como um antagonista de CDK de "panela" e não é particularmente seletiva para uma CDK

específica (Dai & Grant, **2003**. *Curr Opin Pharmacol*. **3(4)**:362-70). inibidores de CDK baseados em purina, tais como olomoucina, roscovitina, purvanolols e CGP74514A, são conhecidos por exibir uma seletividade maior para CDKs 1, 2 e 5, mas não mostram atividade inibidora contra CDKs 4 e 6 (Dai & Grant, **2003**. *Curr Opin Pharmacol*. **3(4)**:362-70). Além disso, foi demonstrado que inibidores de CDK à base de purina, tais como S-roscovitina podem exercer efeitos antiapoptóticos no sistema nervoso (O'Hare et al., **2002**. *Pharmacol Ther*. **93(2-3)**:135-43; Timsit & Menn, **2012**. *Clin Pharmacol Ther*. **91(2)**:327-32; Gutiérrez-Vargas et al., **2017**. *J Cereb Blood Flow Metab*. **37(6)**:2208-2223) ou prevenir morte neuronal em doenças neurodegenerativas, tais como mal de Alzheimer (Filgueira de Azevedo et al., **2002**. *Biochem Biophys Res Commun*. **297(5)**:1154-8; Knockaert et al., **2002**. *Trends Pharmacol Sci*. **23(9)**:417-25).

[00208] Em algumas modalidades, a terapia consiste em hipotermia (por exemplo, Kurisu & Yenari, **2018**. *Neuropharmacology*. **134(Pt B)**:302-309).

[00209] A presente invenção se refere adicionalmente a um método de determinar a possibilidade de um indivíduo estar em risco de ter acidente vascular cerebral que compreende as etapas de i) determinar o nível de expressão de pelo menos um nível de biomarcador selecionado a partir do grupo que consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*,

BAG3, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM* em uma amostra, preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência uma amostra sanguínea, obtida do indivíduo ii) comparar o nível determinado na etapa i) com seu valor de referência predeterminado e iii) concluir que o indivíduo está em risco de ter acidente vascular cerebral quando o nível de expressão determinado na etapa é maior do que o valor de referência predeterminado.

[00210] Em uma modalidade, o método de determinação da possibilidade de um indivíduo está em risco de ter acidente vascular cerebral compreende etapa de fornecer uma amostra, preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência, uma amostra sanguínea, do indivíduo, determinar a assinatura da presente invenção na dita amostra e comparar a dita assinatura com uma assinatura de referência. Essas etapas foram detalhadas acima no presente documento no quadro do método de diagnóstico de um acidente vascular cerebral e aplicar *mutatis mutandis* ao presente método.

[00211] Em uma modalidade, o método de determinação da possibilidade de um indivíduo está em risco de ter acidente vascular cerebral compreende as etapas de:

fornecer uma amostra, preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência uma amostra sanguínea, do indivíduo;

determinar a assinatura da presente invenção na dita amostra;

comparar a assinatura determinada na etapa ii) com uma assinatura de referência; e

concluir que o indivíduo está em risco de ter acidente vascular cerebral com base na correlação da assinatura com a assinatura de referência, conforme detalhado acima no presente documento.

[00212] Em uma modalidade, o método de determinação da possibilidade de um indivíduo está em risco de ter acidente vascular cerebral compreende as etapas de:

fornecer uma amostra, preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência uma amostra sanguínea, do indivíduo;

determinar a assinatura na dita amostra, preferivelmente medindo-se o nível de expressão de pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou mais biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionado a partir do grupo que compreende ou consiste em *HSPA1B*, *NPAS4*, *DNAJB1*, *ATF3*, *HSPB1*, *RRAD*, *NR4A1*, *CYR61*, *C-FOS*, *GADD45G*, *RGS1*, *ARC*, *EGR4*, *PTGS2*, *RGS2*, *CCL3*, *BAG3*, *EGR2*, *HSPA4L*, *ADM*, *TM4SF1*, *EGR1*, *DUSP1*, *BTG2*, *LOC715456*, *HMOX1*, *LDLR*, *DNAJA4*, *MCL1*, *HSPA6*, *GADD45B*, *IL6*, *ADFP*, *HES4*, *DUSP5*, *GEM* e *GOS2*,

preferivelmente com a condição de que o pelo menos um ou dois biomarcadores de acidente vascular cerebral não

consiste em *DUSP1* e/ou *ADM*;

comparar a assinatura determinada na etapa ii) com uma assinatura de referência; e

concluir que o indivíduo está em risco de ter acidente vascular cerebral com base na correlação da assinatura com a assinatura de referência, conforme detalhado acima no presente documento.

[00213] Em uma modalidade, o método de determinação da possibilidade de um indivíduo está em risco de ter acidente vascular cerebral compreende as etapas de:

fornecer uma amostra, preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência uma amostra sanguínea, do indivíduo;

determinar a assinatura na dita amostra, preferivelmente medindo-se o nível de expressão de pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados a partir do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*;

preferivelmente com a condição de que o pelo menos um ou dois biomarcadores de acidente vascular cerebral não consiste em *DUSP1* e/ou *ADM*;

comparar a assinatura determinada na etapa ii) com uma assinatura de referência; e

concluir que o indivíduo está em risco de ter acidente

vascular cerebral com base na correlação da assinatura com a assinatura de referência, conforme detalhado acima no presente documento.

[00214] Em uma modalidade, o método de determinação da possibilidade de um indivíduo está em risco de ter acidente vascular cerebral compreende as etapas de:

fornece uma amostra, preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência uma amostra sanguínea, do indivíduo;

determinar a assinatura na dita amostra, preferivelmente medindo-se o nível de expressão de pelo menos três biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados a partir do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*;

comparar a assinatura determinada na etapa ii) com uma assinatura de referência; e

concluir que o indivíduo está em risco de ter acidente vascular cerebral com base na correlação da assinatura com a assinatura de referência, conforme detalhado acima no presente documento.

[00215] Em uma modalidade, o método de determinação da possibilidade de um indivíduo está em risco de ter acidente vascular cerebral compreende as etapas de:

fornece uma amostra, preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência uma amostra sanguínea,

do indivíduo;

determinar a assinatura na dita amostra, preferivelmente medindo-se o nível de expressão de *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3* e *TM4SF1*;

comparar a assinatura determinada na etapa ii) com uma assinatura de referência; e

concluir que o indivíduo está em risco de ter acidente vascular cerebral com base na correlação da assinatura com a assinatura de referência, conforme detalhado acima no presente documento.

[00216] Em uma modalidade, o método de determinação da possibilidade de um indivíduo está em risco de ter acidente vascular cerebral compreende as etapas de:

fornecer uma amostra, preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência uma amostra sanguínea, do indivíduo;

determinar a assinatura na dita amostra, preferivelmente medindo-se o nível de expressão de *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*;

comparar a assinatura determinada na etapa ii) com uma assinatura de referência; e

concluir que o indivíduo está em risco de ter acidente vascular cerebral com base na correlação da assinatura com a assinatura de referência, conforme detalhado acima no presente documento.

[00217] Em uma modalidade, a assinatura de referência é derivado ou obtido a partir de uma população de referência, preferivelmente uma referência que compreende pelo menos um indivíduo substancialmente saudável.

[00218] Em uma modalidade, o indivíduo sofre de ou tem sofrido de ou foi diagnosticado com uma doença cardiovascular (*por exemplo, aterosclerose, hipertensão...*) que pode causar acidente vascular cerebral.

[00219] Em uma modalidade, o indivíduo experimentou um acidente vascular cerebral e o método da presente invenção da presente invenção é particularmente adequado para prever um acidente vascular cerebral recorrente.

[00220] O método de determinar a possibilidade de um indivíduo estar em risco de ter acidente vascular cerebral é desse modo particularmente adequado para fornecer um prognóstico e desse modo identificar indivíduos em risco e então tomar todas as intervenções terapêuticas para prevenir acidente vascular cerebral.

[00221] Conforme usado no presente documento, o termo "**risco**" se refere à probabilidade que um evento ocorrerá por um período de tempo específico e pode significar um "risco absoluto" do indivíduo ou "risco relativo".

[00222] "**Risco absoluto**" pode ser medido com referência a qualquer pós-medição de observação real para a coorte de tempo relevante, ou com referência aos valores de

índice desenvolvidos a partir das coortes de histórico estatisticamente válidas que foram seguidas pelo período de tempo relevante.

[00223] **"Risco relativo"** se refere à razão de riscos absolutos de um indivíduo comparados tanto aos riscos absolutos de coortes de baixo risco ou um risco de população média, que pode variar por como fatores de risco clínico são avaliados. Razões ímpares, a proporção de eventos positivos para eventos negativos para um dado resultado de teste, são também comumente usados (ímpares estão de acordo com a fórmula $p / (1 - p)$ em que p é a probabilidade de evento e $(1 - p)$ é a probabilidade de não evento) para não conversão.

[00224] **"Avaliação de risco"** ou **"avaliação de risco"** no contexto da presente invenção abrange realizar uma previsão da probabilidade, ímpares, ou probabilidade de que um evento ou estado de doença pode ocorrer, a taxa de ocorrência do evento ou conversão de um estado de doença a outro. Avaliação com risco também pode compreender previsão de parâmetros clínicos futuros, valores de fator de risco laboratorial tradicional, ou outros índices de reincidência, tanto em termos absolutos como em termos relativos em referência a uma população anteriormente medida.

[00225] A determinação da possibilidade de um indivíduo estar em risco de ter acidente vascular cerebral pode ser usada para realizar medições contínuas ou

categóricas do risco de conversão, diagnosticando assim ou definindo o espectro de risco de uma categoria de indivíduos definidos como estando em risco de conversão. No cenário categórico, a invenção pode ser usada para discriminar entre coortes normais e outras coortes de indivíduos em maior risco. Em uma modalidade, a presente invenção pode ser usada de modo a discriminar aqueles em risco dos normais.

[00226] A presente invenção se refere adicionalmente a um método de determinação do prognóstico de um indivíduo que sofre de acidente vascular cerebral que compreende i) determinar o nível de expressão de pelo menos um nível de biomarcador selecionado a partir do grupo que consiste em *DUSP1*, *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *ADM* e *TM4SF1* em uma amostra, preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência uma amostra sanguínea, obtida do indivíduo ii) comparar o nível determinado na etapa i) com seu valor de referência predeterminado e iii) concluindo que o paciente tem um prognóstico satisfatório quando o nível determinado na etapa i) é menor do que o valor de referência predeterminado ou concluir que o paciente tem um prognóstico fraco quando o nível determinado na etapa i) é maior do que o valor de referência predeterminado.

[00227] Em uma modalidade, o método de determinação do prognóstico de um indivíduo que sofre de acidente vascular cerebral compreende etapas de fornecer uma amostra,

preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência uma amostra sanguínea, do indivíduo, determinar a assinatura da presente invenção na dita amostra e comparar a dita assinatura com uma assinatura de referência. Essas etapas foram detalhadas acima no presente documento no quadro do método de diagnóstico de um acidente vascular cerebral e aplicar *mutatis mutandis* ao presente método.

[00228] Em uma modalidade, o método de determinação do prognóstico de um indivíduo que sofre de acidente vascular cerebral compreende as etapas de:

fornece uma amostra, preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência uma amostra sanguínea, do indivíduo;

determinar a assinatura da presente invenção na dita amostra;

comparar a assinatura determinada na etapa ii) com uma assinatura de referência; e

concluir que o indivíduo o paciente tem um prognóstico satisfatório com base na correlação da assinatura com a assinatura de referência, conforme detalhado acima no presente documento.

[00229] Em uma modalidade, o método de determinação do prognóstico de um indivíduo que sofre de acidente vascular cerebral compreende as etapas de:

fornece uma amostra, preferivelmente uma amostra de

fluido corporal, com mais preferência uma amostra sanguínea, do indivíduo;

determinar a assinatura na dita amostra, preferivelmente medindo-se o nível de expressão de pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou mais biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionado a partir do grupo que compreende ou consiste em *HSPA1B*, *NPAS4*, *DNAJB1*, *ATF3*, *HSPB1*, *RRAD*, *NR4A1*, *CYR61*, *C-FOS*, *GADD45G*, *RGS1*, *ARC*, *EGR4*, *PTGS2*, *RGS2*, *CCL3*, *BAG3*, *EGR2*, *HSPA4L*, *ADM*, *TM4SF1*, *EGR1*, *DUSP1*, *BTG2*, *LOC715456*, *HMOX1*, *LDLR*, *DNAJA4*, *MCL1*, *HSPA6*, *GADD45B*, *IL6*, *ADFP*, *HES4*, *DUSP5*, *GEM* e *GOS2*,

preferivelmente com a condição de que o pelo menos um ou dois biomarcadores de acidente vascular cerebral não consiste em *DUSP1* e/ou *ADM*;

comparar a assinatura determinada na etapa ii) com uma assinatura de referência; e

concluir que o indivíduo o paciente tem um prognóstico satisfatório com base na correlação da assinatura com a assinatura de referência, conforme detalhado acima no presente documento.

[00230] Em uma modalidade, o método de determinação do prognóstico de um indivíduo que sofre de acidente vascular cerebral compreende as etapas de:

fornecer uma amostra, preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência uma amostra sanguínea,

do indivíduo;

determinar a assinatura na dita amostra, preferivelmente medindo-se o nível de expressão de pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados a partir do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*;

preferivelmente com a condição de que o pelo menos um ou dois biomarcadores de acidente vascular cerebral não consiste em *DUSP1* e/ou *ADM*;

comparar a assinatura determinada na etapa ii) com uma assinatura de referência; e

concluir que o indivíduo o paciente tem um prognóstico satisfatório com base na correlação da assinatura com a assinatura de referência, conforme detalhado acima no presente documento.

[00231] Em uma modalidade, o método de determinação do prognóstico de um indivíduo que sofre de acidente vascular cerebral compreende as etapas de:

fornecer uma amostra, preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência uma amostra sanguínea, do indivíduo;

determinar a assinatura na dita amostra, preferivelmente medindo-se o nível de expressão de pelo menos três biomarcadores de acidente vascular cerebral

selecionados a partir do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*;

comparar a assinatura determinada na etapa ii) com uma assinatura de referência; e

concluir que o indivíduo o paciente tem um prognóstico satisfatório com base na correlação da assinatura com a assinatura de referência, conforme detalhado acima no presente documento.

[00232] Em uma modalidade, o método de determinação do prognóstico de um indivíduo que sofre de acidente vascular cerebral compreende as etapas de:

fornecer uma amostra, preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência uma amostra sanguínea, do indivíduo;

determinar a assinatura na dita amostra, preferivelmente medindo-se o nível de expressão de *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3* e *TM4SF1*;

comparar a assinatura determinada na etapa ii) com uma assinatura de referência; e

concluir que o indivíduo o paciente tem um prognóstico satisfatório com base na correlação da assinatura com a assinatura de referência, conforme detalhado acima no presente documento.

[00233] Em uma modalidade, o método de determinação do prognóstico de um indivíduo que sofre de acidente vascular

cerebral compreende as etapas de:

fornecer uma amostra, preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência uma amostra sanguínea, do indivíduo;

determinar a assinatura na dita amostra, preferivelmente medindo-se o nível de expressão de *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*;

comparar a assinatura determinada na etapa ii) com uma assinatura de referência; e

concluir que o indivíduo o paciente tem um prognóstico satisfatório com base na correlação da assinatura com a assinatura de referência, conforme detalhado acima no presente documento.

[00234] Em uma modalidade, a assinatura de referência é derivado ou obtido a partir de uma população de referência, preferivelmente uma referência que compreende pelo menos um indivíduo substancialmente saudável.

[00235] Em uma modalidade, a assinatura de referência é derivado ou obtido a partir de uma medição anterior de níveis de expressão de biomarcadores de acidente vascular cerebral de acordo com a invenção, em uma amostra de referência derivada do mesmo indivíduo, tais como, por exemplo, os níveis de expressão de biomarcadores de acidente vascular cerebral medidos após um acidente vascular cerebral, preferivelmente, não menos do que 6 horas, 12

horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 60 horas, 72 horas, 84 horas ou 96 horas após um acidente vascular cerebral.

[00236] Conforme usado no presente documento, o termo **"prognóstico"** se refere a um previsão do provável resultado de acidente vascular cerebral, isto é, o curso de acidente vascular cerebral ou tempo de sobrevivência do paciente.

[00237] O termo **"prognóstico satisfatório"**, conforme usado no presente documento, se refere a mais do que a probabilidade média de sobrevivência para um paciente que sofre de acidente vascular cerebral conforme comparado a outros membros do mesmo gênero que sofre da mesma afecção.

[00238] O termo **"prognóstico fraco"**, conforme usado no presente documento, se refere a menos do que a probabilidade média de sobrevivência para um paciente que sofre de acidente vascular cerebral conforme comparado a outros membros do mesmo gênero que sofre da mesma afecção.

[00239] A presente invenção se refere adicionalmente a um método de tratamento de um indivíduo afetado com um acidente vascular cerebral.

[00240] Em uma modalidade, o método de tratamento de um indivíduo afetado com um acidente vascular cerebral compreende etapas de fornecimento de uma amostra, preferivelmente, uma amostra de fluido corporal, com mais preferência uma amostra sanguínea, do indivíduo, determinar

a assinatura da presente invenção na dita amostra e comparar a dita assinatura com uma assinatura de referência. Essas etapas foram detalhadas acima no presente documento no quadro do método de diagnóstico de um acidente vascular cerebral e aplicar *mutatis mutandis* ao presente método.

[00241] Em uma modalidade, o método de tratamento de um indivíduo afetado com um acidente vascular cerebral compreende as etapas de:

fornece uma amostra, preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência uma amostra sanguínea, do dito indivíduo;

determinar a assinatura da presente invenção na dita amostra;

comparar a assinatura determinada na etapa ii) com uma assinatura de referência;

diagnosticar o indivíduo como sendo afetado com um acidente vascular cerebral com base na correlação da assinatura com a assinatura de referência, conforme detalhado acima no presente documento; e

tratar o indivíduo se o dito indivíduo tiver sido diagnosticado como sendo afetado com um acidente vascular cerebral na etapa iv).

[00242] Em uma modalidade, o método de tratamento de um indivíduo afetado com um acidente vascular cerebral compreende as etapas de:

fornecer uma amostra, preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência uma amostra sanguínea, do dito indivíduo;

determinar a assinatura na dita amostra, preferivelmente medindo-se o nível de expressão de pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou mais biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionado a partir do grupo que compreende ou consiste em *HSPA1B*, *NPAS4*, *DNAJB1*, *ATF3*, *HSPB1*, *RRAD*, *NR4A1*, *CYR61*, *C-FOS*, *GADD45G*, *RGS1*, *ARC*, *EGR4*, *PTGS2*, *RGS2*, *CCL3*, *BAG3*, *EGR2*, *HSPA4L*, *ADM*, *TM4SF1*, *EGR1*, *DUSP1*, *BTG2*, *LOC715456*, *HMOX1*, *LDLR*, *DNAJA4*, *MCL1*, *HSPA6*, *GADD45B*, *IL6*, *ADFP*, *HES4*, *DUSP5*, *GEM* e *GOS2*,

preferivelmente com a condição de que o pelo menos um ou dois biomarcadores de acidente vascular cerebral não consiste em *DUSP1* e/ou *ADM*;

comparar a assinatura determinada na etapa ii) com uma assinatura de referência;

diagnosticar o indivíduo como sendo afetado com um acidente vascular cerebral com base na correlação da assinatura com a assinatura de referência, conforme detalhado acima no presente documento; e

tratar o indivíduo se o dito indivíduo tiver sido diagnosticado como sendo afetado com um acidente vascular cerebral na etapa iv).

[00243] Em uma modalidade, o método de tratamento de

um indivíduo afetado com um acidente vascular cerebral compreende as etapas de:

fornece uma amostra, preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência uma amostra sanguínea, do dito indivíduo;

determinar a assinatura na dita amostra, preferivelmente medindo-se o nível de expressão de pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados a partir do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*;

preferivelmente com a condição de que o pelo menos um ou dois biomarcadores de acidente vascular cerebral não consiste em *DUSP1* e/ou *ADM*;

comparar a assinatura determinada na etapa ii) com uma assinatura de referência;

diagnosticar o indivíduo como sendo afetado com um acidente vascular cerebral com base na correlação da assinatura com a assinatura de referência, conforme detalhado acima no presente documento; e

tratar o indivíduo se o dito indivíduo tiver sido diagnosticado como sendo afetado com um acidente vascular cerebral na etapa iv).

[00244] Em uma modalidade, o método de tratamento de um indivíduo afetado com um acidente vascular cerebral

compreende as etapas de:

fornecer uma amostra, preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência uma amostra sanguínea, do dito indivíduo;

determinar a assinatura na dita amostra, preferivelmente medindo-se o nível de expressão de pelo menos três biomarcadores de acidente vascular cerebral selecionados a partir do grupo que compreende ou consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*;

comparar a assinatura determinada na etapa ii) com uma assinatura de referência;

diagnosticar o indivíduo como sendo afetado com um acidente vascular cerebral com base na correlação da assinatura com a assinatura de referência, conforme detalhado acima no presente documento; e

tratar o indivíduo se o dito indivíduo tiver sido diagnosticado como sendo afetado com um acidente vascular cerebral na etapa iv).

[00245] Em uma modalidade, o método de tratamento de um indivíduo afetado com um acidente vascular cerebral compreende as etapas de:

fornecer uma amostra, preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência uma amostra sanguínea, do dito indivíduo;

determinar a assinatura na dita amostra,

preferivelmente medindo-se o nível de expressão de *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3* e *TM4SF1*;

comparar a assinatura determinada na etapa ii) com uma assinatura de referência;

diagnosticar o indivíduo como sendo afetado com um acidente vascular cerebral com base na correlação da assinatura com a assinatura de referência, conforme detalhado acima no presente documento; e

tratar o indivíduo se o dito indivíduo tiver sido diagnosticado como sendo afetado com um acidente vascular cerebral na etapa iv).

[00246] Em uma modalidade, o método de tratamento de um indivíduo afetado com um acidente vascular cerebral compreende as etapas de:

fornecer uma amostra, preferivelmente uma amostra de fluido corporal, com mais preferência uma amostra sanguínea, do dito indivíduo;

determinar a assinatura na dita amostra, preferivelmente medindo-se o nível de expressão de *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*;

comparar a assinatura determinada na etapa ii) com uma assinatura de referência;

diagnosticar o indivíduo como sendo afetado com um acidente vascular cerebral com base na correlação da assinatura com a assinatura de referência, conforme

detalhado acima no presente documento; e

tratar o indivíduo se o dito indivíduo tiver sido diagnosticado como sendo afetado com um acidente vascular cerebral na etapa iv).

[00247] Em uma modalidade, a assinatura de referência é derivado ou obtido a partir de uma população de referência, preferivelmente uma referência que compreende pelo menos um indivíduo substancialmente saudável.

[00248] Exemplos de tratamentos adequados e terapias para indivíduos diagnosticados como sendo afetados com um acidente vascular cerebral são conhecidos na técnica, e foram detalhados acima no presente documento.

[00249] A invenção será adicionalmente ilustrada pelo exemplo e figuras a seguir. No entanto, esse exemplo não deve ser interpretado de modo algum como limitador do escopo da presente invenção.

Breve Descrição dos Desenhos

[00250] **A Figura 1** é um conjunto de 3 gráficos que mostram a correlação entre níveis de mRNA e valores de intensidade de microarranjo para (a) *HSPA1B*, (b) *GADD45G* e (c) *CDKN1A* por qRT-PCR. O raio x mostra a razão de $\log_2$ de qRT-PCR mRNA normalizado para *SMC2* e o eixo y mostra o sinal de microarranjo de oligonucleotídeo. Valor *P* do teste U de Mann-Whitney.

[00251] **A Figura 2** é um conjunto de dois diagramas de

Venn da sobreposição mais significativa entre os dois conjuntos de genes expressado diferencialmente no cérebro e no sangue. O painel superior mostra genes regulados negativamente; o painel inferior mostra genes regulados positivamente.

[00252] **A Figura 3** ilustra a cinética de intensidade de gene sanguíneo no sangue para o 9 genes de topo expressados diferencialmente no macaco do gênero *Macaca rhesus* macho S1 entre diferentes pontos de tempo: antes (T_0) e após (T_1 , T_2 , T_3) a isquemia.

[00253] **A Figura 4** ilustra a cinética de intensidade de gene sanguíneo no sangue para o 9 genes de topo expressados diferencialmente no macaco do gênero *Macaca rhesus* macho S2 entre diferentes pontos de tempo: antes (T_0) e após (T_1 , T_2 , T_3) a isquemia.

Exemplos

[00254] A presente invenção é adicionalmente ilustrada pelo exemplos a seguir.

Exemplo 1: identificação de uma assinatura comum entre o cérebro isquêmico e o sangue em um modelo de macaco do gênero *Macaca Rhesus* trombótico

Métodos

Experimento de Animal

[00255] Experimentos foram realizados em 2 macacos do gênero *Macaca rhesus* machos (*Macaca mulatta*) com idade de 12

a 13 anos, e com pesos corporais que variam de 16,5 a 17,2 kg. A seguir, esses dois macacos serão notados como S1 e S2.

[00256] Um protocolo experimental foi submetido ao Comitê de Ética Regional para Experimentação de Animal (Normandy) e aprovação foi concedida para conduzir o estudo (referência nº N/02-03-08/03/02-11). Experimentos foram realizados pelos investigadores licenciados (C.O.) e de acordo com leis e diretrizes de tica francesas e europeias para o cuidado e uso de animais de laboratório (Diretriz 2010/63/EU do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de setembro de 2010 sobre a proteção de animais usados para fins científicos). Durante o curso dos presentes estudos, os macacos foram alojados no Centro de Pesquisa Ciceron (Estabelecimento para Experimentação de Animal, acordo nº B14118001) em gaiolas individuais mantidas em 24 °C com umidade relativa a 50% em um ciclo de luz/escuridão de 12 horas/12 horas e foram alimentados com chow comercial suplementado com frutas frescas e água *ad libitum*. Por toda a duração desses estudos, um cirurgião veterinário estava disponível para supervisionar o bem-estar dos animais.

Modelos de Animal

Modelo de macaco Rhesus trombótico

[00257] Experimentos foram realizados conforme anteriormente descrito (Gauberti *et al.*, **2012**. *Cerebrovasc Dis.* **33(4)**:329-39).

[00258] Brevemente, após a anestesia geral, seguindo a enucleação, a artéria cerebral intermediária direita (MCA) foi exposta. Duas suturas foram posicionadas para isolar a ramificação M1 à qual a micropipeta foi inserida e trombina humana injetada. Cerca de 600 µl de trombina foram injetados em uma concentração de 1 U/µl. Uma primeira injeção de 100 µl foi aplicada seguida por 6 injeção de 50 µl em 2 minutos de intervalo, e então a sutura proximal foi removida e a trombina restante foi injetada. A sutura distal foi então removida após 15 minutos.

[00259] O procedimento total para injeção de trombina levou cerca de 30 minutos.

Anestesia e controle de parâmetros fisiológicos

[00260] Animais foram tranquilizados com cetamina (0,1 mg/kg; IM; Imalgene®). Anestesia gasosa foi induzida por sevoflurano (2,5%; Sevorane®) em oxigênio a 100%. Relaxamento muscular foi obtido por atracurium (0,5 mg/kg; IV; Tracrium®) através de uma veia safenosa.

[00261] Macacos foram mecanicamente ventilados com pressão intermitente positiva em uma frequência respiratória fixada de 22 por minuto. O volume tidal (V_T) foi ajustado para obter uma normocapnia (P_{aCO_2} = 38 a 42 mmHg). Anestesia foi mantida por sevoflurano com 66% de óxido nitroso.

[00262] Durante a cirurgia, concentração de sevoflurano foi aumentada em 3% então diminuída para 1,5 a

2% durante o procedimento de imageamento de ressonância magnética (MRI). A perfusão de atracurium intravenoso foi definida para 0,75 mg/kg/h. Os animais foram posicionados em um quadro estereotáxico antes da cirurgia.

Aquisição de MRI In vivo

[00263] Macacos foram estudados em um MRI clínico 3T (Philips Sense Flex M).

[00264] Imageamento foi realizado no plano axial e coronal e incluiu as seguintes sequências: Angiografia de tempo-de-voo 3D, pesado com T2, recuperação de inversão de atenuação de fluido (FLAIR), imageamento pesado por difusão (DWI), e imageamento pesado com T1, pesado com perfusão pré e pós-contraste (PWI).

Amostras sanguíneas

[00265] Amostras sanguíneas foram obtidas em T_0 antes da cirurgia, mas após anestesia geral, e em $T_1 = +2h$, $T_2 = +3,5h$ e $T_3 = +4,5h$ após oclusão de MCA.

[00266] Para cada amostra sanguínea, 2,5 ml foram extraídos para RNA. Amostras sanguíneas foram coletados com uso de tubos de RNA PAXgenes Blood (PreAnalytix).

Amostras cerebrais

[00267] 12 amostras cerebrais foram tomadas de cada macaco. Em cada macaco, 6 amostras foram tomadas próximas ao sítio de infarto, e 6 amostras foram tomadas da localização correspondente no outro hemisfério. Um total de 12 amostras

cerebrais isquêmicas e 12 amostras cerebrais não isquêmicas foram desse modo analisados.

[00268] Os dois macacos foram operados e sacrificados cerca de 5,5 horas após o início de oclusão (S1: 5h12; S2: 5h35). Um MRI foi realizado entre 3 e 4 horas após o início de oclusão (S1: 3h10; S2: 3h05). Animais foram infundidos por injeção intracardíaca após toracotomia por cerca de um total volume de 8 L de soro salino a 4°C. O cérebro foi então removido após craniotomia e colocado em um molde especificamente designado para fatiamento de cérebro coronal. Cada corte de cérebro foi adicionalmente colocado em uma grade para poder identificar as coordenadas x e y no hemisfério isquêmico e contralateral. Arbitrariamente na grade, numerais romanos foram para o lado isquêmico hemisférico direito e números arábicos para o lado hemisférico não isquêmico esquerdo.

[00269] Isquemia foi visível a olho nu (**dados não mostrados**) e confirmados por tecido isquêmico hipometabólico tratados por tetrazólio que pareceu branco conforme comparado à coloração rosada obtida no hemisfério contralateral não isquêmico.

[00270] Três amostras corticais isquêmicas por animal foram preparadas: uma potencialmente correspondente ao núcleo, e duas da borda, correspondentes potencialmente a uma região penumbral. Três amostras homólogas do hemisfério

contralateral por animal foram também preparadas.

Coloração de TTC

[00271] Para avaliar a atividade metabólica e, portanto, tecido isquêmico, tecidos adjacentes de amostras cerebrais a serem estudados para transcriptômica foram mantidos com cloreto de tetrazólio a 1% (TTC).

Extração de RNA total

[00272] O RNA total foi isolado do córtex cerebral com uso do kit de Tecido de Microarranjo RNeasy seguindo as instruções do fabricante (Qiagen). A integridade do RNA foi avaliada com o Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies) medindo-se o RIN (número de integridade de RNA) (Schroeder *et al.*, **2006**. *BMC Mol Biol.* **7**:3). o RIN medido foi entre 6,3 e 8,8.

[00273] O RNA total foi isolado das amostras sanguíneas com uso do Kit PAXgene Blood RNA (PreAnalytix). mRNA de Globina foi removido do RNA total com uso do kit GlobinClear (Ambion). o RIN medido foi entre 7,8 e 10.

Microarranjo de expressão de Macaca e escolha de amostras

[00274] RNA do córtex cerebral (30 ng) e da amostra sanguínea (30 ng) foram marcadas com uso do kit Low Input Quick Amp WT Labeling (Agilent Technologies). Controles de pico de RNA foram usados para ajustar possíveis efeitos de tintura. RNA foi convertido em cDNA com uso de transcriptase

reversa e iniciadores de WT (iniciador de promotor T7 e iniciador aleatório com um promotor T7). Polimerase de RNA T7 foi usada para a síntese e marcação de cRNA com Cy3. As ondas de cRNA marcadas com fluorescência foram purificadas com uso do mini kit RNeasy (Qiagen).

[00275] Uma quantidade igual (3,75 µg) de sondas de cRNA Cy3 foram hibridizadas em chip de DNA 4x44K Agilent (número de catálogo: G2519F, *Macacca mulatta*). Hibridização foi realizada por 17 horas, rotacionando em 10 rpm em 65 °C. Então, amostras foram lavadas e secas de acordo com as instruções do fabricante.

[00276] Imagens de hibridização foram obtidas com uso de dispositivo de varredura de microarranjo de DNA Agilent e dados de intensidade foram extraídos com uso de software de Extração de Recurso (Agilent Technologies). Esse arranjo contém 43803 sondas de macaco do gênero *Macaca rhesus*. Essas sondas são oriundas de RefSeq (Liberação 37, out. de 2009), Unigene (Liberação 13, out. de 2009), MRNA de UCSC (out de 2009), Ensembl (Liberação 56, set de 2009), UCSC RheMac2 (jan de 2006). Muitas sondas são previstas com base em genes humanos ortólogos. Adicionalmente, algumas sondas são anotadas somente como cDNA de *Macaca mulatta*, e diferente do que pode ser inferido a partir de homologia com humano, as funções não são conhecidas. Análise foi realizada em colaboração com Genosplice (Evry, França), uma empresa

especializada em análise transcriptômica.

Análise de microarranjo

[00277] Análise de expressão diferencial dos dados de expressão de microarranjo Agilent foi realizada com uso de limma do projeto Bioconductor (Smyth, **2004**. *Stat Appl Genet Mol Biol.* **3**:Artigo 3). Dados brutos foram normalizados, primeiros realizando-se correção de fundo e então normalizando-se entre arranjos para todas as amostras cerebrais e sanguíneas também com uso de limma. Sondas foram anotadas com uso de informações de arranjo da Agilent fornecida em Array Express (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/arranjos/Um-GEOD-9861/?page=71&pagesize=100&sortby=organism&sortorder=descending>) e informações de gene fornecidas por GenosplICE.

[00278] O pacote de limma realiza análise de expressão diferencial adaptando-se primeiro os dados de expressão de cada gene a um modelo linear. O mesmo então utiliza Empirical Bayes (eBayes) para trazer informações através de genes, o que permite realizar análise através de um pequeno número de arranjos.

[00279] Todas as análises de expressão diferencial dos dados de microarranjo de cérebro foram realizadas com uso do método eBayes de limma (Smyth, **2005**. *limma: Linear Models for Microarray Data*. Em: Gentleman *et al.* (Eds), *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R*

and Bioconductor. Statistics for Biology and Health. Nova Iorque, NY: Springer).

Estatística

Comparação de gene altamente expressado no cérebro

[00280] Os dois macacos foram analisados separadamente. Genes foram marcados como “expressado de forma altamente diferencial” se os mesmos tivessem um fold change de mais do que 2 (isto é, um fold change de $\log_2$ maior do que 1) em ambos os macacos ao comparar as amostras cerebrais isquêmicas e não isquêmicas, e tivessem um fold change de menos do que 2 ao comparar as amostras isquêmicas entre macacos ou ao comparar as amostras não isquêmicas entre macacos.

Comparação de gene altamente expressado no sangue

[00281] Amostras sanguíneas foram analisadas comparando-se a amostra de pré-oclusão a cada amostra de pós-oclusão. Os dois macacos foram analisados separadamente. O ponto de tempo com o maior fold change foi selecionado para análise adicional e chamado “sangue máximo S1” e “sangue máximo S2” (**Tabela 1**). Genes foram marcados como “expressado de forma altamente diferencial” se os mesmos tivessem um fold change maior do que 1,5 em ambos os macacos ao comparar a amostra de pré-oclusão a “sangue máximo S1” e “sangue máximo S2”.

[00282] Somente genes expressados de forma altamente

diferencial tanto em amostras cerebrais isquêmicas quanto amostras sanguíneas pós-exclusão conforme definido acima foram comparados e usados para identificar genes comuns expressados de forma altamente diferencial.

Controle de qualidade de dados

Validação Interna

[00283] Um Ensaio de Expressão de Gene TaqMan R de duas etapas específico de sonda foi usado para validar resultados de microarranjo (Applied Biosystems). Genes para validação foram escolhidos com base em classificação de expressão diferencial e anotação biológica relevante à isquemia. Foi escolhido *SMC2* para normalização através de genes alvo, para esse gene mostrou uma expressão constante em amostras isquêmicas e não isquêmicas. IDs de sonda de ensaio de Expressão de Gene foram conforme a seguir: *HSPA1B* (A 01 P010726), *GADD45G* (A 01 P018040), *CDKN1A* (A 01 P002585), *SMC2* (A 01 P019124).

[00284] 100 ng de RNA total de cada amostra foi usado para gerar cDNA com uso do Kit de Síntese de Primeira fita SuperScript® III (ThermoFisher scientific) seguindo o protocolo do fabricante. Reações de PCR em Tempo Real foram realizados no Sistema Roche LightCycler R480. Expressões de Gene foram comparadas entre tecidos isquêmicos e não isquêmicos com uso do método C_T comparativo (Método $\Delta\Delta C_T$) com o teste U de Mann-Whitney (Wilcoxon), utilizando software

v6.0c Prism (GraphPad, La Jolla, CA).

Validação Externa

[00285] Tentou-se a verificação dos resultados com uso de dados de um estudo por Cook *et al.* (**2012**. *Nature*. **483 (7388)**:213-7). Esse estudo também examinou transcriptômica de acidente vascular cerebral em primata girencefálico, no entanto, com uso de macacos do gênero *Macaca cinomolgus*, um próximo relativo de *Macaca mulatta* (Street *et al.*, **2007**. *BMC Genomics*. **8**:480). De modo a validar os resultados constatados em *Macaca mulatta*, foram analisados dados de placebo e transcriptoma não isquêmica a partir do estudo de Cook *et al.* Os dados isquêmicos e não isquêmicos de placebo foram acessados de GEO (adesão: GSE35589) e analisados com uso dos métodos descritos acima.

Sobreposição de gene de cérebro-sangue

[00286] Sobreposição significativa entre resultados diferenciais de expressão de cérebro e resultados de expressão diferencial de sangue foi determinada com uso do teste de sobreposição hipergeométrica de rank-rank (Plaisier *et al.*, **2010**. *Nucleic Acids Res.* **38 (17)**:e169). Esse método realiza um teste hipergeométrico em todas as sobreposições possíveis das listas ordenadas de genes de modo a identificar o corte no qual a sobreposição entre os dois conjuntos é a mais significativa. As listas de gene total foram ordenadas pelo fold change de log médio entre os dois macacos. De modo

a examinar genes específicos cuja expressão mudou no cérebro e no sangue, foi produzida uma lista filtrada de genes expressados de forma altamente diferencial no cérebro (consultar os métodos acima) e calculou o valor de fold change máximo para cada um desses genes no sangue.

Análise de enriquecimento de conjunto de genes

[00287] A análise de enriquecimento de conjunto de genes foi realizada com uso da ferramenta de linha de comando GSEA (Subramanian *et al.*, **2005**. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102 (43)**:15545-50). Essa ferramenta fornece um conjunto de genes predefinido e determina a possibilidade de cada conjunto ser enriquecido próximo ao topo ou fundo da lista experimental ordenada, que é indicativa de uma função fenotípica. GSEA calcula uma pontuação de enriquecimento (ES) para cada conjunto de genes avaliado. Essa pontuação indica o grau ao qual o conjunto é sobrerrepresentado no topo ou no fundo da lista de gene experimental ordenada. A pontuação de enriquecimento normalizada (NES) é normalizada pelo tamanho do conjunto de genes.

[00288] Resultados da análise de expressão diferencial de cérebro e sangue foram ordenados por fold change de log. Essas listas foram passadas para função pré-classificada de GSEA. A análise foi executada com uso de 100 permutações, e conjuntos de genes com menos do que 10 genes foram excluídos. Os conjuntos de genes resultantes foram

ordenados pela NES. A ES de GSEA indica o grau ao qual um conjunto de genes é sobrerrepresentado no topo ou fundo da lista de gene ordenada. A ES é calculada movendo-se a lista e aumentando a pontuação quando um gene está presente e diminuindo-se quando o mesmo não está. A magnitude pela qual a pontuação é aumentada depende da correlação do gene com o fenótipo (conjunto de genes predefinido). A ES é o desvio máximo de 0 encontrado ao mover a lista para baixo. Um positive ES indica enriquecimento no topo da lista (nos genes regulados positivamente), e um negative ES indicou enriquecimento no fundo. A ES normalizada contabiliza diferenças no tamanho do conjunto de genes e correlações entre conjuntos de genes e os dados de expressão, permitindo comparações entre conjuntos de genes.

[00289] As interações entre genes nesses conjuntos de genes foram visualizadas com uso do banco de dados STRING (Szklarczyk *et al.*, **2015**. *Nucleic Acids Res.* **43(Database issue)**:D447-52). Genes foram inseridos em STRING se os mesmos tivessem um fold change de pelo menos 2 no cérebro, e 1,5 no sangue. A espessura das linhas indica a confiabilidade de que existe uma relação e os grandes nós indicam proteínas para os quais há informações acerca da estrutura terciária.

Resultados

[00290] Animais foram sacrificados cerca de 5,5 horas após início de isquemia. A imagem ponderada com difusão de

MRI axial mostrou uma isquemia focal de MCA em ambos os animais (**dados não mostrados**). A análise do volume de isquemia nos dois animais diferentes mostrou que o volume de infarto foi altamente variável: S1 teve um volume de infarto visivelmente maior do que S2. Infartos superficiais e profundos foram observados para S1 e S2 de animal. O infarto foi também visível em imagem de flair T2 em ambos os animais. MRI de Willis Angio mostrou que MCA foi ocluso de modo proximal para S1 de animal enquanto o mesmo foi menos claro para S2 animal. Infarto foi também visível em sequência T1 no nível de gânglio basal em S1 e S2 de animais.

Mudanças de expressão de gene: tecido isquêmico versus isquêmico não cerebral

[00291] Nesse estudo, mudanças de expressão entre tecido isquêmico e isquêmico não cerebral foi medido para genes individuais, e o efeito dessas mudanças foi examinado no nível de conjuntos de genes. Uma análise de expressão diferencial foi realizada que compreende dados de expressão de tecido isquêmico cerebral a dados da região correspondente do hemisfério contralateral, que não sofreu isquemia.

[00292] Essa análise revelou que os padrões de expressão de amostras cerebrais isquêmicas e não isquêmicas são visivelmente diferentes (**dados não mostrados**). Genes foram considerados expressos de forma altamente diferencial se os mesmos tivessem um fold change maior do que 2 ao

comparar amostras cerebrais isquêmicas e não isquêmicas dentro de cada macaco e esses genes não foram expressados diferencialmente ao comparar tecido isquêmico entre macacos ou non-tecido isquêmico entre macacos (fold change < 2). Quando agrupamento hierárquico foi aplicado a esses melhores genes expressados diferencialmente (37 genes), as amostras isquêmicas se agrupam claramente independentemente das amostras não isquêmicas.

[00293] Todos os genes expressados de forma altamente diferencial foram regulados positivamente (**Tabela 1**).

Tabela 1: a lista de genes que foram considerados expressados de forma altamente diferencial no cérebro isquêmico após filtração extensiva.

[00294] Os valores mostram em colunas "cérebro S1" e "cérebro S2" são os valores de fold change de $\log_2$ desses genes no cérebro dos dois macacos.

[00295] As colunas "sangue máximo S1", "ponto de tempo S1", "sangue máximo S2" e "ponto de tempo S2" mostram dados de sangue dos mesmos dois macacos. O ponto de tempo com o fold change de $\log_2$ máximo é mostrado para cada.

[00296] Genes que são expressos de forma altamente diferencial no sangue (fold change > |1.5|) aparecem em negrito e acinzentado.

[00297] *HSPA1B* e *LOC720054* (*HSPA1B*) são sondas de replicata para diferentes regiões do mesmo gene.

Símbolo do gene	cérebro S1	cérebro S2	sangue máximo S1	ponto de tempo S1	sangue máximo S2	ponto de tempo S2
HSPA1B	4,67	5,40	1,86	T₀ vs T₃	0,99	T₀ vs T₁
LOC720054 (HSPA1B)	4,51	5,25	1,70	T ₀ vs T ₃	0,53	T ₀ vs T ₁
NPAS4	3,57	2,65	0,05	T ₀ vs T ₂	0,06	T ₀ vs T ₂
LOC718890 (DNAJB1)	3,37	4,16	1,12	T ₀ vs T ₁	0,22	T ₀ vs T ₁
ATF3	2,99	3,38	0,27	T ₀ vs T ₁	-0,04	T ₀ vs T ₁
HSPB1	2,85	3,30	-0,63	T ₀ vs T ₂	-0,15	T ₀ vs T ₃
RRAD	2,74	4,26	0,81	T ₀ vs T ₃	-0,03	T ₀ vs T ₁
NR4A1	2,72	2,88	0,03	T ₀ vs T ₁	-0,27	T ₀ vs T ₃
CYR61	2,61	2,34	0,11	T ₀ vs T ₂	0,17	T ₀ vs T ₃
C-FOS	2,53	3,77	0,17	T ₀ vs T ₂	0,45	T ₀ vs T ₂
GADD45G	2,25	2,04	0,44	T ₀ vs T ₃	0,87	T ₀ vs T ₃
RGS1	2,01	2,04	0,23	T ₀ vs T ₁	0,57	T ₀ vs T ₂
LOC714407 (EGR4)	1,84	1,76	-0,19	T ₀ vs T ₂	0,28	T ₀ vs T ₃
ARC	1,84	1,90	0,27	T ₀ vs T ₃	0,08	T ₀ vs T ₃
PTGS2	1,84	1,41	3,09	T₀ vs T₂	3,78	T₀ vs T₃
RGS2	1,81	1,79	0,10	T ₀ vs T ₂	0,81	T ₀ vs T ₂
CCL3	1,78	2,18	-0,49	T ₀ vs T ₁	0,00	T ₀ vs T ₃
BAG3	1,70	2,97	0,99	T₀ vs T₁	0,71	T₀ vs T₁
HSPA4L	1,68	1,64	-0,13	T ₀ vs T ₁	0,30	T ₀ vs T ₃
EGR2	1,68	2,09	-0,12	T ₀ vs T ₂	-0,16	T ₀ vs T ₃
ADM	1,66	2,59	2,60	T₀ vs T₃	0,86	T₀ vs T₃
TM4SF1	1,61	2,42	0,65	T₀ vs T₃	1,01	T₀ vs T₃
EGR1	1,56	2,10	0,22	T ₀ vs T ₁	0,07	T ₀ vs T ₃
DUSP1	1,43	1,34	2,08	T₀ vs T₃	1,87	T₀ vs T₂
BTG2	1,42	1,38	0,39	T ₀ vs T ₁	0,14	T ₀ vs T ₂
LOC715456	1,36	1,14	1,33	T ₀ vs T ₁	0,15	T ₀ vs T ₃
HMOX1	1,30	1,13	2,81	T₀ vs T₃	0,83	T₀ vs T₃
altamente similar a LDLR	1,29	1,12	2,60	T₀ vs T₁	1,56	T₀ vs T₁

humano [CN641580]						
<i>DNAJA4</i>	1,28	1,65	0,56	T ₀ vs T ₃	-0,03	T ₀ vs T ₁
<i>MCL1</i>	1,24	1,52	0,56	T ₀ vs T ₃	0,34	T ₀ vs T ₁
<i>LOC720001 (HSPA6)</i>	1,20	1,07	0,31	T ₀ vs T ₁	0,08	T ₀ vs T ₁
<i>GADD45B</i>	1,08	2,17	0,46	T ₀ vs T ₂	0,94	T ₀ vs T ₂
<i>IL6</i>	1,08	1,53	-0,47	T ₀ vs T ₃	-0,10	T ₀ vs T ₂
<i>ADFP</i>	1,08	1,25	0,61	T ₀ vs T ₁	0,34	T ₀ vs T ₁
<i>HES4</i>	1,08	1,18	-0,04	T ₀ vs T ₁	0,13	T ₀ vs T ₁
<i>DUSP5</i>	1,05	1,67	-0,30	T ₀ vs T ₁	-0,78	T ₀ vs T ₁
<i>GEM</i>	1,04	1,55	0,39	T ₀ vs T ₂	0,19	T ₀ vs T ₁
<i>LOC717581 (similar a GOS2)</i>	1,00	1,96	1,90	T₀ vs T₂	1,47	T₀ vs T₃

Validação Interna

[00298] Para confirmar a robustez dos resultados de microarranjo, níveis de mRNA de três genes sensitivos isquêmicos (*HSPA1B*, *GADD45G*, *CDKN1A*) foram quantificados por RT-qPCR com uso de amostras dos animais. *SMC2*, que foi constatado por exibir nível de expressão invariável através de todas as amostras de teste, foi usado como referência interna (interna). Três transcrições reversas foram realizadas para cada amostra de RNA, seguido por três execuções de qPCR independentes, com medições de ensaio de replicata tanto para o gene alvo quanto para o gene de referência. Para todos os genes, a direção e magnitude da mudança estiveram de acordo com os dados de microarranjo (**Figura 1 e Tabela 2**).

Tabela 2: validação interna.

[00299] Significância estatística: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001. Resultados foram normalizados para SMC2.

	Estudo de microarranjo		Validação de qPCR	
Gene	Fold change	Valor p	Fold change	Valor p
<i>HSPA1B</i>	32,78	$3,80 \times 10^{-18}$	33,3	***
<i>GADD45G</i>	4,41	$9,40 \times 10^{-10}$	3,7	**
<i>CDKNA1</i>	2,05	$1,49 \times 10^{-4}$	2,3	**

Validação Externa

[00300] Análise de dados de transcriptoma a partir do estudo de Cook et al. de acidente vascular cerebral (2012. *Nature*. **483(7388)**:213-7) em *Macaca fascicularis* produziu resultados muito diferentes do que foi descrito aqui. Embora essa análise de *Macaca mulatta* tenha revelado muitos genes regulados positivamente nos tecidos afetados por acidente vascular cerebral, os dados de *Macaca fascicularis* mostraram principalmente genes regulados negativamente. Isso tem máxima probabilidade devido ao método muito diferente para induzir acidente vascular cerebral nos primatas. O estudo por Cook et al. usou oclusão de artéria cerebral intermediária cirúrgica (MCAO), que os mesmos reconheceram produz um acidente vascular cerebral mais severo do que é geralmente observado em humano. É provável que esse modelo de acidente vascular cerebral mais severo tenha causado morte

celular massiva resultando em genes principalmente regulados negativamente.

Enriquecimento de conjuntos de genes

[00301] Conjuntos de genes que são enriquecidos em tecido isquêmico cerebral foram identificados com uso da Análise de Enriquecimento de Conjunto de Genes (GSEA) da Broad Institute (Subramanian *et al.*, **2005**. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102 (43)**:15545-50). Os 5 melhores conjuntos de genes enriquecidos dos conjuntos de genes de Hallmark de GSEA foram sinalização de TNFA por meio de NFkB, apoptose, via de P53, hipóxia, e resposta positiva de UV, dos quais todos foram regulados positivamente (**Tabela 3**).

Tabela 3: Os 5 melhores conjuntos de genes resultantes de resultados de expressão diferencial de análise de GSEA no cérebro.

Nome do Conjunto de Genes	Tamanho de Conjunto	Genes presentes (percentagem)	NES
sinalização de TNFA por meio de NFkB	108	60 (55,56%)	2,9935637
Apoptose	98	26 (26,53%)	2,5899184
Via P53	112	28 (25%)	2,5179965
Hipóxia	118	33 (27,97%)	2,455276
Resposta positiva de UV	96	31 (32,29%)	2,3801901

[00302] 60 do conjunto de 108 genes tiveram um

enriquecimento de núcleo na sinalização de TNFA por meio de conjunto de genes de NFkB (NES = 2,96). Quase todos os genes nesse conjunto para os quais tem-se dados são regulados positivamente, nenhum é significativamente genes regulados negativamente: 15 genes somente são ligeiramente regulados negativamente com um fold change máximo de 1,17.

[00303] No conjunto de genes de apoptose, 26 dos 98 genes têm enriquecimento de núcleo (NES = 2,57).

[00304] No conjunto de genes de hipóxia, 33 dos 118 genes tiveram enriquecimento de núcleo (NES = 2,38).

[00305] O conjunto de genes de resposta positiva de UV tiveram 31 dos 96 genes com enriquecimento de núcleo (NES = 2,3).

[00306] O conjunto de genes regulado negativamente mais significativamente enriquecido foi fosforilação oxidativa. 84 desses genes, dos 120, tiveram enriquecimento de núcleo (NES = -2,57).

Interação de produtos de gene

[00307] O banco de dados STRING (Szklarczyk *et al.*, **2015**. *Nucleic Acids Res.* **43(Database issue)**:D447-52) foi usado de modo a visualizar a interação dos produtos de genes de genes que são expressos de forma altamente diferencial no cérebro e sangue dentro dos melhores conjuntos de genes do cérebro (fold change ≥ 2 no cérebro, fold change $\geq 1,5$ no sangue) (**dados não mostrados**).

[00308] Foi observado que IL-6 é um membro altamente conectado nas redes que representam sinalização de TNFA por meio de NFkB, apoptose e hipóxia. Adicionalmente, *CDKN1A* aparece em todas as quatro dessas redes. A interação de *CDKN1A* com *HMOX1* é observada nessa rede de apoptose-, via p53, e genes relacionados a hipóxia. O gene *ATF3* também aparece em todas as quatro redes, e o mesmo interage com IL-6 nos três mencionados acima. O 5º conjunto de genes no cérebro classificado (**Tabela 3**), reposta positiva de UV, não é mostrada devido ao fato de que nenhum dos genes de topo expressados diferencialmente nesse conjunto têm quaisquer interações conhecidas.

Mudanças de expressão de Gene: amostras sanguíneas de pré-oclusão versus pós-oclusão

[00309] Genes diferentemente expressados no sangue durante isquemia cerebral foram identificados comparando-se todas as amostras sanguíneas pré-oclusão a todas as amostras sanguíneas pós-oclusão. Quando agrupamento hierárquico foi aplicado aos genes de topo expressados diferencialmente, amostras pré-oclusão e pós-oclusão se agrupam separadamente (**dados não mostrados**). Também parece ser padrões de expressão diferentes no sangue dos dois macacos do gênero *Macaca* com base nesse agrupamento de gene. Macaco S1 tem uma regulação positiva mais profunda desses genes do que o macaco S2. Essa separação dos dois macacos não é aparente nos padrões de

expressão do cérebro (**dados não mostrados**).

[00310] Assim como as amostras cerebrais, enriquecimento de conjunto de genes dos resultados de sangue expressão diferencial foi analisado. Os 5 melhores conjuntos de genes enriquecidos são sinalização de TNFA por meio de NFkB, hipóxia, sinalização de hedgehog, resposta inflamatória e angiogênese (**Tabela 4**).

Tabela 4: os 5 melhores conjuntos de genes resultantes de resultados de expressão diferencial de análise de GSEA no sangue.

Nome do conjunto de genes	Tamanh o de Conjun to	Genes presentes (percentagem)	NES
sinalização de TNFA por meio de NFkB	108	37 (34,36%)	1,919011 7
Hipóxia	118	42 (25,59%)	1,913183 7
Sinalização de Hedgehog	24	10 (41,67%)	1,779471
Resposta inflamatória	110	35 (31,82%)	1,767838 5
Angiogênese	20	9 (45%)	1,756243 1

[00311] A sinalização de TNFA por meio de NFkB e conjuntos de genes de hipóxia também apareceu nos 5 melhores conjuntos de genes para o cérebro (**Tabela 4**).

[00312] 37 dos 108 genes na sinalização de TNFA por meio de NFkB conjunto de genes tiveram enriquecimento de

núcleo (NES = 1,92).

[00313] 42 dos 118 genes no conjunto de genes de hipóxia tiveram enriquecimento de núcleo (NES = 1,91).

[00314] 10 dos 24 genes no conjunto de genes de sinalização de hedgehog tiveram um enriquecimento de núcleo (NES = 1,77).

[00315] 35 dos 110 genes no conjunto de genes de resposta inflamatória tiveram enriquecimento de núcleo (NES = 1,77).

[00316] 9 dos 20 genes no conjunto de genes de angiogênese tiveram enriquecimento de núcleo (NES = 1,76).

Genes diferentemente expressados comuns entre o cérebro e o sangue

[00317] Resultados de expressão diferencial do cérebro e sangue foram examinados para sobreposição significativa quando genes foram ordenados por fold change. Foi mostrado que os dois conjuntos de genes ordenados são altamente similares, particularmente nos dois extremos: os genes mais regulados positivamente e os genes mais regulados negativamente durante a isquemia. Foi mostrado que os genes sobreprojetantes do mapa de calor que são os mais significativos: 2156 genes regulados negativamente se sobrepõem significativamente entre amostras cerebrais e sanguíneas, e 493 genes regulados positivamente se sobrepõem significativamente (**Figura 2**). A maioria desses genes têm

uma fold-change de expressão relativamente baixo, no entanto, a sobreposição de genes expressados diferencialmente é muito alta entre amostras cerebrais e sanguíneas.

[00318] Embora muitos genes nesses conjuntos sobreprojetantes não tenham sido expressos de forma altamente diferencial, alguns foram, e eram aqueles com uma mudança muito alta de expressão no cérebro que foram de maior interesse. Dos genes identificados conforme expressado de forma altamente diferencial no cérebro, 9 foram também expressados diferencialmente no sangue (fold change $\geq 1,5$; **Tabela 1**, destacado em negrito). Todos os 9 desses genes ocorrem dentro da sobreposição hipergeométrica mais significativa (em negrito). Esses genes são *PTGS2*, do tipo *GOS2*, *DUSP1*, do tipo *LDLR*, *HMOX1*, *HSPA1B*, *BAG3*, *ADM* e *TM4SF1*. A maioria desses genes tem um aumento acentuado de expressão no sangue, que é nivelada ao longo do tempo (**Figuras 3 e 4**).

Discussão

[00319] Um modelo primata não humano (Gauberti *et al.*, **2012**. *Cerebrovasc Dis.* **33(4)**:329-39) com injeção de trombina humana na artéria de MCA foi usado para estudar padrões de mudanças de expressão de gene durante acidente vascular cerebral isquêmico. Esse é um modelo embólico de isquemia focal com uma isquemia de MCA parcial. Um quadro de tempo de 6 horas foi usado, devido ao fato de que essa é a janela de

tempo em que intervenções terapêuticas são possíveis em humano (trombólise até 4h30; tromnectometria até 6h após o início).

[00320] O estudo de dados de expressão de microarranjo de macaco do gênero *Macaca* do cérebro e sangue revelou que amostras isquêmicas e não isquêmicas podem ser distinguidas com base em seus perfis de expressão, e a maioria dos genes expressados de forma altamente diferencial é regulada positivamente no cenário isquêmico 6 horas após a isquemia. Muitos desses genes regulados positivamente pertencem a vias envolvidas em morte celular e reparo de danos de DNA. Uma comparação de genes expressados diferencialmente no cérebro e o sangue revelou uma sobreposição significativa de padrões de expressão de gene.

[00321] Esses resultados indicam o potencial para identificar acidente vascular cerebral isquêmico através de transcriptômica no cérebro e o sangue.

Expressão de gene em cérebro isquêmico

[00322] A qualidade dos dados foi confirmada por análise de PCA que mostra que foi possível diferenciar ambos os macacos e isquemia de não isquemia por expressão de gene. Além disso, validação interna adicionalmente corroborou os resultados gerados.

[00323] O agrupamento hierárquico de dados de expressão cerebral de *Macaca mulatta* revelou forte

agrupamento independente de amostras cerebrais isquêmicas e não isquêmicas (**dados não mostrados**). Esses resultados indicaram um potencial para identificar tecido isquêmico cerebral com base em perfis de expressão. Os genes mais significativamente expressados diferencialmente foram regulados positivamente, que é consistente com muitos estudos anteriores de isquemia em camundongo (Büttner *et al.*, **2009**. *Brain Res.* **1252**:1-14; Hori *et al.*, **2012**. *Dis Model Mech.* **5**(2):270-83). Esse estudo definiu genes expressos de forma altamente diferencial no cérebro como genes que têm um fold change mínimo de 2 em ambos os macacos, e os genes não são expressados diferencialmente ao comparar amostras não isquêmicas entre macacos ou ao comparar amostras isquêmicas entre macacos (fold change < 2). Os resultados da análise constataram que 37 genes foram regulados positivamente e nenhum foi regulado negativamente no cérebro. Esses resultados são similares a aqueles de Büttner *et al.* que constatou 115 genes regulados positivamente e 19 genes regulados negativamente após 6 horas (Büttner *et al.*, **2009**. *Brain Res.* **1252**:1-14). O número maior de genes identificados por Büttner *et al.* pode ser explicado pelo maior arranjo de perfil de expressão usado e diferenças de expressão entre espécies.

[00324] Todos os genes expressados de forma altamente diferencial in tecido isquêmico cerebral foram regulados

positivamente. Muitos desses genes foram anteriormente identificados como genes regulados positivamente em acidente vascular cerebral isquêmico para uma variedade de funções, notavelmente resposta de estresse, apoptose e transdução de sinal.

[00325] Dentre os genes de resposta de estresse regulados positivamente foram 7 proteínas de choque térmico *HSPA1B* (Hsp70), *HSP40*, *HSPB1*, *HSPA4L* e *DNAJA4* (do tipo Hsp40) (**Tabela 1**). Inúmeros estudos identificaram proteínas de choque térmico como altamente reguladas positivamente em isquemia (Schmidt-Kastner *et al.*, **2002**. *Brain Res Mol Brain Res.* **108(1-2)**:81-93; Büttner *et al.*, **2009**. *Brain Res.* **1252**:1-14; Kawahara *et al.*, **2004**. *J Cereb Blood Flow Metab.* **24(2)**:212-23; Tang *et al.*, **2002**. *Eur J Neurosci.* **15(12)**:1937-52). O ortólogo humano desse gene é caracterizado como um gene induzido por estresse que estabiliza proteínas contra agregação, e é envolvido em via de ubiquitina-proteasoma (NCBI, Concessão: NM_005346.5). Hsp70 é a proteína de choque térmico regulada positivamente mais comumente relatada em acidente vascular cerebral isquêmico (Cox-Limpens *et al.*, **2014**. *Brain Res.* **1564**:85-100). Em *Macaca mulatta*, a Família de Proteína de Choque Térmico A (Hsp70) Membro 1B (*HSPA1B*) é o gene mais regulado positivamente em tecido isquêmico cerebral. Estudos de Knockout de *HSPA1B* em camundongos mostraram que células cardíacas que carecem desse gene são

mais susceptíveis a danos por isquemia (Kim *et al.*, **2006**. *Circulation*. **113(22)**:2589-97). Estudos de isquemia cerebral mostraram que camundongos com knockout de hsp70 experimentaram um maior volume de infarto do que camundongos do tipo selvagem (Lee *et al.*, **2004**. *Stroke*. **35(9)**:2195-9), e camundongos que superexpressam Hsp70 exibiram um tamanho de infarto diminuído e função neurológica aprimorada (Zheng *et al.*, **2008**. *J Cereb Blood Flow Metab*. **28(1)**:53-63). O alto nível de expressão diferencial de *HSPA1B* em macaco do gênero *Macaca* indica que o mesmo também pode desempenhar uma função neuroprotetora em cérebros de primata que sofrem isquemia. É também interessante observar que um do gene mais expressado diferencialmente dentre esses microarranjos é *DNAJB1*, um homólogo de proteína de choque térmico.

[00326] *NPAS4* é outro gene de resposta de estresse expressado de forma altamente diferencial que é também conhecido por ser um neuroprotetor (Choy *et al.*, **2015**. *Int J Mol Sci*. **16(12)**:29011-28). Esse fator de transcrição é expresso nos neurônios do cérebro, e desempenha uma função em resposta precoce em neurônios excitatórios e inibitórios. Sua expressão é induzida por uma variedade de situações que colocam células neuronais sob estresse. No estudo, *NPAS4* teve um fold change de $\log_2$ de 3,57 em S1 e 2,65 em S2 (**Tabela 1**). O gene *C-FOS*, que é controlado por *NPAS4* (Ramamoorthi *et al.*, **2011**. *Science*. **334(6063)**:1669-75), é também expressado

de forma altamente diferencial no estudo com um fold change de $\log_2$ de 2,53 em S1 e 3.77 em S2. *C-FOS* é comumente constatado como regulado positivamente na presença de isquemia cerebral (Cox-Limpens *et al.*, **2014**. *Brain Res.* **1564**:85-100).

[00327] O Fator de Transcrição Ativador de gene 3 (*ATF3*) é o próximo gene mais expressado diferencialmente. *ATF3* codifica um membro da família de ligação de elemento responsivo de cAMP (CREB) de fatores de transcrição. Isso é envolvido em resposta de estresse celular. *ATF3* sofreu um fold change de $\log_2$ de 2,99 em S1 e 3,38 em S2 (**Tabela 1**). Adicionalmente, esse gene é um membro altamente conectado dentro dos melhores conjuntos de genes de GSEA (**dados não mostrados**). Experimentos anteriores em camundongos constataram que knockouts de *ATF3* têm um maior volume de infarto e função neurológica piorada após isquemia cerebral (Wang *et al.*, **2012**. *Neuroscience*. **220**:100-8).

[00328] Outros genes de resposta de estresse importantes que foram regulados positivamente em tecido isquêmico cerebral são dois genes induzíveis a danos, *GADD45G* e *GADD45B* (Retenção de Crescimento e induzível a danos de DNA 45). Genes de *GADD45* foram implicados em reparo de DNA. *GADD45G* sofreu um fold change de expressão de $\log_2$ de 2,25 em S1 e 2,04 em S2, para *GADD45B*, o mesmo foi 1,08 e 2,17, respectivamente. Assim como as proteínas de choque térmico,

a família de Gadd45 de genes foi relatada como regulada positivamente por um número de estudos de roedores que examinam isquemia cerebral (Schmidt-Kastner et al., 2002. *Brain Res Mol Brain Res.* **108(1-2)**:81-93; 7-9, 20). Uma análise anterior de cérebro de rato durante isquemia revelou que a expressão desses genes é induzida por isquemia global transiente (Chen et al., 1998. *J Cereb Blood Flow Metab.* **18(6)**:646-57). Esses pesquisadores concluíram que isso poderia indicar uma função neuroprotetora para esses genes. Os resultados mostram que essa expressão aumentada durante isquemia também existe em primatas, implicando adicionalmente sua função em resposta celular isquêmica.

[00329] O gene apoptótico *BAG3* foi também significativamente regulado positivamente em tecido isquêmico cerebral, com um fold change de $\log_2$ de 1,7 em S1 e 2,97 em S2. Um estudo de expressão de isquemia cerebral em ratos também relatou esse gene como altamente regulado positivamente (Schmidt-Kastner et al., 2002. *Brain Res Mol Brain Res.* **108(1-2)**:81-93). A dissolução de proteínas de citoesqueleto é conhecida por ocorrer após isquemia (Lipton, 1999. *Physiol Rev.* **79(4)**:1431-568) e, de modo interessante, foi observado que a proteína associada a citoesqueleto regulada a atividade de gene (*ARC*) é regulada positivamente no tecido isquêmico cerebral (fold change de $\log_2$ de 1,84 em S1 e 1,9 em S2). A regulação positiva de *ARC* foi observada

em estudos anteriores de isquemia cerebral em rato (Büttner *et al.*, **2009**. *Brain Res.* **1252**:1-14).

[00330] Outra classe de genes que foram implicados em isquemia cerebral é fosfatases de especificidade dupla (Dusp) (Wang *et al.*, **2011**. *Brain Res.* **1372**:13-21). Esses produtos de proteínas têm capacidade de inativar proteínas de MAPK. Dois genes Dusp foram altamente regulados positivamente no estudo, *DUSP1* (fold change de $\log_2$ de 1,43 em S1 e 1,43 em S2) e *DUSP5* (fold change de $\log_2$ de 1,05 em S1 e 1,67 em S2). De modo interessante, Dusp5 foi sugerido como um alvo de p53 (Ueda *et al.*, **2003**. *Oncogene*. **22 (36)**:5586-91).

Mudanças de expressão de gene no sangue

[00331] Os padrões de expressão observados no sangue foram similares aos do cérebro, no entanto, houve algumas limitações nesse estudo relacionado à transcriptômica sanguínea. Devido ao número relativamente pequeno de amostras (1 amostra por ponto de tempo para cada macaco), a análise de curso de tempo não foi viável. Em vez de uma análise de curso de tempo, amostras coletadas antes da oclusão foram comparadas a cada amostra de pós-occlusão de maneira pareada. De modo a realizar análise de conjunto de genes, os resultados de expressão diferencial da comparação que rendeu a maior mudança de expressão foram usados com GSEA. Os conjuntos de genes implicados por essa análise

mostrou uma forte correlação com padrões de expressão no cérebro.

[00332] Os níveis de expressão de agrupamento hierárquico de sangue revelaram que amostras de pré- e pós-oclusão se agrupam independentemente (**dados não mostrados**). Embora a separação não seja tão absoluta quanto é para as amostras cerebrais, há ainda uma clara diferença de expressão de gene entre pré- e pós-oclusão. Esses resultados sugerem que experimentos adicionais poderiam revelar um painel de biomarcadores de sangue que pode ser usada para o diagnóstico de acidente vascular cerebral. Devido ao pequeno número de amostras e indivíduos nesse estudo, seria difícil especificar um subconjunto de genes que pode ser usado para diagnóstico, no entanto, o padrão de expressão distinta sugere que, com um tamanho de amostra maior, isso seria possível.

[00333] A análise de genes expressados diferencialmente no sangue de macacos do gênero *Macaca* que sofrem isquemia cerebral revelou que, como o cérebro, a maioria das transcrições no sangue é regulada positivamente. Quando amostras são reunidas entre macacos, e todas as amostras pós-oclusão são reunidas, 651 genes têm um alto nível de expressão diferencial (fold change maior do que 2), dos quais 513 são regulados positivamente.

[00334] Notáveis dentre esses genes expressados

diferencialmente são quatro genes S100: *S100A8*, *S100A12*, *S100P* e *S100A9*. S100 são proteínas de ligação com cálcio de células gliais. O mais expressado de forma altamente diferencial desse grupo é *S100A8* (fold change de $\log_2$ de 3,29, $p = 0,027$; **dados não mostrados**), que é fortemente associado a funções pró-inflamatórias (Sedaghat & Notopoulos, 2008. *Hippokratia*. **12(4)**:198-204).

Conjuntos de genes implicados em isquemia cerebral

Cérebro

[00335] A análise de enriquecimento de conjunto de genes de dados de expressão cerebral revelou vários conjuntos de genes envolvidos em reparo de DNA e apoptose que são regulados positivamente nas amostras de cérebro isquêmico. Os 5 melhores conjuntos de genes enriquecidos foram sinalização de TNFA por meio de NFkB, apoptose, via de p53, hipóxia, e resposta positiva de UV. Algumas dessas vias foram descritas como relacionadas à isquemia cerebral em estudos anteriores.

[00336] O conjunto de genes no cérebro mais enriquecido é sinalização de fator alfa de necrose de tumor (TNFA) por meio de NF- κ B. A citocina de TNFA ativa NFkB, que é envolvida em resposta inflamatória. Vários estudos anteriores têm regulação positiva relatada de citocinas pró-inflamatórias (Schmidt-Kastner *et al.*, 2002. *Brain Res Mol Brain Res*. **108(1-2)**:81-93; Lu *et al.*, 2004. *J Neurosci Res*.

77(6):843-57; Broughton et al., 2009. *Stroke*. 40(5):e331-9).

[00337] Além disso, foram regulados positivamente os conjuntos de genes envolvidos em apoptose e a via de p53. Essas vias são ativadas no evento de danos de DNA ou estresse de célula, e estudos anteriores notaram regulação positiva de vários fatores pró-apoptóticos (Büttner et al., 2009. *Brain Res.* **1252**:1-14).

[00338] Adicionalmente, foi mostrado que as vias de NFkB e p53 contribuem para a neuroproteção (Zhang et al., 2005. *J Cereb Blood Flow Metab.* **25(1)**:30-40; Chen et al., 2011. *Antioxid Redox Signal.* **14(8)**:1505-17).

[00339] É interessante notar que o gene IL-6 é um membro altamente conectado das vias de sinalização de TNFA, apoptose e hipóxia (**dados não mostrados**). Esse gene tem um aumento de aumento de vezes de $\log_2$ em expressão de 1,08 e 1,53 em amostras cerebrais de S1 e S2, respectivamente. A interação de *HMOX1-CDKN1A* é também comum através de vários conjuntos de genes (apoptose, p53 e hipóxia), e a regulação positiva de *HMOX1* é também significativa.

Sangue

[00340] A análise de enriquecimento de conjunto de genes dos resultados de expressão diferencial do sangue revelou vias envolvidas em sinalização, hipóxia e resposta inflamatória. As 5 melhores amostras isquêmicas sanguíneas enriquecidas com conjuntos de genes foram sinalização de

TNFA por meio de NFkB, hipóxia, sinalização de hedgehog, resposta inflamatória e angiogênese.

[00341] De modo interessante, dois dos conjuntos de genes mais enriquecidos no cérebro são também enriquecidos no sangue: Sinalização de TNFA por meio de NFkB e resposta de hipóxia. Ambas essas vias se adaptam satisfatoriamente ao modelo de resposta de isquemia. 37 dos 108 genes na sinalização de TNFA por meio de conjunto de genes de NFkB têm enriquecimento de núcleo no sangue ($NES = 1,92$), e 42 de 118 genes no conjunto de genes de resposta de hipóxia têm enriquecimento de núcleo ($NES = 1,91$). O conjunto de genes sinalização de TNFA por meio de NFkB aparece ser a via mais envolvida em isquemia, com mais de 50% do conjunto tendo enriquecimento de núcleo no cérebro e mais de 30% no sangue.

Expressão comum entre cérebro e sangue

[00342] De modo a comparar expressão diferencial de cérebro e sangue, todos os genes foram ordenados por fold change e cada possível sobreposição hipergeométrica foi testada, o que revelou que houve uma sobreposição significativa tanto de genes regulados positivamente quanto de genes regulados negativamente nas listas de genes. A análise da sobreposição hipergeométrica mais significativa de genes regulados positivamente e genes regulados negativamente revelou que as interseções contêm 493 e 2156 genes, respectivamente (**Figura 2**).

[00343] Uma análise adicional mais rígida de dados de expressão de sangue foi também realizada em que amostras de pré- e pós oclusão em cada macaco foram comparadas separadamente, e somente o ponto de tempo resultante no maior fold change foi mantido. Esses resultados foram mesclados com os dados de expressão cerebral e genes foram filtrados para alta expressão diferencial tanto no cérebro (fold change ≥ 2) quanto no sangue (fold change $\geq 1,5$). 9 genes foram identificados como expressados de forma altamente diferencial tanto no cérebro quanto no sangue (**Tabela 1**). Todos os 9 desses genes aparecem na sobreposição hipergeométrica mais significativa descrita acima.

[00344] Esses 9 melhores genes são *HSPA1B*, *PTGS2*, *BAG3*, *ADM*, *TM4SF1*, *DUSP1*, *HMOX1*, do tipo *LDLR* e *GOS2*. *HSPA1B*, *BAG3*, e *DUSP1* foram discutidos em seções anteriores. A maioria desses genes tem um aumento acentuado de expressão, que é nivelada ao longo do tempo (**Figuras 3 e 4**).

[00345] Prostaglandina-Endoperóxido Sintase 2 (*PTGS2/COX2*) é uma enzima que desempenha uma função em biossíntese de prostaglandina. Esse gene é conhecido por se tornar regulado positivamente durante inflamação, e é um alvo de aspirina. A aspirina suprime a produção de prostaglandinas e algumas dosagens reduzem o risco de acidente vascular cerebral (Tohgi et al., 1992. *Stroke*. **23(10)**:1400-3; Eikelboom et al., 2002. *Circulation*.

105 (14) :1650-5) .

[00346] Níveis de expressão de gene de adrenomedulina (ADM) no sangue foram mostrados como associados à severidade de acidente vascular cerebral isquêmico (Liu *et al.*, **2014**. *Int J Neurosci*. **124 (4)**:271-80). Liu *et al.* sugere que níveis de expressão de ADM em leucócitos de sangue periférico poderiam indicar a severidade de dano de tecido. Essa hipótese é também implicada nos resultados visto que o macaco S1 tem um maior volume de infarto, conforme mostrado pelo MRI (**dados não mostrados**), e o mesmo também tem um nível maior de expressão de ADM no sangue do que S2. Embora esse padrão de expressão seja invertido no cérebro.

[00347] Hemeoxigenase 1 (*HMOX1*) é um membro da família de choque térmico de proteínas que foram discutidas anteriormente. Acredita-se que o mesmo seja parte do sistema de defesa celular para danos mediados por estresse oxidativo, como acidente vascular cerebral (Chen & Maines, **2000**. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. **46(3)**:609-17). Adicionalmente, estudos anteriores constataram *HMOX1* como regulado positivamente no cérebro após isquemia cerebral (Zhao *et al.*, **2017**. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. **26(7)**:1622-1634).

Conclusões

[00348] Os dados mostraram que há uma assinatura comum entre o cérebro isquêmico e o sangue, e suportam o desenvolvimento de transcriptômica sanguínea como uma

ferramenta para perfilação de expressão de transcriptoma de biópsia, para caracterizar pacientes com acidente vascular cerebral isquêmico e/ou para desenvolver um biomarcador acompanhante para a avaliação de fármacos de neuroproteção em pacientes com acidente vascular cerebral isquêmico.

[00349] Embora seja conhecido que RNAs não codificadores extracelulares de plasma (ex-RNAs) são uma classe de moléculas de RNA circulatórias que modulam diretamente as redes de expressão de gene em tecidos alvo (Mick *et al.*, **2017. *Stroke*. 48(4):828-834**), foi muito inesperado identificar perfil comum de sequência de codificação de RNA no cérebro e sangue. Esse padrão de expressão de genes relacionados à isquemia que são observados no sangue de pacientes com isquemia cerebral foi notado antes no estudo por Moore *et al.* (**2005. *Circulation*. 111(2):212-21**). Os mesmos constataram genes relacionados a hipóxia em PBMC mesmo que o PBMC por si só não tenha sido hipóxico, embora o cérebro tenha sido. Os resultados mais a conclusão de Moore *et al.* de que sangue poderia ser usado como uma ferramenta diagnóstica para confirmar acidente vascular cerebral isquêmico.

Exemplo 2: Protocolo de estudo clínico

[00350] Foi usado um modelo primata não humano (Gauberti *et al.*, **2012. *Cerebrovasc Dis*. 33(4):329-39**), com injeção de trombina humana na artéria de MCA. O estudo

revelou que amostras isquêmicas e não isquêmicas podem ser distinguidas com base em seus perfis de expressão 6 horas após isquemia. Genes regulados positivamente identificados pertencem às vias envolvidas em morte celular e reparo de danos de DNA. A comparação de genes expressados diferencialmente no cérebro e o sangue revelou uma sobreposição significativa de padrões de expressão de gene.

[00351] Em conjunto, esses resultados indicaram o potencial para identificar acidente vascular cerebral isquêmico através do perfil transcriptômico no cérebro e o sangue.

[00352] Nove genes mais significativamente sobreprojetantes regulados positivamente em cérebro e sangue foram identificados e são usados também em um estudo humano.

[00353] Propôs-se traduzir os dados gerados de macacos a humanos. Genes regulados positivamente identificados tanto em cérebro isquêmico quanto em sangue periférico no modelo de primata de acidente vascular cerebral isquêmico são estudados em amostras de 20 pacientes isquêmicos, 20 pacientes hemorrágicos e controles combinados. Voltando-se então para as proteínas correspondentes de modo a poder desenvolver potencialmente um rápido teste de detecção conforme já realizado em outras doenças cardiovasculares.

Estudo de controle de caso piloto

[00354] Estudo de controle de caso com casos que são primeiro sempre acidente vascular cerebral isquêmico pareado para idade, sexo e risco cardiovascular medido por uma pontuação (Pontuação de Coração Europeia) antes do acidente vascular cerebral de índice em pacientes.

[00355] Casos isquêmicos são recrutados do registro de acidente vascular cerebral de Brest. O registro inclui 900 pacientes por ano. O grupo de controle é recrutado de um centro (hospital da Universidade de Brest).

Objetivo primário:

[00356] Para determinar um teste de biomarcador de sangue de RNA com base em genes identificados cuja expressão é significativamente aumentada.

Projeto do estudo:

[00357] Estudo de controle de caso com caso que é primeiro sempre acidente vascular cerebral isquêmico pareado para idade, sexo e risco cardiovascular medido por uma pontuação (Pontuação de Coração Europeia) antes do acidente vascular cerebral de índice em pacientes.

Desfecho Primário:

[00358] A expressão (medida em $\log_2$) de cada um dos genes identificaram 6 horas após o início de isquemia.

Análise estatística Primária:

[00359] A expressão de cada gene candidato é comparada em caso e controles com um teste de estudante para dados

pareados.

Análise estatística secundária:

[00360] A expressão de cada gene é comparada para casos entre a fase aguda de acidente vascular cerebral isquêmico e 3 meses após.

Estimativa de tamanho de amostra para o estudo total:

[00361] A diferença entre caso e controles é conjunto em 1,5 vez para casos comparados a controles (Fold Change $FC = 1,5$ e $\log_2 FC = 0,585$), para um desvio padrão de intensidade de expressão de $\log_2$ inferior a 1 (dados pessoais).

[00362] Com essas hipóteses (diferença = 0,585 e desvio padrão = 1), uma potência de 90% e uma correção de Bonferroni para a multiplicidade de testes, a estimativa do número de indivíduos necessários é 110 casos e 110 controles. Esse cálculo não leva em consideração o efeito do possível aumento de potência fornecida para pareamento, visto que o nível de correlação da resposta é desconhecido.

Critérios de Inclusão

Para pacientes:

[00363] Idade > 18 anos de idade; início de acidente vascular cerebral isquêmico carótido inferior a 6 horas; capacidade de ter a amostra sanguínea T_1 antes de 6 horas; elegibilidade a trombólise ou trombectometria.

[00364] Pontuação de NIHSS inicial > 0; pacientes com

CT ou imageamento de MRI compatível com um acidente vascular cerebral isquêmico; pacientes com imageamento multimodal que permite analisar penumbra tanto através de MRI como através de perfusão de CT e imageamento de vasos supra-aórticos e vasos intracerebrais (círculo de Willis).

[00365] Critérios de exclusão incluem pacientes com hemorragia intracerebral.

Para controles:

[00366] Idade > 18 anos de idade; questionário padronizado livre de acidente vascular cerebral; indivíduos com alto risco cardiovascular sem doença cardiovascular e nenhum acidente vascular cerebral.

Forma de relatório de caso (CRF):

[00367] Para cada paciente e controle, características demográficas e clínicas, fatores de risco cardiovascular e tratamento atual são registrados com uso da forma de relatório padronizado do registro de registro de acidente vascular cerebral.

Imageamento cerebral:

[00368] Na fase aguda, MRI de perfusão ou CT e angio-MR ou angio-varredura

Acompanhamento clínico e de imageamento:

[00369] Para pacientes, pontuações de classificação em 3 meses $\pm$ 15 dias e MRI cerebral em 3 meses $\pm$ 15 dias.

Número de amostras por pacientes:

[00370] 42 ml de sangue são extraídos de 6 tempos diferentes: < 6 horas, 12 horas $\pm$ 2, 24 horas $\pm$ 4, 48 horas $\pm$ 4, 7 dias $\pm$ 2 dias, e em 3 meses $\pm$ 15 dias após o início de acidente vascular cerebral.

Número de amostras por controle:

[00371] 42 ml de sangue são extraídos uma vez para cada controle.

Número de pacientes e controles:

[00372] 20 pacientes para casos isquêmicos; 20 controles combinados com casos isquêmicos para idade, sexo e Pontuação de Coração Europeia.

Pacientes hemorrágicos

[00373] Os casos hemorrágicos são recrutados a partir do registo de acidente vascular cerebral de Brest como um grupo diferente com o mesmo número de amostras por paciente como no grupo isquêmico.

Critérios de Inclusão

Para pacientes:

[00374] Idade > 18 anos de idade; hemorragia intracerebral com início inferior a 6 horas; capacidade de ter a amostra sanguínea T₁ antes de 6 horas.

[00375] A pontuação de NIHSS inicial > 0; pacientes com CT ou imageamento de MRI compatível com um acidente vascular cerebral hemorrágico.

[00376] Os critérios de exclusão incluem pacientes

com hemorragia intracerebral traumática e pacientes com acidente vascular cerebral isquêmico.

Número de pacientes

[00377] 20 pacientes para casos hemorrágicos.

Aspectos éticos:

[00378] O projeto é conduzido de acordo com a Declaração de princípios de Helsinki e Boas Práticas Clínicas (GCP - ICH E6). O mesmo é apresentado para aprovação a um Comitê Ético de Pesquisa Humana de acordo com a Regulamentação Francesa para teste Clínico. O consentimento informado em Parecer é coletado de cada participante.

Armazenamento de Dados e Bioarmazenamento:

[00379] A inserção de dados é realizada por Gerenciador de em um banco de dados gerenciado pelo software Clinsight (sistema de Captura). O banco biológico é armazenado na central do Hospital da Universidade de Brest para recursos biológicos (CRB - Central de Biologia de Recursos) certificado NFS 96-900.

Recrutamento de pacientes e controles

Centrais de Recrutamento:

[00380] Pacientes e fenótipo de controle assim como coleta de sangue são implementados por meio da CHRU de Brest.

Caracterização de Imageamento e pós-processamento

Centralizado de dados

[00381] O objetivo do imageamento funcional inicial

(perfusão de CT ou MRI) é mapear o núcleo do infarto e sua penumbra, e seguir a evolução de ambas as zonas em 3 meses em MRI. O imageamento inicial leva em consideração a permeabilidade de caso. Um software permite uma análise de perfusão padronizada para varredura de MRI e CT. Outro software permite a estimativa do volume final em MRI e a comparação com a penumbra avaliada no primeiro imageamento.

Plataformas de Imageamento:

[00382] Uma varredura de CT de múltiplos detectores com 64 fileiras (ou mais) ou um MRI 1.5 Tesla ou 3,0 dispositivos de MRI de Tesla é usado com mídia de contraste para imageamento inicial.

Métodos de aquisição de dados:

Qualquer um dentre:

[00383] cabeça de não contraste de CT; CT perfusão cerebral; cabeça ou pescoço de Angiografia de Tomografia Computadorizada (CTA); ou

[00384] MR cerebral que inclui Imageamento Ponderado por Difusão (DWI), Recuperação de Inversão Atenuada de fluido (FLAIR), e Eco Reconvocado Gradiente (GRE), Angiografia de Ressonância Magnética (MRA) da cabeça com uso de Tempo de Voo, perfusão cerebral de MR com uso de Contraste de Susceptibilidade Dinâmica (DSC), MRA de Gadolínio do arco aórtico e artérias cervicais.

[00385] No grupo de CT, o núcleo isquêmico é avaliado

tanto por fluxo de sangue cerebral relativo ou volume de sangue cerebral (CBV). No grupo de MR de pacientes, o núcleo isquêmico (tecido considerado lesionado de modo irreversível) é avaliado com base em um limiar de coeficiente de difusão aparente (ADC).

[00386] O tecido criticamente hipoperfusado é avaliado para grupo de MR e CT com base no tempo para sinal máximo de um limiar de curva de intensidade de sinal deconvoluido ($T_{\max}$) de > 6 segundos. O volume de lesão de DWI ou Pontuação de CT Precoce de Programa de Acidente Vascular Cerebral de Alberta de CT (ASPECTS) é registrado para MRI ou CT, respectivamente. A localização da oclusão (artéria carótida interna (ICA), M1, M2, basilar, ou sem oclusão) é registrada.

[00387] Em 3 meses, cérebro MR que inclui DWI, 3D T2-FLAIR e Eco Gradiente T1 3D, T2(GRE), MRA da cabeça com uso de TOF.

Processamento pós-imageamento

[00388] Dados de DICOM brutos de imageamento de perfusão (CT e MRI) são pós-processados com uso de software analisador de incompatibilidade de perfusão. O volume de infarto final é medido no FLAIR T2 de acordo com métodos de segmentação. Engenheiros do Laboratório de Processamento de Informações Médicas (LaTIM - INSERM UMR 1101 Brest) participam do estudo.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de diagnóstico de um acidente vascular cerebral em um indivíduo, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

i) determinar uma assinatura em uma amostra obtida do indivíduo medindo os níveis de expressão de pelo menos dois biomarcadores selecionados do grupo que consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*;

de preferência com a condição de que os pelo menos dois biomarcadores não consistam em *DUSP1* e *ADM*;

ii) comparar a assinatura determinada na etapa i) com uma assinatura de referência; e

iii) diagnosticar o indivíduo como sendo afetado por um acidente vascular cerebral quando os níveis de expressão de pelo menos dois biomarcadores na assinatura são mais elevados do que os níveis de expressão dos mesmos pelo menos dois biomarcadores na assinatura de referência.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a etapa i) compreende medir os níveis de expressão de pelo menos três biomarcadores selecionados do grupo que consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que a etapa i) compreende medir os níveis de expressão de *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*,

BAG3, TM4SF1, DUSP1 e ADM.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que a assinatura de referência é obtida medindo os níveis de expressão dos biomarcadores em uma população de referência de indivíduos substancialmente saudáveis.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de que distingue um acidente vascular cerebral de um acidente vascular cerebral simulado.

6. Método para determinar se um indivíduo que sofre de um acidente vascular cerebral alcançará uma resposta com uma terapia, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

i) determinar uma assinatura em uma amostra obtida do indivíduo medindo os níveis de expressão de pelo menos dois biomarcadores selecionados do grupo que consiste em *PTGS2, HMOX1, LDLR, HSPA1B, GOS2, BAG3, TM4SF1, DUSP1 e ADM*;

ii) comparar a assinatura determinada na etapa i) com uma assinatura de referência; e

iii) concluir que o indivíduo atinge uma resposta quando os níveis de expressão de pelo menos dois biomarcadores na assinatura são inferiores aos níveis de expressão dos pelo menos dois biomarcadores na assinatura de referência.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que a etapa i) compreende medir

os níveis de expressão de *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*.

8. Método, de acordo com a reivindicação 6 ou 7, **caracterizado** pelo fato de que a assinatura de referência é obtida medindo os níveis de expressão dos biomarcadores em uma amostra obtida do mesmo indivíduo antes do início da referida terapia.

9. Método para determinar se um indivíduo está em risco de ter um acidente vascular cerebral, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

i) determinar uma assinatura em uma amostra obtida do indivíduo medindo os níveis de expressão de pelo menos dois biomarcadores selecionados do grupo que consiste em *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*;

de preferência com a condição de que os pelo menos dois biomarcadores não consistam em *DUSP1* e *ADM*;

ii) comparar a assinatura determinada na etapa i) com uma assinatura de referência; e

iii) concluir que o indivíduo está em risco de ter acidente vascular cerebral quando os níveis de expressão de pelo menos dois biomarcadores na assinatura são maiores que os níveis de expressão dos mesmos pelo menos dois biomarcadores na assinatura de referência.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de que a etapa i) compreende medir

os níveis de expressão de nove biomarcadores selecionados de *PTGS2*, *HMOX1*, *LDLR*, *HSPA1B*, *GOS2*, *BAG3*, *TM4SF1*, *DUSP1* e *ADM*.

11. Método, de acordo com a reivindicação 9 ou 10, **caracterizado** pelo fato de que a assinatura de referência é obtida medindo os níveis de expressão dos biomarcadores em uma população de referência de indivíduos substancialmente saudáveis.

12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 11, **caracterizado** pelo fato de que o indivíduo sofreu um acidente vascular cerebral e o método é para determinar se o indivíduo está em risco de ter um acidente vascular cerebral recorrente.

13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado** pelo fato de que o acidente vascular cerebral é acidente vascular cerebral isquêmico, ataque isquêmico transitório ou um acidente vascular cerebral hemorrágico.

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado** pelo fato de que a amostra é uma amostra de sangue, amostra de plasma ou amostra de soro.

15. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado** pelo fato de que a amostra não é uma amostra de cérebro.

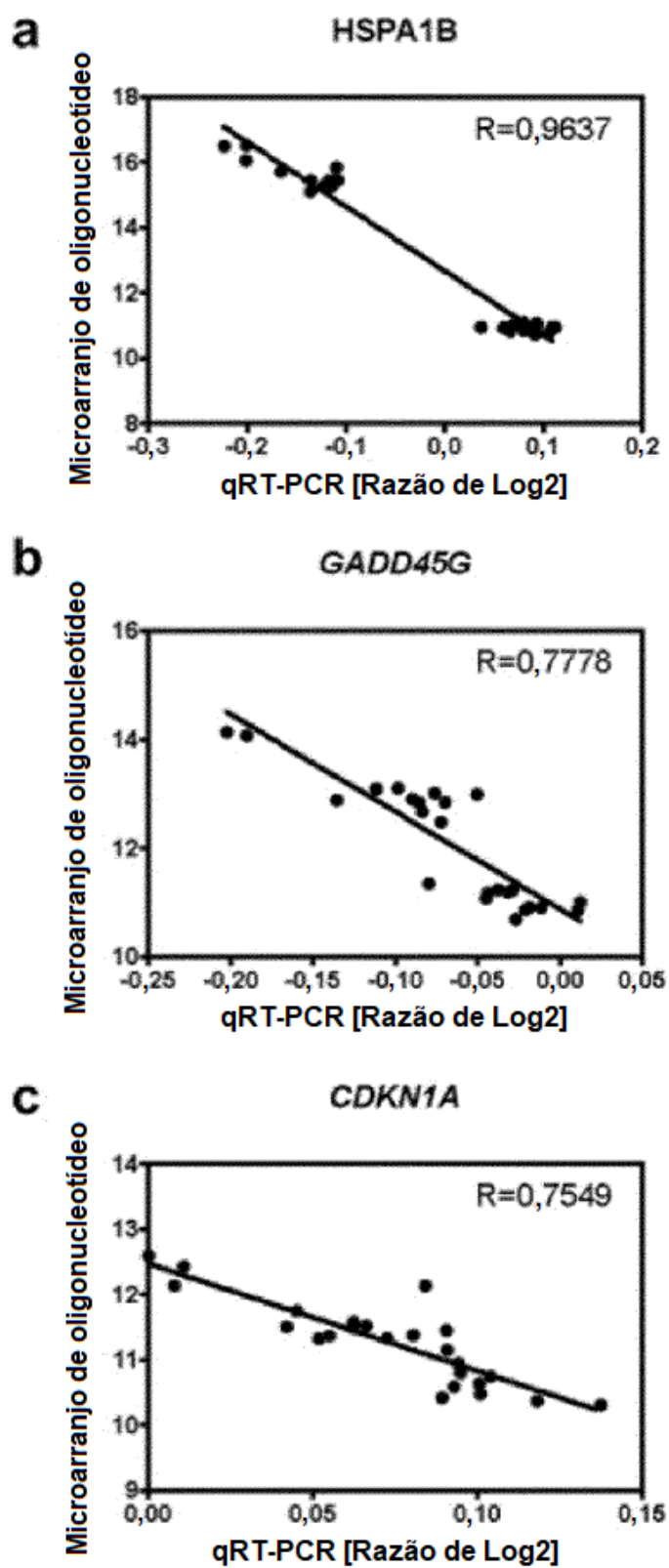
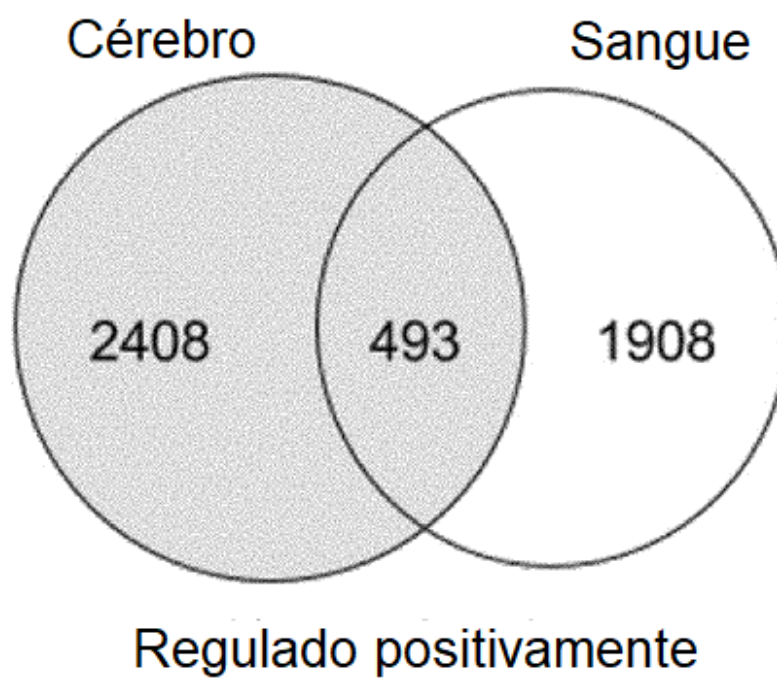
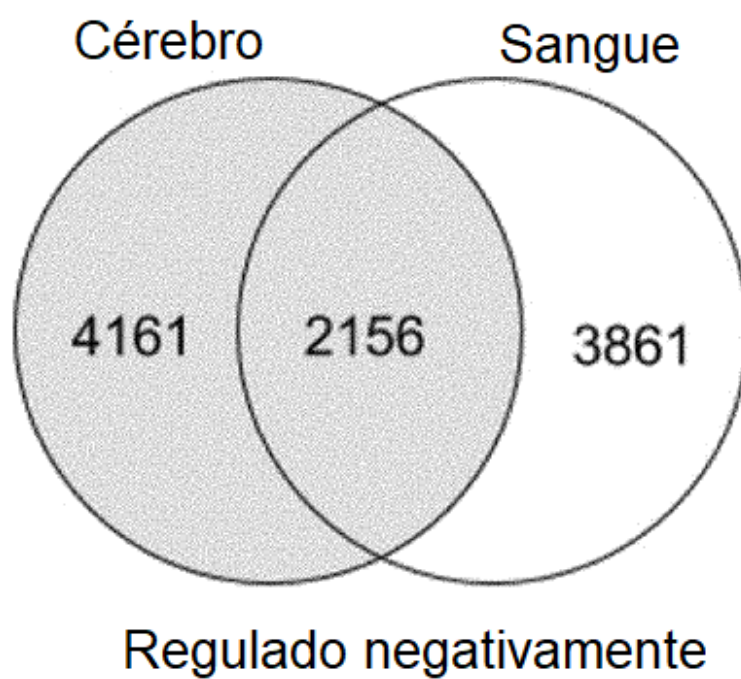


FIG. 1

**FIG. 2**

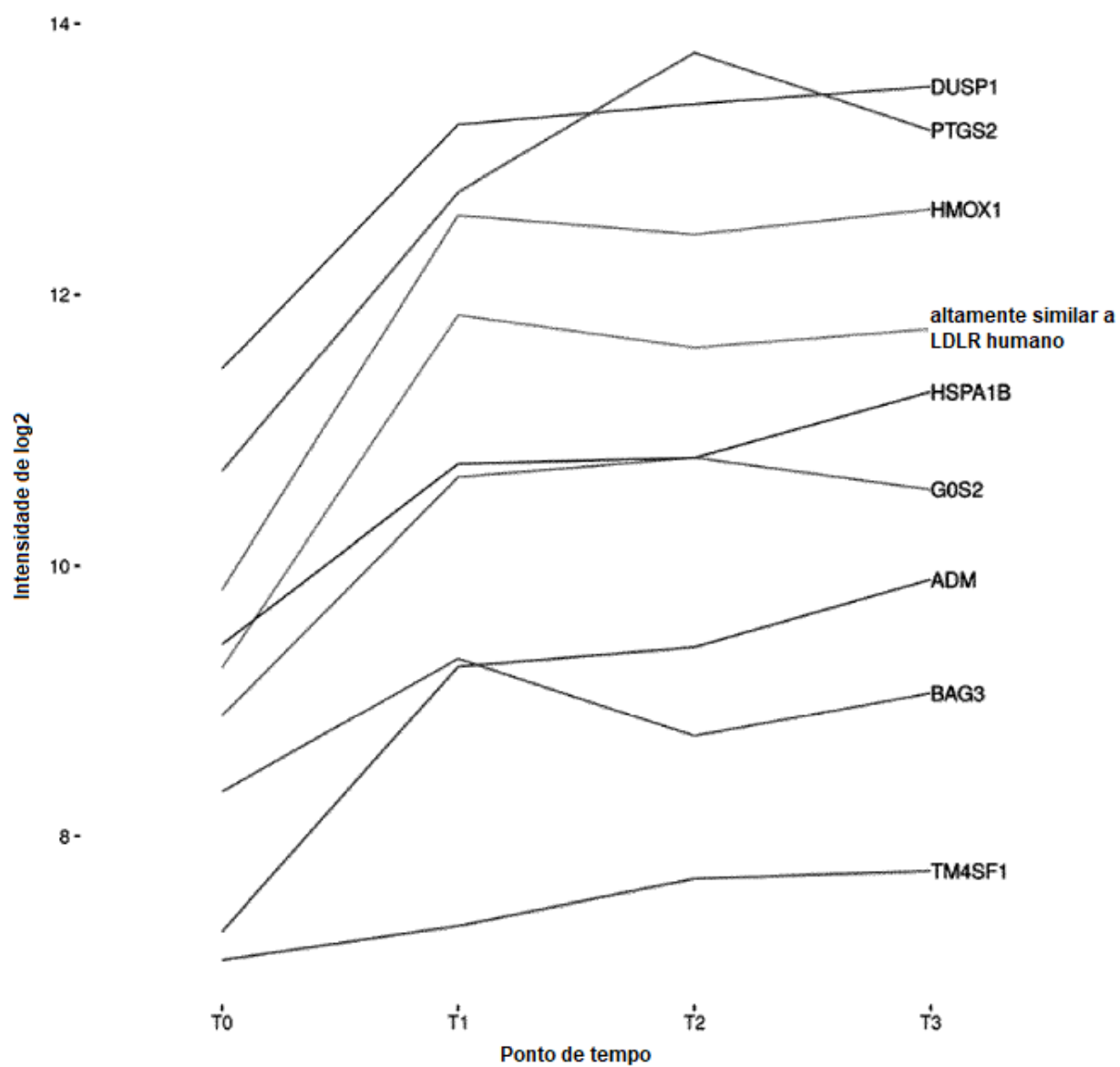


FIG. 3

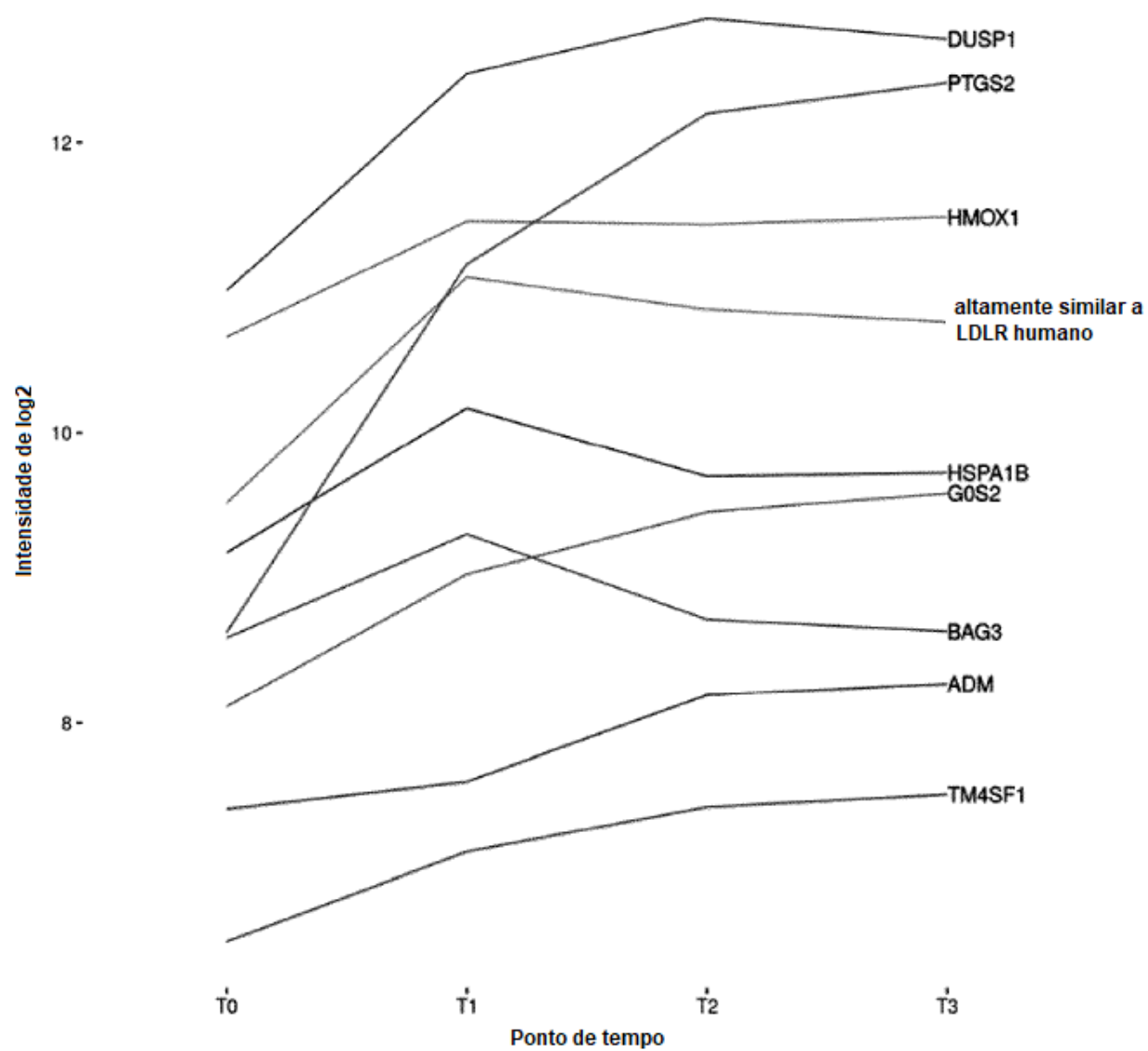


FIG. 4

Resumo da Patente de Invenção para: **"BIOMARCADORES DE ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL NO SANGUE"**

Acidente vascular cerebral é um distúrbio devastador que contribui significativamente para os custos de morte, invalidez e saúde. O desafio atual é prevenir a morte celular tardia, com terapia concomitante para ampliar a janela terapêutica. Um método de diagnóstico potencial para acidente vascular cerebral é o uso de RNA no sangue como um biomarcador, que é um campo emergente na medicina. Nesse documento, foi explorada a expressão de genes após o início da isquemia cerebral no cérebro e no sangue. O estudo de dados de expressão de microarranjo de macacos do gênero *Macaca* do cérebro e do sangue revelou que as amostras isquêmicas e não isquêmicas podem ser distinguidas com base em seus perfis de expressão, e a maioria dos genes expressados de forma altamente diferencial é regulada positivamente no cenário isquêmico 6 horas após a isquemia. Uma comparação de genes expressados diferencialmente no cérebro e no sangue revelou uma sobreposição significativa dos padrões de expressão gênica. Os dados mostraram que existe uma assinatura comum entre o cérebro isquêmico e o sangue e apoiam o desenvolvimento da transcriptômica do sangue como uma ferramenta para a perfilação de expressão do transcriptoma de biópsia para caracterizar pacientes com acidente vascular cerebral isquêmico para desenvolver um

biomarcador companheiro para a avaliação de fármacos de neuroproteção em pacientes.