



FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DO PORTO

## MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

2011/2012

Vera Dulce Rosa Neves  
Angiogénese: alvo terapêutico no  
carcinoma colorrectal

março, 2012

# FMUP



FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DO PORTO

Vera Dulce Rosa Neves

Angiogénese: alvo terapêutico no  
carcinoma colorrectal

**Mestrado Integrado em Medicina**

**Área: Cirurgia Geral**

**Trabalho efetuado sob a Orientação de:  
Mestre Laura Elisabete Ribeiro Barbosa**

**Trabalho organizado de acordo com as normas da revista:  
Arquivos de Medicina**

março, 2012

**FMUP**

Eu, Vera Dulce Rosa Neves, abaixo assinado, nº mecanográfico 060801153, estudante do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina, na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, declaro ter atuado com absoluta integridade na elaboração deste projeto de opção.

Neste sentido, confirmo que **NÃO** incorri em plágio (ato pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria de um determinado trabalho intelectual, ou partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores, foram referenciadas, ou redigidas com novas palavras, tendo colocado, neste caso, a citação da fonte bibliográfica.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 19/03/2012

Assinatura: Vera Dulce Rosa Neves

**Nome:** Vera Dulce Rosa Neves

**Endereço electrónico:** veraneves16@gmail.com **Telefone ou Telemóvel:** 919374283

**Número do Bilhete de Identidade:** 13329644

**Título da Monografia:**

Angiogénese: alvo terapeutico no carcinoma colorrectal

**Orientador:**

Mestre Laura Elisabete Ribeiro Barbosa

**Ano de conclusão:** 2012

**Designação da área do projecto:**

Cirurgia Geral

É autorizada a reprodução integral desta Dissertação/Monografia (cortar o que não interessar) para efeitos de investigação e de divulgação pedagógica, em programas e projectos coordenados pela FMUP.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 19/08/2012

Assinatura: Vera Dulce Rosa Neves

**ANGIOGÉNESE: ALVO TERAPÊUTICO NO CARCINOMA COLORRETAL**

**ANGIOGENESIS: THERAPEUTIC TARGET IN COLORECTAL CARCINOMA**

ANGIOGÉNESE E CARCINOMA COLORRETAL

ANGIOGENESIS AND COLORECTAL CARCINOMA

Artigo de revisão

Vera Dulce Rosa Neves

Aluna do 6º ano de Mestrado Integrado em Medicina da Faculdade de Medicina da  
Universidade do Porto

**Contacto:**

Serviço de Cirurgia Geral - Hospital de São João

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Alameda Prof. Hernâni Monteiro

4200 – 319 Porto

Portugal

Email: veraneves16@gmail.com

Tel: 919374283

**Agradecimentos**

Agradeço especialmente à Mestre Laura Elisabete Ribeiro Barbosa pela sua simpatia e dedicação e pelo seu contributo através revisão crítica do conteúdo do trabalho.

**Número de palavras:**

Resumo - 241

Abstract - 217

Texto principal – 4779

## Resumo

O sistema do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é um regulador crítico da angiogénese conhecido por promover o crescimento e invasão tumoral no carcinoma colorretal (CCR). Por estas razões, o VEGF emergiu como o principal alvo das abordagens antiangiogénicas da oncologia. As terapêuticas alvo anti-VEGF foram inicialmente desenvolvidas com o conceito de que iriam inibir o crescimento de novos vasos sanguíneos e, assim, privar os tumores do oxigénio e nutrientes essenciais. Contudo tornou-se cada vez mais evidente que o benefício terapêutico associado a este tratamento é complexo e provavelmente envolve vários mecanismos.

O bevacizumab é atualmente o único inibidor do VEGF com provas claras de eficácia no CCR, mas a sua utilização ideal nos vários estadios da doença ainda se encontra sob investigação. Apesar do bevacizumab ter demonstrado melhorar a sobrevida livre de progressão e a sobrevida global no carcinoma colorretal metastático, não parece oferecer benefícios a longo prazo no tratamento adjuvante ou nas terapêuticas-alvo combinadas. A sua utilização ideal e sequenciamento com as outras modalidades terapêuticas, como a cirurgia, precisam de ser aperfeiçoadas.

Outras terapêuticas biológicas continuam a ser desenvolvidas e discutidas, mas ainda não existe um consenso de qual será o melhor alvo tumoral, nem de quais as moléculas antitumorais a usar no tratamento do CCR metastático. Além disso, o desenvolvimento de biomarcadores é essencial para ajudar na seleção dos pacientes que mais provavelmente responderão à terapia antiangiogénica, e assim racionalizar os tratamentos e melhorar os resultados.

**Palavras-chave:** angiogénese, VEGF, alvo terapêutico, terapia antiangiogénica, bevacizumab, carcinoma colorretal.

## **Abstract**

The vascular endothelial growth factor system (VEGF) is a critical regulator of angiogenesis known to promote tumor growth and invasion in colorectal cancer (CRC). Indeed VEGF has emerged as the main target for antiangiogenic approaches in oncology. Initially VEGF-targeted therapies were developed with the objective to inhibit new blood vessel growth and thus starve tumors of necessary oxygen and nutrients. However It has become increasingly apparent that the therapeutic benefit associated with this therapy is complex, and probably involves multiple mechanisms.

Currently bevacizumab is the only VEGF inhibitor with clear proof of efficacy in CRC but the optimal use in various stages of the disease is still under investigation. Despite bevacizumab have shown to improve outcomes in terms of progression-free and overall survival in metastatic CRC, it does not appear to provide long-term benefit in the adjuvant setting or in combined targeted therapy. Their optimal application and sequencing with other treatment modalities such as surgery need to be refined.

Others biotherapies continue to be developed and discussed, but these don't present a consensus of how to best target the tumor nor which anti-tumoral molecules to use in the treatment of metastatic CRC. Furthermore, the development of biomarker is essential to aid selection of patients that probably respond to antiangiogenic therapy rationalizing the medical treatments and improving outcomes.

**Key-words:** angiogenesis, VEGF, therapeutic target, antiangiogenic therapy, bevacizumab, colorectal carcinoma.

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
INTRODUÇÃO.....	6
BIOLOGIA DA ANGIOGÉNESE.....	7
MECANISMOS DE AÇÃO DA TERAPÊUTICA ANTI-VEGF.....	10
DADOS CLÍNICOS SOBRE A INIBIÇÃO DA ANGIOGÉNESE NO CCR.....	14
Bevacizumab no tratamento de 1ª linha do CCRm.....	14
Bevacizumab no tratamento de 2ª linha do CCRm.....	15
Bevacizumab como tratamento adjuvante.....	15
Bevacizumab no tratamento para além da progressão tumoral.....	16
Conversão para a ressecabilidade.....	17
Bioterápia combinada.....	18
Efeitos laterais do bevacizumab.....	18
Outros inibidores da angiogénese em estudo para tratamento do CCR.....	19
Biomarcadores da angiogénese e seus inibidores.....	22
CONCLUSÃO.....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
APÊNDICE.....	30
ANEXO.....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS

5-FU – 5-fluorouracilo

BRITE – Bevacizumab Regimens: Investigation of Treatment Effects and safety

CCR – carcinoma colorretal

CCRm – carcinoma colorretal metastático

DCE-MRI – ressonância magnética dinâmica contrastada

DCs – células dendríticas

EGFR – recetor do fator de crescimento epidérmico (epidermal growth factor receptor)

EPCs – células progenitoras endoteliais

FDA – *Food and Drug Administration*

FOLFIRI – irinotecano, 5-FU infusional, leucovorina

FOLFOX – 5-FU infusional, LV, oxaliplatina

HPCs – células progenitoras hematopoiéticas

IFL – irinotecano, 5-FU em bólus, leucovorina

LV – leucovorina (ácido folínico)

NSABP – National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project

OS – sobrevida global (overall survival)

PFS – sobrevida livre de progressão (progression free survival)

PIGF – fator de crescimento placentário (placenta growth factor)

QT – quimioterapia

RTK – recetor tirosina-cínase

TKI – Inibidores tirosina-cínase

VEGF – fator de crescimento do endotélio vascular

XELOX – capecitabina, oxaliplatina

## INTRODUÇÃO

O carcinoma colorretal (CCR) é a segunda maior causa de morte por cancro em ambos os sexos, e a taxa de mortalidade específica por doença é de aproximadamente 33% no mundo ocidental. Em todo o mundo, mais de um milhão de pessoas vai desenvolver carcinoma colorretal anualmente(1-3).

Ao longo dos últimos anos a mortalidade tem diminuído progressivamente provavelmente em consequência de um diagnóstico mais precoce, da utilização do rastreio, da melhoria nos procedimentos cirúrgicos, e por abordagens quimioradioterapêuticas mais eficazes. No entanto e apesar destes avanços a taxa de sobrevida aos 5 anos ainda é inferior a 60% na maioria dos países europeus(4). Esta sobrevida é ainda inferior no grupo de doentes com CCR metastático (CCRm), para o qual a cirurgia não oferece a possibilidade de cura. A quimioterapia paliativa pode melhorar a sobrevida, diminuir os sintomas, melhorar a qualidade de vida dos doentes com CCRm(3).

A angiogénese apresenta um papel crucial na sobrevivência, invasão local, e metastização das células tumorais, e por isso tem-se tornado um importante alvo na terapêutica do cancro(5). As células tumorais que se dividem rapidamente fazem aumentar o seu suprimento sanguíneo, desencadeando uma sobre-regulação de mediadores proangiogénicos, o que promove a formação de novos vasos sanguíneos necessários para sustentar o crescimento tumoral. Entre esses mediadores, o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) parece ser o regulador chave deste processo e por essa razão tem emergido como o principal alvo para abordagens terapêuticas antiangiogénicas na oncologia(5, 6).

## BIOLOGIA DA ANGIOGÉNESE

O processo de angiogénese tumoral foi inicialmente definido como crescimento de vénulas pós-capilares através de vasos pré-existentes. No entanto a definição atual de angiogénese tumoral secundária ao VEGF envolve uma complexa série de eventos incluindo a angiogénese clássica, perda de pericitos, aumento da permeabilidade, vasodilatação e incorporação de células progenitoras endoteliais derivadas da medula óssea(6).

O VEGF é um regulador chave da angiogénese fisiológica que ocorre durante a embriogénese, o crescimento e as funções reprodutoras. No entanto o VEGF tem também sido implicado na angiogénese patológica associada a neoplasias(7). De acordo com a hipótese de Folkman, os tumores estabelecem uma rede vascular própria através da angiogénese, uma vez que atingem um tamanho crítico ( $\sim 2\text{mm}^3$ ) de forma a providenciar oxigénio e nutrientes suficientes para a sua sobrevivência(6).

A família de fatores de crescimento angiogénicos e linfangiogénicos relacionados com o VEGF engloba seis glicoproteínas designadas por VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e fator de crescimento placentário (PIGF) -1 e -2(7-9).

O VEGF-A é comumente referido como VEGF, e é uma glicoproteína com um diverso leque de funções angiogénicas. Este é o mais bem caracterizado membro da família-VEGF e é expresso como diversas isoformas resultantes de *splicing* alternativo, que leva a proteínas maduras de 121, 165, 189 e 206 aminoácidos. A VEGF<sub>165</sub> é a isoforma predominante e é frequentemente sobre-expressa numa série de neoplasias sólidas humanas(6). Estudos *in vivo* demonstraram que a sua expressão está temporoespacialmente associada a eventos chave na vasculogénese fisiológica e angiogénese. VEGF-A é imprescindível para o desenvolvimento fetal e é também importante para uma variedade de processos angiogénicos pós-natais incluindo a cicatrização, menstruação, manutenção da pressão arterial e gravidez. O VEGF-A está também ligado a diversas condições patológicas

associadas com aumento da angiogénese, incluindo a artrite, psoríase, degeneração macular e a retinopatia diabética(8).

A ausência de VEGF-B e PIGF em ratos não provoca alterações na vasculogénese embrionária, ou alterações no desenvolvimento, sugerindo que o papel destas duas glicoproteínas pode ser redundante. No entanto a perda de PIGF compromete a angiogénese, o extravasamento do plasma, o crescimento colateral durante a isquemia, inflamação e crescimento tumoral, sugerindo que o PIGF poderá estar relacionado com estados patológicos no adulto(8).

O VEGF-C e VEGF-D desempenham papéis importantes durante a linfangiogénese embrionária e pós-natal(8).

Os efeitos biológicos do VEGF são mediados por três recetores tirosina-cínase, VEGFR1 (também designado FLT1), VEGFR2 (FLK/KDR) e VEGFR3 (FLT4)(7). Os ligandos VEGF têm diferentes especificidades de ligação para cada um destes recetores, o que contribui para a sua diversidade de função(6).

A expressão de VEGFR2 é restrita aos vasos sanguíneos e é o mediador chave da angiogénese induzida pelo VEGF. O VEGFR1 é expresso nos vasos sanguíneos mas também numa diversidade de outros tipos celulares. O seu papel exato no endotélio vascular continua por ser elucidado. O VEGFR1 tem dez vezes mais afinidade para o VEGF, mas exerce menos ativação intracelular do que o VEGFR2. Assim o VEGFR1 pode resultar como um regulador negativo da angiogénese, dado que ao se ligar ao VEGF deixa menos ligando disponível para ativar o VEGFR2. O VEGFR3 liga preferencialmente o VEGF-C e VEGF-D, e tem um papel importante no desenvolvimento das redes vasculares durante a embriogénese e na linfangiogénese pos-natais(6, 9).

As neurofilinas (NP1 e NP2) atuam como coreceptores dos VEGFRs, aumentando a afinidade de ligação do VEGF para os VEGFRs(6).

O VEGF promove a angiogénese tumoral e por isso o fluxo sanguíneo através de diversos mecanismos incluindo melhoria da proliferação e sobrevivência das células endoteliais, aumento da migração e invasão das células endoteliais, aumento da

permeabilidade vascular formando uma rede laxa para a migração das células endoteliais, e melhoria da quimiotaxia e alojamento das células precursoras vasculares derivadas da medula óssea. Além disso, o VEGF tem também importantes funções independentes do processo vascular, incluindo efeitos autócrinos nas funções das células tumorais (sobrevivência, migração e invasão), supressão imunológica e alojamento de progenitores da medula óssea para preparar o órgão para as metástases subsequentes(6).

## MECANISMOS DE AÇÃO DA TERAPÊUTICA ANTI-VEGF

O reconhecimento do VEGF como um regulador chave da angiogénese tem levado ao desenvolvimento de diversos agentes anti-VEGF. No entanto e apesar de estudos extensos com a terapêutica direcionada ao VEGF, os mecanismos responsáveis pela atividade antitumoral destes agentes ainda não estão completamente estabelecidos. Dados recentes sugerem que múltiplos mecanismos contribuem para a eficácia das terapêuticas anti-VEGF, o que originalmente se pensava ser o resultado da sua capacidade para inibir o crescimento de novos vasos(6).

O estudo das terapêuticas anti-VEGF e seus mecanismos de ação nos modelos pré-clínicos levou a bem sucedidas interpretações na clinica. No entanto os modelos pré-clínicos têm limitações, o que limita a interpretação dos mecanismos associados á inibição do VEGF. Exemplo disso é o facto dos modelos pré-clínicos de crescimento tumoral serem muito rápidos e suportados por estruturas vasculares que crescem rapidamente. Por esta razão a vascularização dos modelos murinos têm tendência a ser mais plástica e responsiva à terapêutica anti-VEGF. É necessário haver estudos clínicos randomizados e cuidadosamente controlados para poder validar clinicamente as hipóteses relacionadas com a terapêutica anti-VEGF(6).

Relativamente á inibição do crescimento de novos vasos, embora a densidade de microvasos se tenha revelado um fiável marcador de prognóstico, o número de vasos não se relacionou com a eficácia da terapêutica anti-VEGF. Alterações na função da vascularização são provavelmente muito mais importantes como parâmetro de atividade antiangiogénica do que a simples presença dos vasos, e são melhor estudadas com técnicas de imagem não-invasivas(6).

Um outro mecanismo de ação da terapêutica anti-VEGF parece ser a indução da apoptose das células endoteliais. O VEGF medeia numerosas vias indutoras da sobrevivência das células endoteliais, nomeadamente a ativação do BCL2, Akt e proteínas inibidoras da apoptose. Por este motivo tem sido proposto que a inibição do VEGF leve a

apoptose das células endoteliais. Estudos usando terapêuticas anti-VEGF em modelos murinos demonstraram que a inibição da sinalização pelo VEGF não apenas inibiu a angiogênese mas também levou à morte das células endoteliais tumorais(6, 10).

As células endoteliais tumorais em divisão tornam-se sensíveis à quimioterapia convencional citotóxica, tal como as outras células em divisão. Kerbel explorou a utilização de quimioterapia contínua, em baixa dose (quimioterapia metronômica), administrada em combinação com terapêutica anti-VEGF. O princípio desta abordagem reside na hipótese de que a quimioterapia ataca as células endoteliais em divisão, enquanto a terapêutica anti-VEGF diminui o sinal de sobrevivência das células endoteliais, tornando-as mais suscetíveis à apoptose induzida pela quimioterapia. A eficácia da quimioterapia metronômica parece aumentar quando administrada em combinação com drogas antiangiogênicas específicas(6, 11).

O VEGF tem também a capacidade de estimular a vasculogênese nos tumores através da recruta de células progenitoras hematopoiéticas (HPCs) e células progenitoras endoteliais (EPCs) derivadas da medula óssea(9, 12, 13). Os tumores libertam VEGF que tem um efeito quimiotático para as células progenitoras endoteliais e hematopoiéticas derivadas da medula óssea. As células VEGFR1 + têm a capacidade de migrar para os locais de metástases à distância, de forma a preparar o órgão para o crescimento da metástase. Além disso as células progenitoras VEGFR2 + têm a capacidade de se incorporar na cama vascular em crescimento e contribuir para a angiogênese tumoral. Assim o bloqueio da sinalização pelo VEGF pode prevenir que estas células progenitoras contribuam para a angiogênese tumoral e metastização(13, 14).

O VEGF desempenha ainda efeitos sobre a função vascular. Leva ao aumento da expressão de óxido nítrico (NO), prostaciclina, e outros mediadores que promovem a vasodilatação. Nos estudos clínicos observou-se uma diminuição precoce (dentro das primeiras 48h) da perfusão tumoral nos estudos radiográficos após administração de terapêutica anti-VEGF, possivelmente devido à diminuição da produção destes vasodilatadores. Esta vasoconstrição pode hipoteticamente levar a isquemia e necrose

tumoral. Isto é de particular relevância em tumores como o CCR, pela sua intensa vascularização. Esta vasoconstrição não é limitada á vascularização tumoral, sendo por isso a hipertensão um dos principais efeitos secundários desta terapêutica(6).

Na maioria dos tumores a vascularização é caracterizada por um fluxo sanguíneo relativamente ineficiente que difere das redes vasculares normais. Nos tumores há aumento da permeabilidade, dilatação vascular, tortuosidade, alteração da cobertura pelos pericitos, e membrana basal irregular, alterações estas que são mediadas essencialmente pelo VEGF. A opinião generalizada é de que as terapêuticas antiangiogénicas destroem a vascularização tumoral privando assim o tumor de receber oxigénio e nutrientes. No entanto há dados que sugerem uma hipótese alternativa, a de que certos agentes antiangiogénicos podem também transitoriamente normalizar a anormal estrutura e função dos vasos sanguíneos, permitindo uma distribuição mais eficiente do oxigénio e fármacos. Assim estes fármacos antiangiogénicos que induzem a normalização vascular podem atenuar a hipoxia e aumentar a eficácia da quimioterapia convencional(9, 15). Dickson estudou esta hipótese no neuroblastoma, observando que o bloqueio do VEGF mediado pelo bevacizumab levou a alterações na fisiologia vascular tumoral (diminuição da densidade de microvasos, diminuição da permeabilidade vascular, e melhoria da perfusão intratumoral), o que permitiu uma melhoria na distribuição e eficácia da quimioterapia(16). Em contraste com esta teoria Kasman e seus associados reportaram que o anticorpo anti-VEGF não aumenta a distribuição da quimioterapia em excertos de tumores humanos em modelos murinos, em vez disso leva a um aumento do dano vascular quando combinado com a quimioterapia(6). Estes achados estão de acordo com os mecanismos antiangiogénicos propostos da quimioterapia metronómica, sugerindo que a terapêutica anti-VEGF pode sensibilizar o compartimento vascular tumoral para os agentes citotóxicos(11).

Foi também detetada a expressão de VEGFRs nas células tumorais, o que leva a pensar que a terapêutica anti-VEGF poderá ter efeitos diretos sobre as células tumorais para além de efeitos sobre a vascularização. No entanto tem sido difícil obter evidência clinica que suporte esta hipótese. O VEGF medeia numerosas funções das células tumorais,

incluindo sobrevivência celular, migração e invasão. Estudos *in vitro* usando células de CCR humano que expressam VEGFR1 mostraram que a utilização de anticorpo monoclonal para o VEGFR1 bloqueou a migração das células tumorais, a invasão e a formação de colônias(17). Este e outros estudos sugerem que a terapêutica alvo anti-VEGF pode ter um papel direto na inibição do crescimento tumoral.

Evidência acumulada tem também sugerido que o VEGF tem um importante papel em estabelecer privilégio imunológico de tumores através do bloqueio da diferenciação das células dendríticas (DCs). As células dendríticas são células que apresentam antígenos e tem um papel crucial na iniciação de respostas imunes contra patógenos estranhos bem como na apresentação dos antígenos tumorais às várias populações imunes efetoras. Fatores libertados do microambiente tumoral, incluindo o VEGF, estimulam a recruta de DCs imaturas da medula óssea e tecidos periféricos para os locais de crescimento tumoral. No microambiente tumoral as células tumorais apoptóticas libertam estímulos que levam à diferenciação das DCs imaturas em DCs maduras. Essas DCs maduras migram para os nódulos linfáticos periféricos onde apresentam os antígenos às células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. O VEGF libertado pelas células tumorais inibe esta maturação das DCs imaturas, resultando numa ineficiente apresentação dos antígenos tumorais ao sistema imunitário do hospedeiro, o que se traduz em tolerância e privilégio imunológico do tumor no hospedeiro(6). Estes achados pré-clínicos sugerem que o bloqueio da sinalização pelo VEGF pode melhorar a resposta antitumoral em pacientes através da melhoria na função das DCs e reconhecimento das células tumorais(6).

## **DADOS CLÍNICOS SOBRE A INIBIÇÃO DA ANGIOGÉNESE NO CCR**

O Bevacizumab é um anticorpo monoclonal murino humanizado (93%humano e 7%murino), direcionado contra o VEGF ao qual se liga neutralizando-o funcionalmente.É atualmente o único anticorpo antiangiogenico aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA). Inicialmente aprovado para utilização no CCR metastático, as suas indicações tem expandido para o cancro do pulmão, cancro da mama, cancro renal e glioblastoma multiforme. A sua eficácia no CCR tem sido demonstrada em combinação com quimioterapia citotóxica em diversos estudos clínicos(5, 9, 18).

### **Bevacizumab no tratamento de 1ª linha do CCRm**

A aprovação do bevacizumab pela FDA para utilização com qualquer esquema quimioterápico contendo fluorouracilo intravenoso como tratamento de 1ª linha no CCR metastático, foi baseada nos resultados do estudo piloto de fase III (Hurwitz et al)(19), que randomizou doentes para receber irinotecano , fluorouracilo (5-FU) em bólus e leucovorina (LV) (protocolo IFL), juntamente com bevacizumab ou placebo. Foi obtido um impressionante aumento de 4,7 meses (15,6 vs 20,3 meses) na sobrevida global média (OS) no grupo de doentes que recebeu bevacizumab. Também a taxa de resposta e a sobrevida média livre de progressão (PFS) foram significativamente maiores quando o bevacizumab foi administrado (ver tabela I).

Os resultados deste estudo permitiram completar um outro estudo (Kabbinar) que avaliou a associação de 5-fluorouracilo em bólus com leucovorina e bevacizumab, tendo-se obtido um aumento estatisticamente significativo na PFS dos doentes que receberam bevacizumab, embora sem aumento significativo na OS (ver tabela I)(20).

Estes resultados permitiram estabelecer um novo tratamento de primeira linha para o CCRm e solicitaram a alteração de diversos estudos clínicos de forma a incluir o bevacizumab. Um desses estudos foi o NO16966, de fase III, que demonstrou mais

evidência do benefício do bevacizumab quando adicionado à quimioterapia convencional no CCRm. Este estudo randomizou 1400 pacientes e avaliou a adição de bevacizumab ao esquema terapêutico FOLFOX4 (5-FU/LV/oxaliplatina) ou XELOX (capecitabina/oxaliplatina), com o objectivo de demonstrar a superioridade do bevacizumab quando adicionado a ambos os regimes terapêuticos com oxaliplatina. Verificou-se um aumento estatisticamente significativo na PFS (8 vs 9,4 meses) nos grupos que receberam bevacizumab (ver tabela I)(21).

### **Bevacizumab no tratamento de 2ª linha do CCRm**

Num estudo de fase III de larga escala (E3200) foi avaliado o uso de bevacizumab como tratamento de 2ª linha para o CCRm. Foram randomizados 829 pacientes que eram considerados refratários ao irinotecano, para receber FOLFOX4, FOLFOX4 com bevacizumab (10mg/kg), ou bevacizumab (10mg/kg) apenas(22). A associação de FOLFOX4 com bevacizumab foi superior em todos os parâmetros de eficácia comparativamente ao FOLFOX4 isolado. A OS obtida foi de 12,9 meses nos pacientes que receberam FOLFOX4 e bevacizumab, contra 10,8 meses nos pacientes que receberam apenas FOLFOX4 (ver tabela I).

O estudo do grupo que recebeu apenas bevacizumab foi descontinuado devido á diminuta eficácia comparativamente com os grupos recebendo quimioterapia associada, evidenciando que pelo menos no CCRm o bevacizumab apresenta um efeito muito limitado quando usado como agente isolado(22). Com base nestes resultados o bevacizumab foi aprovado para tratamento de segunda linha no CCRm(23).

### **Bevacizumab como tratamento adjuvante**

Foi levantada a questão se o bevacizumab seria ou não eficaz a melhorar o *outcome* de pacientes com CCR de alto risco no estadio II ou III quando tratados com FOLFOX. Esta

hipótese foi avaliada no estudo NSABP C-08 que randomizou 2672 doentes para receberem FOLFOX 6 ou FOLFOX6 com bevacizumab. Contrariamente ao que se esperava, não foi atingido o objetivo de prolongar a sobrevida livre de doença (DFS) aos 3 anos. Observou-se um benefício inicial estatisticamente significativo até aos 15 meses de seguimento, que no entanto foi subsequentemente perdido antes de atingir os 3 anos(24, 25). A redução transitória de eventos enquanto os doentes recebiam bevacizumab fornece interessantes questões acerca do seu potencial mecanismo de ação na terapêutica adjuvante, e porventura na terapêutica paliativa. O benefício terapêutico foi limitado à duração da terapêutica e pouco após a sua descontinuação, o que faz parecer que o bevacizumab apenas atrasa a recorrência tumoral, em oposição à terapêutica citotóxica na qual o benefício permanece ao longo do tempo e no qual o índice de cura está aumentado(5).

Um segundo estudo (AVANT) avaliou a utilização de FOLFOX4 com bevacizumab em 3500 doentes com CCR estadio II ou III, tendo reportado também ausência de aumento da DFS no grupo que recebeu bevacizumab(26).

Com base na ausência de benefício na sobrevida livre de doença aos 3 anos, o bevacizumab não está recomendado como terapêutica adjuvante.

### **Bevacizumab no tratamento para além da progressão tumoral**

O bevacizumab é por vezes continuado após progressão da doença no CCRm, embora não existam estudos clínicos prospetivos que demonstrem benefício clínico com esta utilização.

Dados do estudo BRITe sugerem que a terapêutica anti-VEGF com bevacizumab quando continuada após a progressão tumoral pode estar associada com um significativo benefício clínico. Neste estudo de coorte observacional prospetivo, 44% dos doentes que inicialmente tinham recebido bevacizumab, continuaram esta terapêutica após progressão da doença. A OS média destes doentes foi marcadamente superior à OS dos doentes que não continuaram esta terapêutica (31,8 vs 19,9 meses)(27). O estudo BRITe demonstrou

ainda que a exposição ao bevacizumab a longo prazo foi bem tolerada, sem aumento na incidência de efeitos secundários graves relacionados com o bevacizumab(27).

No entanto como este é um estudo observacional, a informação aqui obtida apenas pode ser utilizada para formulação de hipóteses. Por esta razão estão a decorrer dois estudos de fase III para avaliar a utilização de bevacizumab após a progressão da doença (AIO0504 e S0600)(27).

Apesar destes resultados apontarem para uma vantagem na utilização do bevacizumab para além da progressão tumoral, alguns estudos sugerem que prolongar o tratamento tumoral com agentes antiangiogénicos pode alterar o comportamento biológico do tumor, nomeadamente estimulando a adaptação e progressão tumoral para estádios de maior malignidade, com aumento da capacidade de invasão e em alguns casos aumento da metastização linfática e à distância(28, 29).

### **Conversão para a ressecabilidade**

Têm sido consideradas as vantagens que a utilização de tratamentos combinados altamente ativos pode ter na taxa de ressecção tumoral, em pacientes para os quais a cirurgia não era anteriormente uma opção. A elevada taxa de resposta obtida com as combinações terapêuticas triplas, indicando a elevada taxa de doentes com uma diminuição relevante do tumor, pode permitir a ressecção secundária de metástases inicialmente irressecáveis.

Esta conversão de uma intenção inicialmente puramente paliativa para uma abordagem potencialmente curativa, representa um benefício por si, dado que a ressecção cirúrgica possibilita uma hipótese de cura. Apesar de haver alguns estudos que tenham investigado esta abordagem com a utilização de cetuximab, ainda não há estudos que nos permitam tirar conclusões fidedignas sobre este efeito com a utilização de bevacizumab. No entanto dados recentes de pacientes que realizaram ressecção de metástases hepáticas

mostraram uma significativa redução das células tumorais viáveis na metástase ressecada, após tratamento com bevacizumab(30).

### **Bioterapia combinada**

A terapêutica *dual-targeted* com inibição do VEGF e EGFR inicialmente parecia promissora, baseado nos resultados de um estudo randomizado de fase II, BOND 2, que avaliou 83 pacientes com CCR refratário ao irinotecano. Estes doentes receberam irinotecano com cetuximab e bevacizumab, ou uma combinação de cetuximab com bevacizumab apenas (ver tabela I). Comparativamente com os controlos históricos do cetuximab ou cetuximab com irinotecano, a adição de bevacizumab parecia aumentar substancialmente a atividade, sem aumento da toxicidade expectável(31).

Dois estudos subsequentes em pacientes com CCR não tratado, PACCE e CAIRO2, demonstraram, no entanto, resultados inferiores nos grupos de estudo a receber a associação dos inibidores do VEGF e do EGFR. Ambos os estudos demonstraram que a terapêutica com os dois anticorpos estava associada com uma PFS inferior, e no estudo PACCE menor OS, além de um aumento na toxicidade (ver tabela I)(32-34). Com base nestes resultados deduz-se que a terapêutica conjugada destes dois inibidores com quimioterapia não deve ser realizada, exceto em estudos clínicos.

A razão pela qual existe uma óbvia diferença na eficácia da bioterapia combinada nos pacientes previamente não tratados e nos pacientes com CCRm refratário á quimioterapia continua por elucidar.

### **Efeitos laterais do bevacizumab**

O bevacizumab é no geral bem tolerado. Estudos clínicos de fase I/II reportaram um aumento do risco de complicações nos pacientes que recebem bevacizumab, como hemorragia, trombose, perfuração intestinal, aumento da pressão arterial e proteinúria, o

que pode estar relacionado com o mecanismo de ação de bloqueio do VEGF(9). No entanto os estudos de fase III, bem como o estudo BRITE, não reportaram um aumento significativo da taxa de complicações tromboembólicas venosas após exposição ao bevacizumab. Apesar disso foi demonstrado um aumento no risco de hemorragia, perfuração intestinal, hipertensão, e eventos tromboembólicos arteriais nos pacientes que receberam bevacizumab(19, 35). O efeito lateral mais comum é a hipertensão, que ocorre em cerca de 25% dos doentes e requer tratamento médico em 10%.

Apesar do risco cardiovascular aumentado dos doentes com idade superior a 65 anos, estudos recentes não tem demonstrado um aumento da toxicidade cardiovascular ou diminuição da eficácia antitumoral nos pacientes desta faixa etária(27, 36, 37).

### **Outros inibidores da angiogénese em estudo para tratamento do CCR**

Embora o bevacizumab seja correntemente o único inibidor do VEGF com provas claras de eficácia no CCR, e aprovado pela FDA, existem muitos outros agentes anti-VEGF ou direcionados a outros sistemas proangiogénicos em desenvolvimento clínico.

- **Anti-PIGF**

O PIGF é um alvo terapêutico interessante na medida em que parece regular a angiogénese na doença, mas não em estados não patológicos. O tratamento anti-PIGF inibe o crescimento e metastização de vários tumores, incluindo aqueles resistentes aos inibidores do VEGF, e melhora a eficácia da quimioterapia e dos inibidores do VEGF. Assim estratégias anti-PIGF, nomeadamente anticorpos monoclonais neutralizantes que bloqueiem a ligação ao VEGFR1 podem ser uma abordagem terapêutica interessante para os tumores refratários á terapêutica anti-VEGF(38).

- **Pequenas moléculas antiangiogénicas**

Uma outra abordagem no bloqueio da angiogénese são pequenas moléculas que bloqueiam o local de ligação do ATP no domínio tirosina-cínase do VEGFR. Esta abordagem pode ainda ser mais eficiente dado que algumas células tumorais têm um sistema de sobrevivência através do qual o VEGF atua como um fator de sobrevivência autócrino interno, através da ligação ao VEGFR1 intracelular. A inibição do VEGF extracelular através de anticorpos não afeta este sistema intrácrino, enquanto as pequenas moléculas permeáveis na membrana celular que bloqueiam todas as tirosina-cinases VEGF interferem na ansa intrácrina(39).

- **Inibidores tirosina-cínase (TKI) seletivos para o VEGFR**

O vatalanib (PTK787/ZK) é um inibidor da angiogénese oral, direcionado ao VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 e em algum grau ao PDGFR e c-kit. Nos modelos tumorais pré-clínicos o vatalanib exibiu potentes efeitos antiangiogénicos, mas também efeitos diretos na proliferação e apoptose tumoral(9). Em estudos randomizados de fase III o vatalanib foi avaliado em combinação com o protocolo FOLFOX4 para tratamento de primeira linha no CCRm (CONFIRM-1), e em conjunto com FOLFOX em pacientes com CCRm refratários ao irinotecano (CONFIRM-2). Obtiveram-se aumentos na PFS embora não se tenha demonstrado aumento da sobrevida global (OS)(40).

O cediranib (AZD2171) é um potente inibidor das tirosina-cínases dos VEGFRs. O estudo HORIZON I foi um estudo randomizado de fase II de FOLFOX com cediranib ou bevacizumab, como tratamento de segunda linha para o CCRm. A PFS média foi semelhante no grupo que recebeu cediranib e no grupo que recebeu bevacizumab (7,2 vs 7,8 meses)(5). Este mesmo esquema terapêutico está a ser investigado num estudo de fase III como tratamento de 1ª linha para CCRm (HORIZON III). HORIZON II é um estudo randomizado de fase III de FOLFOX com cediranib ou placebo também para tratamento de 1ª linha do CCRm(41).

- **Inibidores tirosina-cínase com múltiplos alvos com atividade anti-VEGFR**

O sorafenib é um inibidor multicínase, com vários alvos, incluindo todos os VEGFRs, PDGFR, c-kit e RAF, que foi aprovado para tratamento do carcinoma hepatocelular. Dados clínicos precoces sugerem que o sorafenib pode aumentar a atividade antitumoral do bevacizumab, por inibir a expressão de VEGF via dois mecanismos diferentes(42, 43). Um estudo combinando sorafenib e bevacizumab com QT citotóxica esta atualmente em desenvolvimento(5).

O AV-951 é outro inibidor do VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3 que demonstrou atividade clinica e tolerabilidade em tumores sólidos, incluindo o CCR. Está actualmente a ser estudado em combinação com FOLFOX para o tratamento do CCR (NCT00660153)(9).

O axitinib é um TKI que está atualmente a ser avaliado em estudos clínicos, com potente atividade sobre as tirosinas cínases dos três VEGFR. Após ser avaliado num estudo de fase I (44), dois estudos de fase II para avaliar a associação de axitinib com quimioterapia com ou sem bevacizumab para tratamento de 1ª linha do CCRm, e com quimioterapia para tratamento de 2ª linha, estão atualmente a decorrer (NCT00460603; NCT00615056)(5).

O brivanib é um TKI duplo que ajuda a inibir angiogénese através da inibição da sinalização do VEGF e EGFR, e mostrou atividade clínica quando combinado com o cetuximab no CCRm. Um estudo de fase III com esta combinação em doentes com CCRm previamente tratados está a decorrer (5, 23).

- **Moléculas de fusão**

O aflibercept é uma proteína de fusão recombinante que consiste em componentes do domínio extracelular de VEGFR1 e VEGFR2 fundidos com a região Fc da imunoglobulina G1. Este liga-se ao VEGF-A e PIGF e previne a sua interação com os recetores de VEGF. Num estudo recente de fase II o aflibercept foi bem tolerado e conseguiu um controlo da doença em 30% dos doentes, com uma PFS de 4 meses quando os doentes foram previamente tratados com bevacizumab(23).

## **Biomarcadores da angiogénese e seus inibidores**

A ideia generalizada de que a produção de VEGF é relativamente baixa em adultos saudáveis levou à noção de que o aumento sistémico dos níveis de VEGF poderia refletir quantitativamente a massa tumoral e a atividade angiogénica. No entanto dados recentes têm sugerido que a produção de VEGF já é comparativamente alta mesmo em pessoas sem neoplasia. A contribuição do VEGF secretado pelo tumor apenas se torna significativa quando a carga tumoral é bastante grande. Por esta razão é plausível que o VEGF não possa ser considerado um marcador sensível da atividade angiogénica(45).

Também ao contrário do tratamento com cetuximab, a eficácia do bevacizumab no CCRm parece ser independente do estado k-ras do tumor(46).

Na ausência de biomarcadores preditivos para as estratégias angiogénicas, várias técnicas de imagem tem sido examinadas como potenciais marcadores farmacodinâmicos, incluindo a ressonância magnética dinâmica contrastada (DCE-MRI). Diversos estudos clínicos descreveram uma diminuição da perfusão tumoral em resposta ao tratamento antiangiogénico. No entanto alguns dos efeitos detetados com a DCE-MRI podem ser simplesmente devido à vasoconstrição induzida pela inibição do VEGF. Além disso a cinética da diminuição do fluxo sanguíneo tumoral é rápida, tornando improvável que se deva a destruição vascular. Assim a DCE-MRI deve ser avaliada em futuros estudos clínicos, mas ainda não está apta a ser usada na prática clínica(47).

Dado que a vasoconstrição e conseqüentemente a hipertensão é um efeito lateral decorrente da terapêutica antiangiogénica, alguns autores colocam a hipótese de se poderá ser a hipertensão um marcador de eficácia da terapêutica antiangiogénica. Alguns estudos sugerem que de facto a hipertensão arterial relacionada com o bevacizumab pode representar um fator preditivo da resposta clínica ao bevacizumab(48, 49).

Atualmente, e apesar da investigação até agora realizada, não existe nenhum biomarcador preditivo da eficácia dos inibidores da angiogénese, nomeadamente do bevacizumab.

## CONCLUSÃO

Nos últimos anos tem-se verificado uma melhoria substancial no tratamento do CCRm, o que se deve a quimioterapias mais efetivas, bem como á introdução de tratamentos-alvo no algoritmo terapêutico. Os anticorpos anti-VEGF têm demonstrado melhorar a PFS substancialmente, e aumentar a eficácia particularmente das quimioterapias menos intensas. Até ao momento entre as várias terapêuticas antiangiogénicas estudadas, apenas o bevacizumab foi validado para tratamento do CCRm.

Um elevado número de estudo pré-clínicos tem gerado diversos mecanismos hipotéticos para tentar explicar a atividade clínica observada com os agentes anti-VEGF. No entanto a confirmação desses mecanismos tem-se mostrado um desafio. Enquanto não se entenderem claramente estes mecanismos torna-se difícil identificar marcadores preditivos da atividade dos agentes anti-VEGF. E de facto, apesar de uma investigação extensiva nessa área, atualmente ainda não se conhece nenhum marcador preditivo da terapêutica anti-VEGF.

Há ainda a necessidade de desenvolver melhores agentes e melhores combinações de fármacos que aumentem a eficácia do tratamento anti-VEGF. Estudos pré-clínicos sugerem que inibir outros membros da família VEGF como o PlGF pode ser uma medida eficaz para combater as resistências aos fármacos anti-VEGF.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *Ca-A Cancer Journal for Clinicians*. 2005;55(2):74-108.
2. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010 Sep-Oct;60(5):277-300.
3. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, et al. Colorectal cancer. *Lancet*. 2010 Mar 20;375(9719):1030-47.
4. Verdecchia A, Francisci S, Brenner H, Gatta G, Micheli A, Mangone L, et al. Recent cancer survival in Europe: a 2000-02 period analysis of EURO CARE-4 data. *Lancet Oncol*. 2007 Sep;8(9):784-96.
5. Hubbard J, Grothey A. Antiangiogenesis agents in colorectal cancer. *Curr Opin Oncol*. 2010 Jul;22(4):374-80.
6. Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer*. 2008 Aug;8(8):579-91.
7. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003 Jun;9(6):669-76.
8. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol*. 2005 Feb 10;23(5):1011-27.
9. Arnold D, Seufferlein T. Targeted treatments in colorectal cancer: state of the art and future perspectives. *Gut*. 2010 Jun;59(6):838-58.
10. Bruns CJ, Liu W, Davis DW, Shaheen RM, McConkey DJ, Wilson MR, et al. Vascular endothelial growth factor is an in vivo survival factor for tumor endothelium in a murine model of colorectal carcinoma liver metastases. *Cancer*. 2000;89(3):488-99.
11. Kerbel RS, Kamen BA. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*. 2004;4(6):423-36.

12. Bertolini F, Shaked Y, Mancuso P, Kerbel RS. The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: Towards marker and target identification. *Nature Reviews Cancer*. 2006;6(11):835-45.
13. Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nature Medicine*. 2001;7(11):1194-201.
14. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*. 2005;438(7069):820-7.
15. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*. 2005 Jan 7;307(5706):58-62.
16. Dickson PV, Hamner JB, Sims TL, Fraga CH, Ng CYC, Rajasekeran S, et al. Bevacizumab-induced transient remodeling of the vasculature in neuroblastoma xenografts results in improved delivery and efficacy of systemically administered chemotherapy. *Clinical Cancer Research*. 2007;13(13):3942-50.
17. Fan F, Wey JS, McCarty MF, Belcheva A, Liu W, Bauer TW, et al. Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells. *Oncogene*. 2005;24(16):2647-53.
18. Cacheux W, Le Tourneau C, Baranger B, Mignot L, Mariani P. Targeted biotherapy in metastatic colorectal carcinoma: Current practice. *J Visc Surg*. 2011 Feb;148(1):12-8.
19. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*. 2004;350(23):2335-42.
20. Kabbinavar FF, Schulz J, McCleod M, Patel T, Hamm JT, Hecht JR, et al. Addition of bevacizumab to bolus fluorouracil and leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase II trial. *J Clin Oncol*. 2005 Jun 1;23(16):3697-705.
21. Saltz LB, Clarke S, Díaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in

metastatic colorectal cancer: A randomized phase III study. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(12):2013-9.

22. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: Results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *Journal of Clinical Oncology*. 2007;25(12):1539-44.

23. Ortega J, Vigil CE, Chodkiewicz C. Current progress in targeted therapy for colorectal cancer. *Cancer Control*. 2010 Jan;17(1):7-15.

24. Allegra CJ, Yothers G, O'Connell MJ, Sharif S, Petrelli NJ, Colangelo LH, et al. Phase III trial assessing bevacizumab in stages II and III carcinoma of the colon: results of NSABP protocol C-08. *J Clin Oncol*. 2011 Jan 1;29(1):11-6.

25. Allegra CJ, Yothers G, O'Connell MJ, Sharif S, Colangelo LH, Lopa SH, et al. Initial safety report of NSABP C-08: A randomized phase III study of modified FOLFOX6 with or without bevacizumab for the adjuvant treatment of patients with stage II or III colon cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Jul 10;27(20):3385-90.

26. Van Cutsem E, Lambrechts D, Prenen H, Jain RK, Carmeliet P. Lessons from the adjuvant bevacizumab trial on colon cancer: what next? *J Clin Oncol*. 2011 Jan 1;29(1):1-4.

27. Grothey A, Sugrue MM, Purdie DM, Dong W, Sargent D, Hedrick E, et al. Bevacizumab beyond first progression is associated with prolonged overall survival in metastatic colorectal cancer: Results from a large observational cohort study (BRiTE). *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(33):5326-34.

28. Paez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Vinals F, et al. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell*. 2009 Mar 3;15(3):220-31.

29. Ebos JM, Lee CR, Cruz-Munoz W, Bjarnason GA, Christensen JG, Kerbel RS. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell*. 2009 Mar 3;15(3):232-9.

30. Ribero D, Wang H, Donadon M, Zorzi D, Thomas MB, Eng C, et al. Bevacizumab improves pathologic response and protects against hepatic injury in patients treated with oxaliplatin-based chemotherapy for colorectal liver metastases. *Cancer*. 2007 Dec 15;110(12):2761-7.
31. Saltz LB, Lenz HJ, Kindler HL, Hochster HS, Wadler S, Hoff PM, et al. Randomized phase II trial of cetuximab, bevacizumab, and irinotecan compared with cetuximab and bevacizumab alone in irinotecan-refractory colorectal cancer: the BOND-2 study. *J Clin Oncol*. 2007 Oct 10;25(29):4557-61.
32. Hecht JR, Mitchell E, Chidiac T, Scroggin C, Hagenstad C, Spigel D, et al. A randomized phase IIIB trial of chemotherapy, bevacizumab, and panitumumab compared with chemotherapy and bevacizumab alone for metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(5):672-80.
33. Tol J, Koopman M, Cats A, Rodenburg CJ, Creemers GJ, Schrama JG, et al. Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009 Feb 5;360(6):563-72.
34. Tol J, Koopman M, Rodenburg CJ, Cats A, Creemers GJ, Schrama JG, et al. A randomised phase III study on capecitabine, oxaliplatin and bevacizumab with or without cetuximab in first-line advanced colorectal cancer, the CAIRO2 study of the Dutch Colorectal Cancer Group (DCCG). An interim analysis of toxicity. *Ann Oncol*. 2008 Apr;19(4):734-8.
35. Kozloff M, Yood MU, Berlin J, Flynn PJ, Kabbinavar FF, Purdie DM, et al. Clinical outcomes associated with bevacizumab-containing treatment of metastatic colorectal cancer: the BRiTE observational cohort study. *Oncologist*. 2009 Sep;14(9):862-70.
36. Kabbinavar FF, Hurwitz HI, Yi J, Sarkar S, Rosen O. Addition of bevacizumab to fluorouracil-based first-line treatment of metastatic colorectal cancer: pooled analysis of cohorts of older patients from two randomized clinical trials. *J Clin Oncol*. 2009 Jan 10;27(2):199-205.
37. Okines A, Puerto OD, Cunningham D, Chau I, Van Cutsem E, Saltz L, et al. Surgery with curative-intent in patients treated with first-line chemotherapy plus bevacizumab for

metastatic colorectal cancer First BEAT and the randomised phase-III NO16966 trial. *Br J Cancer*. 2009 Oct 6;101(7):1033-8.

38. Fischer C, Jonckx B, Mazzone M, Zacchigna S, Loges S, Pattarini L, et al. Anti-PIGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell*. 2007 Nov 2;131(3):463-75.

39. Lee TH, Seng S, Sekine M, Hinton C, Fu Y, Avraham HK, et al. Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1. *PLoS Med*. 2007 Jun;4(6):e186.

40. Sobrero AF, Bruzzi P. Vatalanib in advanced colorectal cancer: two studies with identical results. *J Clin Oncol*. 2011 May 20;29(15):1938-40.

41. Robertson JD, Botwood NA, Rothenberg ML, Schmoll HJ. Phase III trial of FOLFOX plus bevacizumab or cediranib (AZD2171) as first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: HORIZON III. *Clin Colorectal Cancer*. 2009 Jan;8(1):59-60.

42. Wilhelm SM, Adnane L, Newell P, Villanueva A, Llovet JM, Lynch M. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2008;7(10):3129-40.

43. Azad NS, Posadas EM, Kwitkowski VE, Steinberg SM, Jain L, Annunziata CM, et al. Combination targeted therapy with sorafenib and bevacizumab results in enhanced toxicity and antitumor activity. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(22):3709-14.

44. Sharma S, Abhyankar V, Burgess RE, Infante J, Trowbridge RC, Tarazi J, et al. A phase I study of axitinib (AG-013736) in combination with bevacizumab plus chemotherapy or chemotherapy alone in patients with metastatic colorectal cancer and other solid tumors. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2010;21(2):297-304.

45. Rudge JS, Holash J, Hylton D, Russell M, Jiang S, Leidich R, et al. VEGF Trap complex formation measures production rates of VEGF, providing a biomarker for predicting efficacious angiogenic blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Nov 20;104(47):18363-70.

46. Hurwitz HI, Yi J, Ince W, Novotny WF, Rosen O. The clinical benefit of bevacizumab in metastatic colorectal cancer is independent of K-ras mutation status: analysis of a phase III study of bevacizumab with chemotherapy in previously untreated metastatic colorectal cancer. *Oncologist*. 2009 Jan;14(1):22-8.
47. Hahn OM, Yang C, Medved M, Karczmar G, Kistner E, Karrison T, et al. Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging pharmacodynamic biomarker study of sorafenib in metastatic renal carcinoma. *J Clin Oncol*. 2008 Oct 1;26(28):4572-8.
48. De Stefano A, Carlomagno C, Pepe S, Bianco R, De Placido S. Bevacizumab-related arterial hypertension as a predictive marker in metastatic colorectal cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011 Nov;68(5):1207-13.
49. Scartozzi M, Galizia E, Chiorrini S, Giampieri R, Berardi R, Pierantoni C, et al. Arterial hypertension correlates with clinical outcome in colorectal cancer patients treated with first-line bevacizumab. *Ann Oncol*. 2009 Feb;20(2):227-30.

## APÊNDICE

Tabela I: Estudos randomizados com bevacizumab

Estudo	População estudada	Grupos tratamento	Doentes (n)	Taxa de resposta	PFS media (meses)	OS media (meses)
<b>Tratamento de 1ª linha CCRm com bevacizumab</b>						
<b>Kabbinavar (2005) (20)</b>	Não tratados	5-FU/LV vs 5-FU/LV + bevacizumab	209	24,5% vs 34,1%	5,5 vs 9,2	12,9 vs 16,6 (ns)
<b>Hurwitz et al (2004) (19)</b>	Não tratados	IFL vs IFL+bevacizumab	411 vs 402	34,8% vs 44,8% (p = 0,004)	6,2 vs 10,6 (p <0,001)	15,6 vs 20,3 (p <0,001)
<b>N016966 (2008) (21)</b>	Não tratados	XELOX /FOLFOX vs XELOX/ FOLFOX + Bevacizumab	701 vs 699	49% vs 47%	8,0 vs 9,4 (p=0,0023)	19,9 vs 21,3 (p=0,077)
<b>Tratamento de 2ª linha CCRm com bevacizumab</b>						
<b>E3200 (2007) (22)</b>	Refratários ao irinotecano	FOLFOX vs FOLFOX + Bevacizumab vs Bevacizumab	291 vs 286 vs 243	8,6% vs 22,7% vs 3,3% (p=0,001)	4,7 vs 7,3 vs 2,7 (p<0,001)	10,8 vs 12,9 vs 10,2 (p=0,001)
<b>Bioterápia combinada anti-VEGF e anti-EGFR</b>						
<b>BOND 2 (31)</b>	Refratários ao irinotecano	Cetuximab + bevacizumab vs Irinotecano + cetuximab + bevacizumab	40 vs 43	20% vs 37%	4,9 vs 7,3	11,4 vs 14,5
<b>PACCE (32)</b>	Não tratados	QT com oxaliplatina + bevacizumab vs QT com oxaliplatina + bevacizumab + panitumumab	410 vs 413	48% vs 46%	11,4 vs 10,0	24,5 vs 19,4
<b>CAIRO-2 (33)</b>	Não tratados	XELOX + bevacizumab vs XELOX + bevacizumab + cetuximab	368 vs 368	50% vs 52,7%	10,7 vs 9,4 (p=0,01)	20,3 vs 19,4

5-FU: 5-fluorouracilo; LV: leucovorina (ácido folínico); IFL: irinotecano, 5-FU em bólus, leucovorina ; FOLFIRI: irinotecano, 5-FU infusional, leucovorina; FOLFOX: 5-FU infusional, LV, oxaliplatina; XELOX: capecitabina, oxaliplatina; QT: quimioterapia

# ANEXO

## Normas de publicação da revista

### ARQUIVOS DE MEDICINA

Estas instruções seguem os "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (disponível em URL: [www.icmje.org](http://www.icmje.org)).

**Os ARQUIVOS DE MEDICINA publicam investigação original nas diferentes áreas da medicina, favorecendo investigação de qualidade, particularmente a que descreva a realidade nacional.**

Os manuscritos são avaliados inicialmente por membros do corpo editorial e a publicação daqueles que forem considerados adequados fica dependente do parecer técnico de pelo menos dois revisores externos. A revisão é feita anonimamente, podendo os revisores propor, por escrito, alterações de conteúdo ou de forma ao(s) autor(es), condicionando a publicação do artigo à sua efectivação.

Todos os artigos solicitados serão submetidos a avaliação externa e seguirão o mesmo processo editorial dos artigos de investigação original. Apesar dos editores e dos revisores desenvolverem os esforços necessários para assegurar a qualidade técnica e científica dos manuscritos publicados, a responsabilidade final do conteúdo das publicações é dos autores.

Todos os artigos publicados passam a ser propriedade dos ARQUIVOS DE MEDICINA. Uma vez aceites, os manuscritos não podem ser publicados numa forma semelhante noutros locais, em nenhuma língua, sem o consentimento dos ARQUIVOS DE MEDICINA.

Apenas serão avaliados manuscritos contendo material original que não estejam ainda publicados, na íntegra ou em parte (incluindo tabelas e figuras), e que não estejam a ser submetidos para publicação noutros locais. Esta restrição não se aplica a notas de imprensa ou a resumos publicados no âmbito de reuniões científicas. Quando existem publicações semelhantes à que é submetida ou quando existirem dúvidas relativamente ao cumprimento dos critérios acima mencionados estas devem ser anexadas ao manuscrito em submissão.

Antes de submeter um manuscrito aos ARQUIVOS DE MEDICINA os autores têm que assegurar todas as autorizações necessárias para a publicação do material submetido.

De acordo com uma avaliação efectuada sobre o material apresentado à revista os editores dos ARQUIVOS DE MEDICINA prevêm publicar aproximadamente 30% dos manuscritos submetidos, sendo que cerca de 25% serão provavelmente rejeitados pelos editores no primeiro mês após a recepção sem avaliação externa.

#### TIPOLOGIA DOS ARTIGOS PUBLICADOS NOS ARQUIVOS DE MEDICINA

##### Artigos de investigação original

Resultados de investigação original, qualitativa ou quantitativa. O texto deve ser limitado a 2000 palavras, excluindo referências e tabelas, e organizado em introdução, métodos, resultados e discussão, com um máximo de 4 tabelas e/ou figuras (total) e até 15 referências. Todos os artigos de investigação original devem apresentar resumos estruturados em português e em inglês, com um máximo de 250

palavras cada.

##### Publicações breves

Resultados preliminares ou achados novos podem ser objecto de publicações breves.

O texto deve ser limitado a 1000 palavras, excluindo referências e tabelas, e organizado em introdução, métodos, resultados e discussão, com um máximo de 2 tabelas e/ou figuras (total) e até 10 referências. As publicações breves devem apresentar resumos estruturados em português e em inglês, com um máximo de 250 palavras cada.

##### Artigos de revisão

Artigos de revisão sobre temas das diferentes áreas da medicina e dirigidos aos profissionais de saúde, particularmente com impacto na sua prática.

Os ARQUIVOS DE MEDICINA publicam essencialmente artigos de revisão solicitados pelos editores. Contudo, também serão avaliados artigos de revisão submetidos sem solicitação prévia, preferencialmente revisões quantitativas (Meta-análise).

O texto deve ser limitado a 5000 palavras, excluindo referências e tabelas, e apresentar um máximo de 5 tabelas e/ou figuras (total). As revisões quantitativas devem ser organizadas em introdução, métodos, resultados e discussão.

As revisões devem apresentar resumos não estruturados em português e em inglês, com um máximo de 250 palavras cada, devendo ser estruturados no caso das revisões quantitativas.

##### Comentários

Comentários, ensaios, análises críticas ou declarações de posição acerca de tópicos de interesse na área da saúde, designadamente políticas de saúde e educação médica.

O texto deve ser limitado a 900 palavras, excluindo referências e tabelas, e incluir no máximo uma tabela ou figura e até 5 referências. Os comentários não devem apresentar resumos.

##### Casos clínicos

Os ARQUIVOS DE MEDICINA transcrevem casos publicamente apresentados trimestralmente pelos médicos do Hospital de S. João numa selecção acordada com o corpo editorial da revista. No entanto é bem vinda a descrição de casos clínicos verdadeiramente exemplares, profundamente estudados e discutidos. O texto deve ser limitado a 1200 palavras, excluindo referências e tabelas, com um máximo de 2 tabelas e/ou figuras (total) e até 10 referências.

Os casos clínicos devem apresentar resumos não estruturados em português e em inglês, com um máximo de 120 palavras cada.

##### Séries de casos

Descrições de séries de casos, tanto numa perspectiva de tratamento estatístico como de reflexão sobre uma experiência particular de diagnóstico, tratamento ou prognóstico.

O texto deve ser limitado a 1200 palavras, excluindo referências e tabelas, organizado em introdução, métodos, resultados e discussão, com um máximo de 2 tabelas e/ou figuras (total) e até 10 referências. As séries de casos devem apresentar resumos estruturados em português

e em inglês, com um máximo de 250 palavras cada.

#### **Cartas ao editor**

Comentários sucintos a artigos publicados nos ARQUIVOS DE MEDICINA ou relatando de forma muito objectiva os resultados de observação clínica ou investigação original que não justifiquem um tratamento mais elaborado.

O texto deve ser limitado a 400 palavras, excluindo referências e tabelas, e incluir no máximo uma tabela ou figura e até 5 referências. As cartas ao editor não devem apresentar resumos.

#### **Revisões de livros ou software**

Revisões críticas de livros, software ou sítios da internet.

O texto deve ser limitado a 600 palavras, sem tabelas nem figuras, com um máximo de 3 referências, incluindo a do objecto da revisão. As revisões de livros ou software não devem apresentar resumos.

#### **FORMATAÇÃO DOS MANUSCRITOS**

A formatação dos artigos submetidos para publicação nos ARQUIVOS DE MEDICINA deve seguir os "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals".

Todo o manuscrito, incluindo referências, tabelas e legendas de figuras, deve ser redigido a dois espaços, com letra a 11 pontos, e justificado à esquerda.

Aconselha-se a utilização das letras Times, Times New Roman, Courier, Helvetica, Arial, e Symbol para caracteres especiais.

Devem ser numeradas todas as páginas, incluindo a página do título. Devem ser apresentadas margens com 2,5 cm em todo o manuscrito. Devem ser inseridas quebras de página entre cada secção.

Não devem ser inseridos cabeçalhos nem rodapés.

Deve ser evitada a utilização não técnica de termos estatísticos como aleatório, normal, significativo, correlação e amostra.

Apenas será efectuada a reprodução de citações, tabelas ou ilustrações de fontes sujeitas a direitos de autor com citação completa da fonte e com autorizações do detentor dos direitos de autor.

#### **Unidades de medida**

Devem ser utilizadas as unidades de medida do Sistema Internacional (SI), mas os editores podem solicitar a apresentação de outras unidades não pertencentes ao SI.

#### **Abreviaturas**

Devem ser evitados acrónimos e abreviaturas, especialmente no título e nos resumos. Quando for necessária a sua utilização devem ser definidos na primeira vez que são mencionados no texto e também nos resumos e em cada tabela e figura, excepto no caso das unidades de medida.

#### **Nomes de medicamentos**

Deve ser utilizada a Designação Comum Internacional (DCI) de fármacos em vez de nomes comerciais de medicamentos. Quando forem utilizadas marcas registadas na investigação, pode ser mencionado o nome do medicamento e o nome do laboratório entre parêntesis.

#### **Página do título**

Na primeira página do manuscrito deve constar:

- 1) o título (conciso e descritivo);
- 2) um título abreviado (com um máximo de 40 caracteres, incluindo espaços);

3) os nomes dos autores, incluindo o primeiro nome (não incluir graus académicos ou títulos honoríficos);

4) a filiação institucional de cada autor no momento em que o trabalho foi realizado;

5) o nome e contactos do autor que deverá receber a correspondência, incluindo endereço, telefone, fax e e-mail;

6) os agradecimentos, incluindo fontes de financiamento, bolsas de estudo e colaboradores que não cumpram critérios para autoria;

7) contagens de palavras separadamente para cada um dos resumos e para o texto principal (não incluindo referências, tabelas ou figuras).

#### **Autoria**

Como referido nos "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals", a autoria requer uma contribuição substancial para:

- 1) concepção e desenho do estudo, ou obtenção dos dados, ou análise e interpretação dos dados;
- 2) redacção do manuscrito ou revisão crítica do seu conteúdo intelectual;
- 3) aprovação final da versão submetida para publicação.

A obtenção de financiamento, a recolha de dados ou a supervisão geral do grupo de trabalho, por si só, não justificam autoria.

É necessário especificar na carta de apresentação o contributo de cada autor para o trabalho. Esta informação será publicada.

Exemplo: José Silva concebeu o estudo e supervisionou todos os aspectos da sua implementação. António Silva colaborou na concepção do estudo e efectuou a análise dos dados. Manuel Silva efectuou a recolha de dados e colaborou na sua análise. Todos os autores contribuíram para a interpretação dos resultados e revisão dos rascunhos do manuscrito. Nos manuscritos assinados por mais de 6 autores (3 autores no caso das cartas ao editor), tem que ser explicitada a razão de uma autoria tão alargada.

É necessária a aprovação de todos os autores, por escrito, de quaisquer modificações da autoria do artigo após a sua submissão.

#### **Agradecimentos**

Devem ser mencionados na secção de agradecimentos os colaboradores que contribuíram substancialmente para o trabalho mas que não cumpram os critérios para autoria, especificando o seu contributo, bem como as fontes de financiamento, incluindo bolsas de estudo.

#### **Resumos**

Os resumos de artigos de investigação original, publicações breves, revisões quantitativas e séries de casos devem ser estruturados (introdução, métodos, resultados e conclusões) e apresentar conteúdo semelhante ao do manuscrito.

Os resumos de manuscritos não estruturados (revisões não quantitativas e casos clínicos) também não devem ser estruturados.

Nos resumos não devem ser utilizadas referências e as abreviaturas devem ser limitadas ao mínimo.

#### **Palavras-chave**

Devem ser indicadas até seis palavras-chave, em português e em inglês, nas páginas dos resumos, preferencialmente em concordância com o Medical Subject Headings (MeSH) utilizado no Index Medicus. Nos manuscritos que não apresentam resumos as palavras-chave devem ser apresentadas no final do manuscrito.

#### **Introdução**

Deve mencionar os objectivos do trabalho e a justificação para a sua realização.

Nesta secção apenas devem ser efectuadas as referências indispensáveis para justificar os objectivos do estudo.

### **Métodos**

Nesta secção devem descrever-se:

- 1) a amostra em estudo;
- 2) a localização do estudo no tempo e no espaço;
- 3) os métodos de recolha de dados;
- 4) análise dos dados.

As considerações éticas devem ser efectuadas no final desta secção.

### **Análise dos dados**

Os métodos estatísticos devem ser descritos com o detalhe suficiente para que possa ser possível reproduzir os resultados apresentados.

Sempre que possível deve ser quantificada a imprecisão das estimativas apresentadas, designadamente através da apresentação de intervalos de confiança. Deve evitar-se uma utilização excessiva de testes de hipóteses, com o uso de valores de  $p$ , que não fornecem informação quantitativa importante.

Deve ser mencionado o software utilizado na análise dos dados.

### **Considerações éticas e consentimento informado**

Os autores devem assegurar que todas as investigações envolvendo seres humanos foram aprovadas por comissões de ética das instituições em que a investigação tenha sido desenvolvida, de acordo com a Declaração

de Helsínquia da Associação Médica Mundial ([www.wma.net](http://www.wma.net)).

Na secção de métodos do manuscrito deve ser mencionada esta aprovação e a obtenção de consentimento informado, quando aplicável.

### **Resultados**

Os resultados devem ser apresentados, no texto, tabelas e figuras, seguindo uma sequência lógica.

Não deve ser fornecida informação em duplicado no texto e nas tabelas ou figuras, bastando descrever as principais observações referidas nas tabelas ou figuras.

Independentemente da limitação do número de figuras propostos para cada tipo de artigo, só devem ser apresentados gráficos quando da sua utilização resultarem claros benefícios para a compreensão dos resultados.

### **Apresentação de dados numéricos**

A precisão numérica utilizada na apresentação dos resultados não deve ser superior à permitida pelos instrumentos de avaliação.

Para variáveis quantitativas as medidas apresentadas não deverão ter mais do que uma casa decimal do que os dados brutos.

As proporções devem ser apresentadas com apenas uma casa decimal e no caso de amostras pequenas não devem ser apresentadas casas decimais.

Os valores de estatísticas teste, como  $t$  ou  $\chi^2$ , e os coeficientes de correlação

devem ser apresentados com um máximo de duas casas decimais.

Os valores de  $p$  devem ser apresentados com um ou dois algarismos significativos e nunca na forma de  $p=NS$ ,  $p<0,05$  ou  $p>0,05$ , na medida em a informação contida no valor de  $P$  pode ser importante. Nos casos em que o valor de  $p$  é muito pequeno (inferior a 0,0001), pode apresentar-

-se como  $p<0,0001$ .

### **Tabelas e figuras**

As tabelas devem surgir após as referências. As figuras devem surgir após as tabelas.

Devem ser mencionadas no texto todas as tabelas e figuras, numeradas (numeração árabe separadamente para tabelas e figuras) de acordo com a ordem em que são discutidas no texto.

Cada tabela ou figura deve ser acompanhada de um título e notas explicativas (ex. definições de abreviaturas) de modo a serem compreendidas

e interpretadas sem recurso ao texto do manuscrito.

Para as notas explicativas das tabelas ou figuras devem ser utilizados os seguintes símbolos, nesta mesma sequência:

\*, †, ‡, §, ||, ¶, \*\*, ††, ‡‡.

Cada tabela ou figura deve ser apresentada em páginas separadas, juntamente com o título e as notas explicativas.

Nas tabelas devem ser utilizadas apenas linhas horizontais.

As figuras, incluindo gráficos, mapas, ilustrações, fotografias ou outros materiais devem ser criadas em computador ou produzidas profissionalmente.

As figuras devem incluir legendas.

Os símbolos, setas ou letras devem contrastar com o fundo de fotografias ou ilustrações.

A dimensão das figuras é habitualmente reduzida à largura de uma coluna, pelo que as figuras e o texto que as acompanha devem ser facilmente legíveis após redução.

Na primeira submissão do manuscrito não devem ser enviados originais de fotografias, ilustrações ou outros materiais como películas de raios-X. As figuras, criadas em computador ou convertidas em formato electrónico após digitalização devem ser inseridas no ficheiro do manuscrito.

Uma vez que a impressão final será a preto e branco ou em tons de cinzento, os gráficos não deverão ter cores. Gráficos a três dimensões apenas serão aceites em situações excepcionais.

A resolução de imagens a preto e branco deve ser de pelo menos 1200 dpi e a de imagens com tons de cinzento ou a cores deve ser de pelo menos 300 dpi.

As legendas, símbolos, setas ou letras devem ser inseridas no ficheiro da imagem das fotografias ou ilustrações.

Os custos da publicação das figuras a cores serão suportados pelos autores.

Em caso de aceitação do manuscrito, serão solicitadas as figuras nos formatos mais adequados para a produção da revista.

### **Discussão**

Na discussão não deve ser repetida detalhadamente a informação fornecida na secção dos resultados, mas devem ser discutidas as limitações do estudo, a relação dos resultados obtidos com o observado noutras investigações e devem ser evidenciados os aspectos inovadores do estudo e as conclusões que deles resultam.

É importante que as conclusões estejam de acordo com os objectivos do estudo, mas devem ser evitadas afirmações e conclusões que não sejam completamente apoiadas pelos resultados da investigação em causa.

### **Referências**

As referências devem ser listadas após o texto principal, numeradas consecutivamente de acordo com a ordem da sua citação. Os números

das referências devem ser apresentados entre parêntesis. Não deve ser utilizado software para numeração automática das referências.

Pode ser encontrada nos "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" uma descrição pormenorizada do formato dos diferentes tipos de referências, de que se acrescentam alguns exemplos:

#### 1. Artigo

• Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increase risk for pancreaticobiliary disease. *Ann Intern Med* 1996;124:980-3.

#### 2. Artigo com Organização como Autor

• The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing, safety and performance guidelines. *Med J Aust* 1996; 64:282-4.

#### 3. Artigo publicado em Volume com Suplemento

• Shen HM, Zhang QF. Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. *Environ Health Perspect* 1994; 102 Suppl 1:275-82.

#### 4. Artigo publicado em Número com Suplemento

payne DK, Sullivan MD, Massie MJ. Women's psychological reactions to breast cancer. *Semin Oncol* 1996;23 (1 Suppl 2):89-97.

#### 5. Livro

Ringsven MK, Bond D. *Gerontology and leadership skills for nurses*. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers;1996.

#### 6. Livro (Editor(s) como Autor(es))

Norman IJ, Redfern SJ, editores. *Mental health care for elderly people*. New York: Churchill Livingstone;1996.

#### 7. Livro (Organização como Autor e Editor)

Institute of Medicine (US). *Looking at the future of the Medicaid program*. Washington: The Institute;1992.

#### 8. Capítulo de Livro

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. *Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management*. 2nd ed. New York: Raven Press;1995. p. 465-78.

#### 9. Artigo em Formato Electrónico

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* [serial online] 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5]; 1 (1): [24 screens]. Disponível em: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>

Devem ser utilizados os nomes abreviados das publicações, de acordo com o adoptado pelo Index Medicus. Uma lista de publicações pode ser obtida em <http://www.nlm.nih.gov>.

Deve ser evitada a citação de resumos e comunicações pessoais.

Os autores devem verificar se todas as referências estão de acordo com os documentos originais.

#### Anexos

Material muito extenso para a publicação com o manuscrito, designadamente tabelas muito extensas ou instrumentos de recolha de

dados, poderá ser solicitado aos autores para que seja fornecido a pedido dos interessados.

#### Conflitos de interesse

Os autores de qualquer manuscrito submetido devem revelar no momento da submissão a existência de conflitos de interesse ou declarar a sua inexistência.

Essa informação será mantida confidencial durante a revisão do manuscrito pelos avaliadores externos e não influenciará a decisão editorial mas será publicada se o artigo for aceite.

#### Autorizações

Antes de submeter um manuscrito aos ARQUIVOS DE MEDICINA os autores devem ter em sua posse os seguintes documentos que poderão ser solicitados pelo corpo editorial:

- consentimento informado de cada participante;
- consentimento informado de cada indivíduo presente em fotografias, mesmo quando forem efectuadas tentativas de ocultar a respectiva identidade;
- transferência de direitos de autor de imagens ou ilustrações;
- autorizações para utilização de material previamente publicado;
- autorizações dos colaboradores mencionados na secção de agradecimentos.

#### SUBMISSÃO DE MANUSCRITOS

Os manuscritos submetidos aos ARQUIVOS DE MEDICINA devem ser preparados de acordo com as recomendações acima indicadas e devem ser acompanhados de uma carta de apresentação.

#### Carta de apresentação

Deve incluir a seguinte informação:

- 1) Título completo do manuscrito;
- 2) Nomes dos autores com especificação do contributo de cada um para o manuscrito;
- 3) Justificação de um número elevado de autores, quando aplicável;
- 4) Tipo de artigo, de acordo com a classificação dos ARQUIVOS DE MEDICINA;
- 5) Fontes de financiamento, incluindo bolsas;
- 6) Revelação de conflitos de interesse ou declaração da sua ausência;
- 7) Declaração de que o manuscrito não foi ainda publicado, na íntegra ou em parte, e que nenhuma versão do manuscrito está a ser avaliada por outra revista;
- 8) Declaração de que todos os autores aprovaram a versão do manuscrito que está a ser submetida;
- 9) Assinatura de todos os autores.

É dada preferência à submissão dos manuscritos por e-mail (submit@arquivosdemedicina.org).

O manuscrito e a carta de apresentação devem, neste caso, ser enviados em ficheiros separados em formato word. Deve ser enviada por fax (225074374) uma cópia da carta de apresentação assinada por todos os autores.

Se não for possível efectuar a submissão por e-mail esta pode ser efectuada por correio para o seguinte endereço:

ARQUIVOS DE MEDICINA

Faculdade de Medicina do Porto

Alameda Prof. Hernâni Monteiro

Os manuscritos devem, então, ser submetidos em triplicado (1 original impresso apenas numa das páginas e 2 cópias com impressão frente e verso), acompanhados da carta de apresentação.

Os manuscritos rejeitados ou o material que os acompanha não serão devolvidos, excepto quando expressamente solicitado no momento da submissão.

#### **CORRECÇÃO DOS MANUSCRITOS**

A aceitação dos manuscritos relativamente aos quais forem solicitadas alterações fica condicionada à sua realização.

A versão corrigida do manuscrito deve ser enviada com as alterações sublinhadas para facilitar a sua verificação e deve ser acompanhada dum carta respondendo a cada um dos comentários efectuados.

Os manuscritos só poderão ser considerados aceites após confirmação das alterações solicitadas.

#### **MANUSCRITOS ACEITES**

Uma vez comunicada a aceitação dos manuscritos, deve ser enviada a sua versão final em ficheiro de Word®, formatada de acordo com as instruções acima indicadas.

No momento da aceitação os autores serão informados acerca do formato em que devem ser enviadas as figuras.

A revisão das provas deve ser efectuada e aprovada por todos os autores dentro de três dias úteis. Nesta fase apenas se aceitam modificações que decorram da correcção de gralhas.

Deve ser enviada uma declaração de transferência de direitos de autor para os ARQUIVOS DE MEDICINA, assinada por todos os autores, juntamente com as provas corrigidas.