



FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DO PORTO

## MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

2013/2014

Rui Pedro Monteiro Barranha  
Genetic heterogeneity in colorectal carcinoma and its clinical implications

março, 2014

# FMUP



FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DO PORTO

Rui Pedro Monteiro Barranha  
Genetic heterogeneity in colorectal carcinoma and its clinical implications

**Mestrado Integrado em Medicina**

**Área: Anatomia Patológica**

**Trabalho efetuado sob a Orientação de:  
Professor Doutor José Carlos Machado**

**E sob a Coorientação de:  
Professora Doutora Fátima Carneiro**

**Trabalho organizado de acordo com as normas da revista:  
Acta Médica Portuguesa**

março, 2014

**FMUP**

Eu, Rui Pedro Monteiro Barranha, abaixo assinado, nº mecanográfico 080801215, estudante do 6º ano do Ciclo de Estudos 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, 20/03/2014

Assinatura conforme cartão de identificação:

Rui Pedro Monteiro Barranha

NOME

Rui Pedro Monteiro Barranha

CARTÃO DE CIDADÃO

13754167

E-MAIL

ruibarranha@gmail.com

TELEMÓVEL

913079656

NÚMERO DE ESTUDANTE

080801215

DATA DE CONCLUSÃO

2014

DESIGNAÇÃO DA ÁREA DO PROJECTO

Anatomia Patológica

TÍTULO MONOGRAFIA

Genetic heterogeneity in colorectal carcinoma and its clinical implications

ORIENTADOR

José Carlos Lemos Machado

COORIENTADOR

Maria de Fátima Machado Henriques Carneiro

É autorizada a reprodução integral desta Monografia para efeitos de investigação e de divulgação pedagógica, em programas e projectos coordenados pela FMUP.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 20/03/2014

Assinatura conforme cartão de identificação:

Rui Pedro Monteiro Barranha

*“Vita brevis,  
ars longa,  
occasio praeceps,  
experimentum periculosum,  
iudicium difficile.”*

Hippocratis Aphorismorum  
c. 400 a.C.

*In Memoriam*  
Arlindo Torres

# Genetic heterogeneity in colorectal carcinoma and its clinical implications

Heterogeneidade genética no carcinoma colorrectal e as suas implicações clínicas

**Rui Barranha<sup>1,2</sup>; José Luís Costa<sup>2</sup>, *PhD*; Fátima Carneiro<sup>1,2,3</sup>, *PhD*; José Carlos Machado<sup>1,2</sup>, *PhD***

<sup>1</sup> Medical Faculty, University of Porto, Alameda Prof. Hernâni Monteiro 4200-319 Porto, Portugal

<sup>2</sup> Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto (IPATIMUP), Rua Dr. Roberto Frias s/n, 4200-465 Porto, Portugal

<sup>3</sup> Department of Pathology, Hospital S. João, Alameda Prof. Hernâni Monteiro, 4200-319 Porto, Portugal

***Morada do Autor:*** Rua de Valdevez, 105; 4350-335 Porto, Portugal

***E-mail do Autor:*** ruibarranha@gmail.com

***Título para cabeçalho:*** Genetic heterogeneity in colorectal carcinoma

# **Genetic heterogeneity in colorectal carcinoma and its clinical implications**

## ***Abstract***

Despite the recent advances in the development of complementary diagnostic exams and modern targeted therapies, colorectal carcinoma remains a major cause of morbidity and mortality worldwide. In this context, a lot of research has been conducted in the last years to find new markers of poor prognosis. The existence of a complex tumour architecture formed by multiple subclones genetically heterogeneous has been increasingly considered in recent studies as an element of particular importance. This feature seems to influence factors as relevant as the representativeness of tumour biopsies for genetic diagnosis and the efficacy of targeted therapies. There is growing evidence suggesting a relation between genetic heterogeneity and the patients' prognosis. The widespread use of next-generation sequencing techniques will allow a better understanding of the true degree of genetic heterogeneity in colorectal tumours, its causes and impact on the course of the disease. In this review we intend to analyse the recent findings related to the genetic heterogeneity of colorectal carcinoma, as well as its major clinical implications.

## ***Resumo***

Apesar dos recentes avanços no desenvolvimento de métodos complementares de diagnóstico e de novas terapêuticas dirigidas, o carcinoma colo-rectal continua a ser uma importante causa mundial de morbidade e mortalidade. Neste sentido, têm sido desenvolvidos nos últimos anos inúmeros trabalhos de investigação com o intuito de encontrar possíveis marcadores de mau prognóstico ainda não caracterizados. A existência de uma arquitectura tumoral complexa formada por vários subclones com heterogeneidade genética entre si tem sido consistentemente apontada em linhas de investigação recentes como um elemento de particular importância. Esta característica parece ter implicações em factores tão relevantes como a representatividade da amostragem tumoral de biópsias para diagnóstico genético e a eficácia de terapias dirigidas, existindo um crescente grau de evidência da relação

entre a heterogeneidade genética e o prognóstico dos doentes. O uso generalizado de técnicas de sequenciação de nova geração irá permitir uma melhor compreensão do verdadeiro grau de heterogeneidade genética dos tumores colo-rectais, das suas causas e do seu real impacto na evolução da doença. Nesta revisão pretendemos analisar as recentes descobertas relacionadas com a heterogeneidade genética do carcinoma colo-rectal, bem como as suas principais implicações clínicas.

**Keywords:** colorectal neoplasms, molecular targeted therapy, clonal evolution, genetic heterogeneity, translational medical research.



## ***Introduction***

Colorectal carcinoma is an important cause of global morbidity and mortality. Its aetiology is connected to sporadic and hereditary genetic alterations in connection with environmental factors, such as dietary composition<sup>1</sup>. According to statistics from the International Agency for Research on Cancer through the GLOBOCAN series, colorectal cancer is the third most frequent type of cancer in men (approximately 10.0% of all cancers) and the second in women (9.2% of total) worldwide, with the majority of cases taking place in developed countries<sup>2</sup>. In 2012 this neoplasm was responsible for 694,000 deaths<sup>2</sup>, being its mortality correlated with the stage of the cancer at the moment of diagnosis. Data from the American Cancer Society shows that the five-year survival rate in colorectal cancers diagnosed at a localized stage is about 90%, whereas cancers with distant metastases at diagnosis see their rate drop to 13%<sup>3</sup>. Such values highlight the importance of implementing national screening programs for the early detection of colorectal cancers, whose advantages for the population health have been confirmed in several studies<sup>4</sup>.

Despite the development of modern diagnostic and treatment technologies as well as advances in pharmacogenomics, colorectal carcinoma is still a major burden worldwide. Therefore, it becomes imperative to continually improve our understanding of the mechanisms underlying carcinogenic and cancer drug resistance processes in order to prevent, control and cure increasingly more cancers. In this context, genetic tumour heterogeneity has been reported in recent years as a potentially relevant factor to consider in cancer research. It may be implicated in aspects as important as clinical outcome and resistance to therapies. In this review we intend to analyse the latest findings related to genetic heterogeneity, with particular attention to colorectal carcinoma, and its major clinical implications.

## ***Tumour heterogeneity***

The existence of phenotypic heterogeneity and nuclear pleomorphism within a tumour has been observed in the nineteenth century with the advent of microscopic diagnosis and the classification of cancers by pathologists<sup>5</sup>. Nowadays, due to this intra-tumour diversity it is common practice among pathologists to evaluate several samples of one tumour, attributing it the highest grade observed<sup>6</sup>. In fact, it has been considered for some time that cancers are originated from distinct subclones that accumulate somatic mutations and are subjected to

Darwinian processes of natural selection<sup>7</sup>. Recent studies have confirmed the existence of independent evolution of clones in the colon as soon as the stage of microadenoma and throughout adenoma development until the adenoma-to-carcinoma transition<sup>8</sup>, suggesting that colorectal tumorigenesis is a process characterised by polyclonality and a branched evolution of clones. This eventually originates the emergence of a complex tumour architecture constituted by intermingled genetically distinct clones<sup>9</sup>. In terms of DNA copy number, it has been demonstrated that such intra-tumour heterogeneity can mirror the level of heterogeneity between different tumours<sup>10</sup>. However, as far as genetic variability is concerned, the degree of heterogeneity within individual tumours does not display such extreme values, as will be posteriorly outlined.

There has been accumulating evidence reinforcing this concept of branched evolution in solid tumours<sup>11-13</sup>, which can be understood as the existence of several niches of cells developing strategies to increase their fitness to survive in a potentially adverse environment. As a matter of fact, the ability to resist cell death by apoptosis has been established as one of the hallmarks of cancer<sup>14</sup>. While the majority of premalignant cells are removed through the apoptotic machinery, some neoplastic cells avoid being eliminated by increasing their mutation rate and accumulating random mutations<sup>15</sup>. This increase in the mutational load may grant them characteristics that will make them more fit to confront the pressures of natural selection<sup>16</sup> and may lead to the emergence of clones with increased proliferative advantage<sup>16</sup>. Nonetheless, most cancer cells do not develop such advantages and eventually die before dividing, which partially explains the fact that tumours' doubling time are usually much longer than the cancer cell cycle time<sup>9</sup>.

The existence of genomic instability is likely to be a significant cause of genetic heterogeneity as well. Indeed its exact impact might be underestimated due to the impossibility of evaluating the mutational landscape of every single tumour cell<sup>17</sup>. Nevertheless, it must be taken into account that different instability mechanisms are related to distinct patient outcomes. Specifically, colorectal tumours with microsatellite instability correlate with good clinical prognosis<sup>17</sup>. There is not a definite explanation for this fact. However, it has been reported that microsatellite instability may lead to the creation of neoantigens that induce the formation of immune infiltrates<sup>17,18</sup>. The accumulation of T-cells in colorectal cancer has been reported to be associated with better clinical prognosis<sup>19</sup>.

### ***Genetic heterogeneity between primary tumours and metastases***

In addition to the presence of heterogeneity between subclones of a primary tumour it is important to bear in mind the possible existence of genetic heterogeneity between primary tumours and its related metastases. Such finding can happen in case the metastases are originated from a minor subclone not easily detected in biopsy samples of the primary tumour or in view of a parallel progression model of the metastases in relation to the primary tumour<sup>20</sup>. In fact, some minor subclones might have a higher ability to metastasize than the majority of other cells in the primary tumour. This can lead to the selection of a specific mutational load in the metastases and thus to a certain degree of heterogeneity<sup>21</sup>.

One important feature that may also play a significant role in the development of this kind of genetic heterogeneity is the microenvironment<sup>22,23</sup>. In order to adapt to a dynamic microenvironment, the tumour may need to change its genetic composition both at different times and locations<sup>6,21</sup>. Moreover, the fact that the microenvironment in which the primary tumour and its metastasis are located might be different could lead to the outgrowth of metastatic cells with a mutational load distinct from the primary tumours, as a way to adapt to different selection pressures<sup>16</sup>. The stroma and the vascular supply are two environmental factors particularly relevant in the development of a tumour mass that may display significant variations between different locations, thereby inducing the emergence of genetic heterogeneity between primary tumours and its associated metastases<sup>18</sup>. The stroma is nowadays recognized as an important part of tumours, making it necessary to approach carcinomas as functional organs and not just a group of neoplastic cells<sup>18</sup>. In fact, cancer-associated fibroblasts have characteristics that differentiate them from regular fibroblasts<sup>18</sup>, and may act as a relevant factor in treatment response<sup>24</sup>. Moreover, it is believed that minor subclones can interact with other subclones through the release of paracrine factors that induce their growth, maintaining the intra-tumour heterogeneity<sup>25</sup> and reinforcing the idea that tumours are more than just a mass of cells.

The distribution of tumour vessels is also an important source of tumour heterogeneity. Regions of hypoxia within a tumour or a metastasis are a source of selective pressure that can induce the emergence of clones harbouring mutations that grant them survival advantages<sup>18</sup>. Furthermore, the tumour vasculature is also a determining factor in the diffusion of chemotherapy agents<sup>26</sup>, affecting the clinical outcome in colorectal cancer<sup>27</sup>. Hypoxic regions may actually protect colon cancer stem cells from chemotherapy<sup>28</sup>. It has also been shown that endothelial cells have paracrine effects on neoplastic cells, inducing cancer stem cell-like phenotype on colorectal cancer cells, thereby increasing chemoresistance<sup>29</sup>. The

importance of the vascular supply to colorectal cancer is supported by the fact that the use of bevacizumab, a monoclonal antibody directed against VEGF (vascular endothelial growth factor), has positive effects in the treatment of metastatic colorectal cancer<sup>30</sup>.

### ***The effect of genetic heterogeneity on tumour sampling***

The previously described causes of tumour heterogeneity impose relevant questions related to whether or not biopsy samples are illustrative of the overall genetic content of tumours. When it is necessary to evaluate the presence of mutations in a tumour the clinical routine is to study the mutational status of only one neoplastic location. Until this moment there is no formal indication as to which samples are more adequate to be tested: primary tumour, lymph nodal or distant metastases. Nevertheless, there have been recent findings regarding genetic heterogeneity in colorectal cancer that must be taken into account in the future.

First of all, the presence of intra-tumour heterogeneity may be responsible for the existence of contradictory results in the mutation analysis of resected tumours when compared with biopsies. Although recent studies have demonstrated that biopsy samples are “sufficiently representative<sup>31</sup> of the whole tumour and that they can be used with efficacy in clinical practice<sup>31,32</sup>, it has been estimated that using only a tumour sample will eventually misdiagnose 10% of patients as wild-type for KRAS, making it imperative to analyse the cost-effectiveness of using more than one biopsy<sup>33</sup>. In order to reduce the probability of sampling bias, radiologic models to assess the presence of intra-tumour genetic heterogeneity are being developed<sup>34</sup>.

Secondly, it has been found that the tumour centre has a higher rate of KRAS mutations when compared to its invasion front<sup>35</sup>. Moreover, recent data suggested that lymph nodal metastases are not as suitable as primary tumour samples and distant metastases to assess the mutational status of a neoplastic disease<sup>35</sup> as they have an inferior and more heterogeneous amount of mutations<sup>35,36</sup>. In fact, it has been proposed that nodal metastases could be originated in a disease stage prior to the acquisition of KRAS mutations by primary tumours<sup>36</sup>.

Finally, in case of a clinical relapse the usual procedure is to take into consideration the mutational status of biopsies previously obtained. Nevertheless, these results may not correspond to the mutations present in the tumour after treatment or disease progression<sup>37</sup>. Therefore, performing new biopsies could be important to direct treatments in such cases<sup>37</sup>.

### ***The impact of genetic heterogeneity on targeted therapies***

It could be particularly relevant to determine the full extent of genetic heterogeneity in every patient's cancer because even a small degree of mutational discordance between primary tumours and metastases may lead to an unreliable diagnosis and misselection of treatments. With the advent of personalized medicine there has been an increasing interest in the research and clinical use of therapies molecularly directed to specific targets. This is the case of monoclonal antibodies to epidermal growth factor receptor (EGFR), cetuximab and panitumumab, in colorectal cancer<sup>38</sup>. These antibodies are approved for the treatment of KRAS wild-type metastatic colorectal cancer, and they were the first treatment for solid tumours whose approval depends on a genetic test<sup>38</sup>.

In fact, it has been shown in several studies that only patients with wild-type KRAS have substantial clinical response rates (up to 50% of all patients), while patients with KRAS mutated tumours only have effective responses in a maximum of 6% of all cases<sup>39-43</sup>. Although only KRAS and NRAS mutations are used routinely as exclusion criteria for the use of anti-EGFR monoclonal antibodies, mutations in other EGFR-dependent signalling molecules may induce resistance to the treatment. It has been estimated that it would be possible to identify up to 15% more refractory cases to this treatment if mutation analyses for BRAF and PIK3CA was to be introduced in clinical practice<sup>35</sup>. Despite what could be expected, the expression levels of EGFR do not seem to have a predictive value in the therapeutic response to these antibodies<sup>44,45</sup>. As a matter of fact, it has been found that tumours classified as EGFR-negative by immunohistochemistry have the potential to respond in up to 25% of all cases<sup>46</sup>. Such findings could, however, be explained by the existence of intra-tumour heterogeneity that leads to sampling bias.

Directed therapies are regularly planned according to the analysis of primary tumour samples' mutational status. However, there is increasing evidence of clonal diversity between metastatic and primary tumour samples, which translates in suboptimal treatment of metastatic disease<sup>16</sup>. Many studies have reported incongruous determinations of prognostic or predictive biomarkers between primary tumours and distant metastases in several tumour models. However, the average degree of heterogeneity is difficult to estimate with accuracy because of methodological and sampling limitations. Specifically in colorectal cancer, the values of disparity for KRAS mutations (used as a predictive biomarker of response to directed therapies) between primary tumours and metastases in different studies has ranged from 0% to 60%<sup>47</sup>. Some of the studies that found a substantially high value of discrepancy in the mutational status of primary tumours and metastases have led to the suggestion that distant

metastases should be preferentially studied when the use of targeted therapies is being considered<sup>21</sup>. This procedure is, however, associated with higher risk of complications and is not usually performed in clinical practice. On the other hand, there is an increasing number of recent studies reporting a degree of concordance between primary tumours and metastases higher than 95%<sup>21,48-52</sup>, one of these studies using next-generation sequencing techniques. Therefore, it has been proposed that the metastases should only be biopsied in patients with more than one primary cancer<sup>50</sup>.

A better understanding of the mechanisms that induce tumour heterogeneity could improve the management of cancer patients and probably help to predict treatment resistance. Some mechanisms of therapeutic resistance are well defined and involve secondary genetic alterations that restrict the binding of drugs to their targets or induce the activation of alternative pathways<sup>16,20</sup>. However, many mutations that induce resistance to targeted therapies may exist prior to the start of the treatment in minor subclones. Those may emerge and become dominant due to the selective pressures of the target therapies<sup>20</sup>. In the case of colorectal cancer, circulating DNA tumour with KRAS mutations can be detected in some patients 5 to 6 months after treatment with anti-EGFR antibody therapy<sup>53</sup>, reinforcing the possible existence prior to treatment of minor subclones harbouring mutations that induce resistance to directed therapies.

Therefore, the degree of genetic diversity between tumour cells could be fairly informative and if properly measured this information could be used with therapeutic advantage. The “trunk-branch model” of tumour heterogeneity, documented by Gerlinger et al.<sup>12</sup>, demonstrates that “driver mutations” in the trunk are the ones for which treatments could be directed and that could be used as valuable predictive biomarkers with eventually less sampling bias, considering that they should be present in all tumour cells<sup>6</sup>. Nevertheless, the minor subpopulations, that form the branches, harbour mutations that induce resistance and may lead to treatment failure<sup>6</sup>.

In the near future of personalized medicine, the improvement of sequencing technologies will allow the detection of mutations only expressed by a minority of cells before the start of treatment and will eventually lead to the use of a combination of successful therapies, targeting multiple signalling pathways simultaneously. Besides, developing techniques to analyse cell-free circulating tumour DNA and circulating tumour cells would allow an early detection of resistance and relapse to therapies, as well as changes in the overall clonal composition of tumours<sup>37</sup>.

### ***Future challenges***

The vast majority of advanced and metastatic cancers are still incurable despite the remarkable advances in translational and clinical research in the last decades. The introduction of molecular-targeted drugs has considerably enhanced the outcome of patients with solid tumours in advanced stages. However, not all molecularly selected patients will demonstrate clinical benefit and some of them will fail to respond to the therapy. Besides, even some patients who initially respond to targeted treatments often relapse due to the emergence of drug resistance.

Along with the development of next-generation sequencing techniques, the possibility of identifying mutations that are only expressed in minor clones, and therefore less represented in the whole tumour, is gradually becoming a reality<sup>16</sup>. This way it will be possible to effectively assess the overall mutational landscape of tumours in the near future<sup>54</sup> thus increasing our ability to evaluate the degree of intra and inter-tumour heterogeneity of a single patient<sup>6</sup>. In order to ensure the reliability of results achieved through these techniques the Next Generation Sequencing Standardization of Clinical Testing workgroup advocates that all mutations with clinical implications should be corroborated by alternative methods<sup>55</sup>. However, in the case of low-frequency mutations representative of minor subclones, it might not be possible to do so by Sanger or PCR sequencing<sup>37</sup>. Furthermore, such procedure poses a problem related to how long do oncologists and patients consider adequate to wait for the result of genetic diagnostics before initiating a treatment<sup>37</sup>.

Finally, there is an issue that must be considered when conducting research to assess intra-tumour heterogeneity. Transplantation assays in animal models have been used in several studies to examine genetic heterogeneity in different types of cancer and have generated numerous and sometimes contradictory results. However, such reports must be cautiously interpreted considering that they may possibly not resemble with accuracy what happens in human tumours<sup>56</sup>. In fact, xenotransplanted tumours might not express to the full extent their growth potential due to mice's immune system response<sup>56</sup> and may also not recreate the structure of functional tissues due to inadequate stromal environment<sup>56</sup>. For all this, the results produced in studies about intra-tumour heterogeneity should be critically analysed for potential biases in their design, as it may lead to erroneous conclusions.

## References

1. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, et al. Colorectal cancer. *Lancet* 2010;375:1030-47.
2. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. (Accessed January 19, 2014, at <http://globocan.iarc.fr/>.)
3. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014;64:9-29.
4. Smith RA, Manassaram-Baptiste D, Brooks D, Cokkinides V, Doroshenk M, Saslow D, et al. Cancer screening in the United States, 2014: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening. *CA Cancer J Clin* 2014;64:30-51.
5. Hajdu SI. A note from history: landmarks in history of cancer, part 3. *Cancer* 2012;118:1155-68.
6. Fisher R, Pusztai L, Swanton C. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. *Br J Cancer* 2013;108:479-85.
7. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976;194:23-8.
8. Thirlwell C, Will OC, Domingo E, Graham TA, McDonald SA, Oukrif D, et al. Clonality assessment and clonal ordering of individual neoplastic crypts shows polyclonality of colorectal adenomas. *Gastroenterology* 2010;138:1441-54, 54.e1-7.
9. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature* 2012;481:306-13.
10. Martinez P, Birnbak NJ, Gerlinger M, McGranahan N, Burrell RA, Rowan AJ, et al. Parallel evolution of tumour subclones mimics diversity between tumours. *J Pathol* 2013;230:356-64.
11. Yachida S, Jones S, Bozic I, Antal T, Leary R, Fu B, et al. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* 2010;467:1114-7.
12. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012;366:883-92.
13. Wu X, Northcott PA, Dubuc A, Dupuy AJ, Shih DJ, Witt H, et al. Clonal selection drives genetic divergence of metastatic medulloblastoma. *Nature* 2012;482:529-33.
14. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-74.
15. Loeb LA. Cancer cells exhibit a mutator phenotype. *Adv Cancer Res* 1998;72:25-56.
16. Almendro V, Marusyk A, Polyak K. Cellular heterogeneity and molecular evolution in



- cancer. *Annu Rev Pathol* 2013;8:277-302.
17. Burrell RA, McGranahan N, Bartek J, Swanton C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature* 2013;501:338-45.
  18. Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature* 2013;501:346-54.
  19. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012;12:298-306.
  20. Marusyk A, Almendro V, Polyak K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat Rev Cancer* 2012;12:323-34.
  21. Vermaat JS, Nijman IJ, Koudijs MJ, Gerritse FL, Scherer SJ, Mokry M, et al. Primary colorectal cancers and their subsequent hepatic metastases are genetically different: implications for selection of patients for targeted treatment. *Clin Cancer Res* 2012;18:688-99.
  22. Place AE, Jin Huh S, Polyak K. The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment. *Breast Cancer Res* 2011;13:227.
  23. Tlsty TD, Coussens LM. Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu Rev Pathol* 2006;1:119-50.
  24. Ohuchida K, Mizumoto K, Murakami M, Qian LW, Sato N, Nagai E, et al. Radiation to stromal fibroblasts increases invasiveness of pancreatic cancer cells through tumor-stromal interactions. *Cancer Res* 2004;64:3215-22.
  25. Inda MM, Bonavia R, Mukasa A, Narita Y, Sah DW, Vandenberg S, et al. Tumor heterogeneity is an active process maintained by a mutant EGFR-induced cytokine circuit in glioblastoma. *Genes Dev* 2010;24:1731-45.
  26. Tredan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:1441-54.
  27. Des Guetz G, Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Morere JF, Benamouzig R, et al. Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer. Meta-analysis of the literature. *Br J Cancer* 2006;94:1823-32.
  28. Mao Q, Zhang Y, Fu X, Xue J, Guo W, Meng M, et al. A tumor hypoxic niche protects human colon cancer stem cells from chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 2013;139:211-22.
  29. Lu J, Ye X, Fan F, Xia L, Bhattacharya R, Bellister S, et al. Endothelial cells promote the colorectal cancer stem cell phenotype through a soluble form of Jagged-1. *Cancer Cell* 2013;23:171-85.
  30. Hurwitz HI, Fehrenbacher L, Hainsworth JD, Heim W, Berlin J, Holmgren E, et al.

- Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin: an active regimen for first-line metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:3502-8.
31. Fadhil W, Ibrahim S, Seth R, AbuAli G, Rangunath K, Kaye P, et al. The utility of diagnostic biopsy specimens for predictive molecular testing in colorectal cancer. *Histopathology* 2012;61:1117-24.
  32. Krol LC, t Hart NA, Methorst N, Knol AJ, Prinsen C, Boers JE. Concordance in KRAS and BRAF mutations in endoscopic biopsy samples and resection specimens of colorectal adenocarcinoma. *Eur J Cancer* 2012;48:1108-15.
  33. Richman SD, Chambers P, Seymour MT, Daly C, Grant S, Hemmings G, et al. Intratumoral heterogeneity of KRAS and BRAF mutation status in patients with advanced colorectal cancer (aCRC) and cost-effectiveness of multiple sample testing. *Anal Cell Pathol (Amst)* 2011;34:61-6.
  34. Noterdaeme O, Kelly M, Friend P, Soonowalla Z, Steers G, Brady M. Initial assessment of a model relating intratumoral genetic heterogeneity to radiological morphology. *Br J Radiol* 2010;83:166-70.
  35. Baldus SE, Schaefer KL, Engers R, Hartleb D, Stoecklein NH, Gabbert HE. Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases. *Clin Cancer Res* 2010;16:790-9.
  36. Miranda E, Bianchi P, Destro A, Morengi E, Malesci A, Santoro A, et al. Genetic and epigenetic alterations in primary colorectal cancers and related lymph node and liver metastases. *Cancer* 2013;119:266-76.
  37. Bedard PL, Hansen AR, Ratain MJ, Siu LL. Tumour heterogeneity in the clinic. *Nature* 2013;501:355-64.
  38. Messersmith WA, Ahnen DJ. Targeting EGFR in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008;359:1834-6.
  39. Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006;66:3992-5.
  40. Lievre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2008;26:374-9.
  41. Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F, Le Pessot F, Lamy A, Galais MP, et al. Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. *Br J Cancer* 2007;96:1166-9.
  42. Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, Wu S, et al.

- Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2007;25:3230-7.
43. De Roock W, Piessevaux H, De Schutter J, Janssens M, De Hertogh G, Personeni N, et al. KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann Oncol* 2008;19:508-15.
  44. Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ, Sr., Needle MN, Kopit J, Mayer RJ. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 2004;22:1201-8.
  45. Hecht JR, Mitchell E, Neubauer MA, Burris HA, 3rd, Swanson P, Lopez T, et al. Lack of correlation between epidermal growth factor receptor status and response to Panitumumab monotherapy in metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16:2205-13.
  46. Chung KY, Shia J, Kemeny NE, Shah M, Schwartz GK, Tse A, et al. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2005;23:1803-10.
  47. Stoecklein NH, Klein CA. Genetic disparity between primary tumours, disseminated tumour cells, and manifest metastasis. *Int J Cancer* 2010;126:589-98.
  48. Knijn N, Mekenkamp LJ, Klomp M, Vink-Borger ME, Tol J, Teerenstra S, et al. KRAS mutation analysis: a comparison between primary tumours and matched liver metastases in 305 colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 2011;104:1020-6.
  49. Park JH, Han SW, Oh DY, Im SA, Jeong SY, Park KJ, et al. Analysis of KRAS, BRAF, PTEN, IGF1R, EGFR intron 1 CA status in both primary tumors and paired metastases in determining benefit from cetuximab therapy in colon cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011;68:1045-55.
  50. Vakiani E, Janakiraman M, Shen R, Sinha R, Zeng Z, Shia J, et al. Comparative genomic analysis of primary versus metastatic colorectal carcinomas. *J Clin Oncol* 2012;30:2956-62.
  51. Italiano A, Hostein I, Soubeyran I, Fabas T, Benchimol D, Evrard S, et al. KRAS and BRAF mutational status in primary colorectal tumors and related metastatic sites: biological and clinical implications. *Ann Surg Oncol* 2010;17:1429-34.
  52. Etienne-Grimaldi MC, Formento JL, Francoual M, Francois E, Formento P, Renee N, et al. K-Ras mutations and treatment outcome in colorectal cancer patients receiving exclusive fluoropyrimidine therapy. *Clin Cancer Res* 2008;14:4830-5.

53. Diaz LA, Jr., Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 2012;486:537-40.
54. Russnes HG, Navin N, Hicks J, Borresen-Dale AL. Insight into the heterogeneity of breast cancer through next-generation sequencing. *J Clin Invest* 2011;121:3810-8.
55. Gargis AS, Kalman L, Berry MW, Bick DP, Dimmock DP, Hambuch T, et al. Assuring the quality of next-generation sequencing in clinical laboratory practice. *Nat Biotechnol* 2012;30:1033-6.
56. Meacham CE, Morrison SJ. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* 2013;501:328-37.

# Agradecimentos

Gostaria de aproveitar esta oportunidade para agradecer a algumas pessoas que constituíram um suporte indispensável para a elaboração desta Monografia de Mestrado Integrado em Medicina e, mais importante que isso, para o desafiante percurso de seis anos que tem sido o curso de Medicina.

Irei iniciar os meus agradecimentos por dirigir uma palavra de gratidão ao Professor Doutor José Carlos Machado e à Professora Doutora Fátima Carneiro por todo o tempo que me disponibilizaram e pelo contributo decisivo que tiveram na concepção desta tese. Acima disso quero expressar o meu agradecimento por terem confiado no meu interesse e capacidade de trabalho, tendo-me dado uma oportunidade de participar no grupo de investigação do IPATIMUP. Tem sido uma experiência única e enriquecedora, tanto a nível profissional como pessoal.

Quero reconhecer a importância da colaboração do Doutor José Luís Costa na estruturação deste artigo de revisão e agradecer-lhe o auxílio na elucidação das dúvidas que me foram surgindo.

Não poderia deixar de endereçar um agradecimento especial à minha família por terem sido uma base de apoio insubstituível ao longo dos anos. Acreditaram sempre no meu potencial e deram-me as ferramentas necessárias para construir o meu futuro. Espero que o caminho que venha a trilhar seja motivo de orgulho para vós.

Aos meus amigos da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e à Lina deixo um sincero obrigado pelo suporte imprescindível que têm sido nos bons e nos maus momentos. A vossa companhia fez com que os obstáculos deste percurso se tenham transformado em desafios que ultrapassámos em conjunto.

Aproveito esta oportunidade para expressar a minha estima por toda a ajuda que recebi do Carlos Resende e da Sara Meireles a iniciar a pesquisa bibliográfica para este

trabalho e por tudo o que me ensinaram, mas também por todos os excelentes momentos de trabalho que passámos juntos.

A todos no IPATIMUP Diagnósticos quero exprimir o meu sincero apreço pela forma acolhedora e bem disposta com que me receberam. Fizem com que sair diariamente mais tarde do que estava a planear fosse um gosto.

Quero agradecer à Cheila Ribeiro por toda a alegria e por inicialmente me ter dado a ideia de escrever um artigo de revisão.

Penso ser justo que manifeste a relevância de todos os docentes que ao longo do meu percurso educativo, universitário mas não só, tiveram vocação para ensinar. Gostaria de destacar o Professor Doutor Sobrinho Simões pela sua sabedoria, dinamismo e humanidade e pela forma como inspirou em mim o gosto pela Ciência.

Por fim, vou deixar aqui um agradecimento um tanto inusitado a todos os artistas que ao longo dos anos me inspiraram, abriram horizontes intelectuais e fizeram sonhar, constituindo não só uma distração como também uma companhia diária ao estudo (por vezes fastidioso) da Medicina. Fica aqui o meu desejo para que, nos tempos penosos que se avizinham, nunca me esqueça:

“El médico que sólo Medicina sabe, ni Medicina sabe.”

(José de Letamendi, 1828-1897)

## **Anexo**

# Normas de Publicação da Acta Médica Portuguesa



## Acta Médica Portuguesa's Publishing Guidelines

Conselho Editorial ACTA MÉDICA PORTUGUESA  
Acta Med Port 2013, 5 de Novembro de 2013

### 1. MISSÃO

Publicar trabalhos científicos originais e de revisão na área biomédica da mais elevada qualidade, abrangendo várias áreas do conhecimento médico, e ajudar os médicos a tomar melhores decisões.

Para atingir estes objectivos a Acta Médica Portuguesa publica artigos originais, artigos de revisão, casos clínicos, editoriais, entre outros, comentando sobre os factores clínicos, científicos, sociais, políticos e económicos que afetam a saúde. A Acta Médica Portuguesa pode considerar artigos para publicação de autores de qualquer país.

### 2. VALORES

- Promover a qualidade científica.
- Promover o conhecimento e actualidade científica.
- Independência e imparcialidade editorial.
- Ética e respeito pela dignidade humana.
- Responsabilidade social.

### 3. VISÃO

Ser reconhecida como uma revista médica portuguesa de grande impacto internacional.

Promover a publicação científica da mais elevada qualidade privilegiando o trabalho original de investigação (clínico, epidemiológico, multicêntrico, ciência básica).

Constituir o fórum de publicação de normas de orientação.

Ampliar a divulgação internacional.

**Lema:** "Primum non nocere, primeiro a Acta Médica Portuguesa"

### 4. INFORMAÇÃO GERAL

A Acta Médica Portuguesa é a revista científica com revisão pelos pares (*peer-review*) da Ordem dos Médicos. É publicada continuamente desde 1979, estando indexada na PubMed / Medline desde o primeiro número. Desde 2010 tem Factor de Impacto atribuído pelo Journal Citation Reports - Thomson Reuters.

A Acta Médica Portuguesa segue a política do livre acesso. Todos os seus artigos estão disponíveis de forma integral, aberta e gratuita desde 1999 no seu site [www.actamedicaportuguesa.com](http://www.actamedicaportuguesa.com) e através da Medline com interface PubMed.

A taxa de aceitação da Acta Médica Portuguesa é apro-

ximadamente de 55% dos mais de 300 manuscritos recebidos anualmente.

Os manuscritos devem ser submetidos *online* via "Submissões Online" <http://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/about/submissions#online> Submissions.

A Acta Médica Portuguesa rege-se de acordo com as boas normas de edição biomédica do International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), do Committee on Publication Ethics (COPE), e do EQUATOR Network Resource Centre Guidance on Good Research Report (desenho de estudos).

A política editorial da Revista incorpora no processo de revisão e publicação as Recomendações de Política Editorial (*Editorial Policy Statements*) emitidas pelo Conselho de Editores Científicos (Council of Science Editors), disponíveis em <http://www.councilscienceeditors.org/i4a/pages/index.cfm?pageid=3331>, que cobre responsabilidades e direitos dos editores das revistas com arbitragem científica. Os artigos propostos não podem ter sido objecto de qualquer outro tipo de publicação. As opiniões expressas são da inteira responsabilidade dos autores. Os artigos publicados ficarão propriedade conjunta da Acta Médica Portuguesa e dos autores.

A Acta Médica Portuguesa reserva-se o direito de comercialização do artigo enquanto parte integrante da revista (na elaboração de separatas, por exemplo). O autor deverá acompanhar a carta de submissão com a declaração de cedência de direitos de autor para fins comerciais.

Relativamente à utilização por terceiros a Acta Médica Portuguesa rege-se pelos termos da licença *Creative Commons* 'Atribuição – Uso Não-Comercial – Proibição de Realização de Obras Derivadas (by-nc-nd)'.

Após publicação na Acta Médica Portuguesa, os autores ficam autorizados a disponibilizar os seus artigos em repositórios das suas instituições de origem, desde que mencionem sempre onde foram publicados.

### 5. CRITÉRIO DE AUTORIA

A revista segue os critérios de autoria do "International Committee of Medical Journal Editors" (ICMJE).

Todos designados como autores devem ter participado significativamente no trabalho para tomar responsabilidade



pública sobre o conteúdo e o crédito da autoria.

Autores são todos que:

1. Têm uma contribuição intelectual substancial, directa, no desenho e elaboração do artigo
2. Participam na análise e interpretação dos dados
3. Participam na escrita do manuscrito, revendo os rascunhos; ou na revisão crítica do conteúdo; ou na aprovação da versão final

As condições 1, 2 e 3 têm de ser reunidas.

Autoria requer uma contribuição substancial para o manuscrito, sendo pois necessário especificar em carta de apresentação o contributo de cada autor para o trabalho.

Ser listado como autor, quando não cumpre os critérios de elegibilidade, é considerado fraude.

Todos os que contribuíram para o artigo, mas que não encaixam nos critérios de autoria, devem ser listados nos agradecimentos.

Todos os autores, (isto é, o autor correspondente e cada um dos autores) terão de preencher e assinar o “Formulário de Autoria” com a responsabilidade da autoria, critérios e contribuições; conflitos de interesse e financiamento e transferência de direitos autorais / *copyright*.

O autor Correspondente deve ser o intermediário em nome de todos os co-autores em todos os contactos com a Acta Médica Portuguesa, durante todo o processo de submissão e de revisão. O autor correspondente é responsável por garantir que todos os potenciais conflitos de interesse mencionados são correctos. O autor correspondente deve atestar, ainda, em nome de todos os co-autores, a originalidade do trabalho e obter a permissão escrita de cada pessoa mencionada na secção “Agradecimentos”.

## 6. COPYRIGHT / DIREITOS AUTORAIS

Quando o artigo é aceite para publicação é mandatório o envio via *e-mail* de documento digitalizado, assinado por todos os Autores, com a partilha dos direitos de autor entre autores e a Acta Médica Portuguesa.

O(s) Autor(es) deve(m) assinar uma cópia de partilha dos direitos de autor entre autores e a Acta Médica Portuguesa quando submetem o manuscrito, conforme minuta publicada em anexo:

Nota: Este documento assinado só deverá ser enviado quando o manuscrito for aceite para publicação.

Editor da Acta Médica Portuguesa

O(s) Autor(es) certifica(m) que o manuscrito intitulado: \_\_\_\_\_ (ref.

AMP \_\_\_\_\_) é original, que todas as afirmações apresentadas como factos são baseados na investigação do(s) Autor(es), que o manuscrito, quer em parte quer no todo, não infringe nenhum *copyright* e não viola nenhum direito da privacidade, que não foi publicado em parte ou no todo e que não foi submetido para publicação, no todo ou em parte, noutra revista, e que os Autores têm o direito ao *copyright*.

Todos os Autores declaram ainda que participaram no trabalho, se responsabilizam por ele e que não existe, da

parte de qualquer dos Autores conflito de interesses nas afirmações proferidas no trabalho.

Os Autores, ao submeterem o trabalho para publicação, partilham com a Acta Médica Portuguesa todos os direitos a interesses do *copyright* do artigo.

### **Todos os Autores devem assinar**

Data: \_\_\_\_\_

Nome (maiúsculas): \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## 7. CONFLITOS DE INTERESSE

O rigor e a exactidão dos conteúdos, assim como as opiniões expressas são da exclusiva responsabilidade dos Autores. Os Autores devem declarar potenciais conflitos de interesse. Os autores são obrigados a divulgar todas as relações financeiras e pessoais que possam enviesar o trabalho.

Para prevenir ambiguidade, os autores têm que explicitamente mencionar se existe ou não conflitos de interesse.

Essa informação não influenciará a decisão editorial mas antes da submissão do manuscrito, os autores têm que assegurar todas as autorizações necessárias para a publicação do material submetido.

Se os autores têm dúvidas sobre o que constitui um relevante interesse financeiro ou pessoal, devem contactar o editor.

## 8. CONSENTIMENTO INFORMADO e APROVAÇÃO ÉTICA

Todos os doentes (ou seus representantes legais) que possam ser identificados nas descrições escritas, fotografias e vídeos deverão assinar um formulário de consentimento informado para descrição de doentes, fotografia e vídeos. Estes formulários devem ser submetidos com o manuscrito.

A Acta Médica Portuguesa considera aceitável a omissão de dados ou a apresentação de dados menos específicos para identificação dos doentes. Contudo, não aceitaremos a alteração de quaisquer dados.

Os autores devem informar se o trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética da instituição de acordo com a declaração de Helsínquia.

## 9. LÍNGUA

Os artigos devem ser redigidos em português ou em inglês. Os títulos e os resumos têm de ser sempre em português e em inglês.

## 10. PROCESSO EDITORIAL

O autor correspondente receberá notificação da recepção do manuscrito e decisões editoriais por *email*.

Todos os manuscritos submetidos são inicialmente revistos pelo editor da Acta Médica Portuguesa. Os manuscritos são avaliados de acordo com os seguintes critérios: originalidade, actualidade, clareza de escrita, método de estudo apropriado, dados válidos, conclusões adequadas e apoiadas pelos dados, importância, com significância e

contribuição científica para o conhecimento da área, e não tenham sido publicados, na íntegra ou em parte, nem submetidos para publicação noutros locais.

A Acta Médica Portuguesa segue um rigoroso processo cego (*single-blind*) de revisão por pares (*peer-review*, externos à revista). Os manuscritos recebidos serão enviados a peritos das diversas áreas, os quais deverão fazer os seus comentários, incluindo a sugestão de aceitação, aceitação condicionada a pequenas ou grandes modificações ou rejeição. Na avaliação, os artigos poderão ser:

- a) aceites sem alterações;
- b) aceites após modificações propostas pelos consultores científicos;
- c) recusados.

Estipula-se para esse processo o seguinte plano temporal:

- Após a recepção do artigo, o Editor-Chefe, ou um dos Editores Associados, enviará o manuscrito a, no mínimo, dois revisores, caso esteja de acordo com as normas de publicação e se enquadre na política editorial. Poderá ser recusado nesta fase, sem envio a revisores.

- Quando receberem a comunicação de aceitação, os Autores devem remeter de imediato, por correio electrónico, o formulário de partilha de direitos que se encontra no *site* da Acta Médica Portuguesa, devidamente preenchido e assinado por todos os Autores.

- No prazo máximo de quatro semanas, o revisor deverá responder ao editor indicando os seus comentários relativos ao manuscrito sujeito a revisão, e a sua sugestão de quanto à aceitação ou rejeição do trabalho. O Conselho Editorial tomará, num prazo de 15 dias, uma primeira decisão que poderá incluir a aceitação do artigo sem modificações, o envio dos comentários dos revisores para que os Autores procedam de acordo com o indicado, ou a rejeição do artigo.

Os Autores dispõem de 20 dias para submeter a nova versão revista do manuscrito, contemplando as modificações recomendadas pelos peritos e pelo Conselho Editorial. Quando são propostas alterações, o autor deverá enviar, no prazo máximo de vinte dias, um *e-mail* ao editor respondendo a todas as questões colocadas e anexando uma versão revista do artigo com as alterações inseridas destacadas com cor diferente.

- O Editor-Chefe dispõe de 15 dias para tomar a decisão sobre a nova versão: rejeitar ou aceitar o artigo na nova versão, ou submetê-lo a um ou mais revisores externos cujo parecer poderá, ou não, coincidir com os resultantes da primeira revisão.

- Caso o manuscrito seja reenviado para revisão externa, os peritos dispõem de quatro semanas para o envio dos seus comentários e da sua sugestão quanto à aceitação ou recusa para publicação do mesmo.

- Atendendo às sugestões dos revisores, o Editor-Chefe poderá aceitar o artigo nesta nova versão, rejeitá-lo ou voltar a solicitar modificações. Neste último caso, os Autores dispõem de um mês para submeter uma versão revista, a qual poderá, caso o Editor-Chefe assim o determine, voltar

a passar por um processo de revisão por peritos externos.

- No caso da aceitação, em qualquer das fases anteriores, a mesma será comunicada ao Autor principal. Num prazo inferior a um mês, o Conselho Editorial enviará o artigo para revisão dos Autores já com a formatação final, mas sem a numeração definitiva. Os Autores dispõem de cinco dias para a revisão do texto e comunicação de quaisquer erros tipográficos. Nesta fase, os Autores não podem fazer qualquer modificação de fundo ao artigo, para além das correcções de erros tipográficos e/ou ortográficos de pequenos erros. Não são permitidas, nomeadamente, alterações a dados de tabelas ou gráficos, alterações de fundo do texto, etc.

- Após a resposta dos Autores, ou na ausência de resposta, após o decurso dos cinco dias, o artigo considera-se concluído.

- Na fase de revisão de provas tipográficas, alterações de fundo aos artigos não serão aceites e poderão implicar a sua rejeição posterior por decisão do Editor-Chefe.

Chama-se a atenção que a transcrição de imagens, quadros ou gráficos de outras publicações deverá ter a prévia autorização dos respectivos autores para dar cumprimento às normas que regem os direitos de autor.

## 11. PUBLICAÇÃO FAST-TRACK

A Acta Médica Portuguesa dispõe do sistema de publicação *Fast-Track* para manuscritos urgentes e importantes desde que cumpram os requisitos da Acta Médica Portuguesa para o *Fast-Track*.

- a) Os autores para requererem a publicação *fast-track* devem submeter o seu manuscrito em <http://www.actamedicaportuguesa.com/> “submeter artigo” indicando claramente porque consideram que o manuscrito é adequado para a publicação rápida. O Conselho Editorial tomará a decisão sobre se o manuscrito é adequado para uma via rápida (*fast-track*) ou para submissão regular;

- b) Verifique se o manuscrito cumpre as normas aos autores da Acta Médica Portuguesa e que contém as informações necessárias em todos os manuscritos da Acta Médica Portuguesa.

- c) O Gabinete Editorial irá comunicar, dentro de 48 horas, se o manuscrito é apropriado para avaliação *fast-track*. Se o Editor-Chefe decidir não aceitar a avaliação *fast-track*, o manuscrito pode ser considerado para o processo de revisão normal. Os autores também terão a oportunidade de retirar a sua submissão.

- d) Para manuscritos que são aceites para avaliação *fast-track*, a decisão Editorial será feita no prazo de 5 dias úteis.

- e) Se o manuscrito for aceite para publicação, o objectivo será publicá-lo, online, no prazo máximo de 3 semanas após a aceitação.

## 12. REGRAS DE OURO ACTA MÉDICA PORTUGUESA

- a) O editor é responsável por garantir a qualidade da revista e que o que publica é ético, actual e relevante para os leitores.

- b) A gestão de reclamações passa obrigatoriamente pelo editor-chefe e não pelo bastonário.
- c) O peer review deve envolver a avaliação de revisores externos.
- d) A submissão do manuscrito e todos os detalhes associados são mantidos confidenciais pelo corpo editorial e por todas as pessoas envolvidas no processo de peer-review.
- e) A identidade dos revisores é confidencial.
- f) Os revisores aconselham e fazem recomendações; o editor toma decisões.
- g) O editor-chefe tem total independência editorial.
- h) A Ordem dos Médicos não interfere directamente na avaliação, selecção e edição de artigos específicos, nem directamente nem por influência indirecta nas decisões editoriais.
- i) As decisões editoriais são baseadas no mérito de trabalho submetido e adequação à revista.
- j) As decisões do editor-chefe não são influenciadas pela origem do manuscrito nem determinadas por agentes externos.
- k) As razões para rejeição imediata sem peer review externo são: falta de originalidade; interesse limitado para os leitores da Acta Médica Portuguesa; conter graves falhas científicas ou metodológicas; o tópico não é coberto com a profundidade necessária; é preliminar de mais e/ou especulativo; informação desactualizada.
- l) Todos os elementos envolvidos no processo de peer review devem actuar de acordo com os mais elevados padrões éticos.
- m) Todas as partes envolvidas no processo de peer review devem declarar qualquer potencial conflito de interesses e solicitar escusa de rever manuscritos que sintam que não conseguirão rever objectivamente.

### 13. NORMAS GERAIS

#### ESTILO

Todos os manuscritos devem ser preparados de acordo com o “AMA Manual of Style”, 10th ed. e/ou “Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals”.

Escreva num estilo claro, directo e activo. Geralmente, escreva usando a primeira pessoa, voz activa, por exemplo, “Analisámos dados”, e não “Os dados foram analisados”. Os agradecimentos são as excepções a essa directriz, e deve ser escrito na terceira pessoa, voz activa; “Os autores gostariam de agradecer”. Palavras em latim ou noutra língua que não seja a do texto deverão ser colocadas em itálico.

Os componentes do manuscrito são: Página de Título, Resumo, Texto, Referências, e se apropriado, legendas de figuras. Inicie cada uma dessas secções em uma nova página, numeradas consecutivamente, começando com a página de título.

Os formatos de arquivo dos manuscritos autorizados incluem o *Word* e o *WordPerfect*. Não submeta o manuscrito em formato PDF.

#### SUBMISSÃO

Os manuscritos devem ser submetidos online, via “Submissão Online” da Acta Médica Portuguesa <http://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/about/submissions#onlineSubmissions>.

Todos os campos solicitados no sistema de submissão *online* terão de ser respondidos.

Após submissão do manuscrito o autor receberá a confirmação de recepção e um número para o manuscrito.

#### Na primeira página/ página de título:

- a) Título em **português e inglês**, conciso e descritivo
- b) Na linha da autoria, liste o Nome de todos os Autores (primeiro e último nome) com os títulos académicos e/ou profissionais e respectiva afiliação (departamento, instituição, cidade, país)
- c) Subsídio(s) ou bolsa(s) que contribuíram para a realização do trabalho
- d) Morada e *e-mail* do Autor responsável pela correspondência relativa ao manuscrito
- e) Título breve para cabeçalho

#### Na segunda página

- a) Título (sem autores)
- b) Resumo em **português e inglês**. Nenhuma informação que não conste no manuscrito pode ser mencionada no resumo. Os resumos não podem remeter para o texto, não podendo conter citações nem referencias a figuras.
- c) Palavras-chave (*Keywords*). Um máximo de 5 *Keywords* em inglês utilizando a terminologia que consta no Medical Subject Headings (MeSH), <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>, devem seguir-se ao resumo.

#### Na terceira página e seguintes:

##### ■ Editoriais:

Os Editoriais serão apenas submetidos por convite do Editor. Serão comentários sobre tópicos actuais. Não devem exceder as 1.200 palavras nem conter tabelas/figuras e terão um máximo de 5 referências bibliográficas. Não precisam de resumo.

##### ■ Perspectiva:

Artigos elaborados apenas por convite do Conselho Editorial. Podem cobrir grande diversidade de temas com interesse nos cuidados de saúde: problemas actuais ou emergentes, gestão e política de saúde, história da medicina, ligação à sociedade, epidemiologia, etc.

Um Autor que deseje propor um artigo desta categoria deverá remeter previamente ao Editor-Chefe o respectivo resumo, indicação dos autores e título do artigo para avaliação.

Deve conter no máximo 1200 palavras (excluindo as referências e as legendas) e até 10 referências bibliográficas. Só pode conter uma tabela ou uma figura. Não precisa de resumo.

**■ Artigos Originais:**

O texto deve ser apresentado com as seguintes secções: Introdução (incluindo Objectivos), Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões, Agradecimentos (se aplicável), Referências, Tabelas e Figuras.

Os Artigos Originais não deverão exceder as 4.000 palavras, excluindo referências e ilustrações. Deve ser acompanhado de ilustrações, com um máximo de 6 figuras/tabelas e 60 referências bibliográficas.

O resumo dos artigos originais não deve exceder as 250 palavras e serão estruturados (com cabeçalhos: Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusão).

A Acta Médica Portuguesa, como membro do ICMJE, exige como condição para publicação, o registo de todos os ensaios num registo público de ensaios aceite pelo ICMJE (ou seja, propriedade de uma instituição sem fins lucrativos e publicamente acessível, por ex. [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov)). Todos os manuscritos reportando ensaios clínicos têm de seguir o CONSORT *Statement* <http://www.consort-statement.org/>.

Numa revisão sistemática ou meta-análise de estudos randomizados siga as PRISMA *guidelines*.

Numa meta-análise de estudos observacionais, siga as MOOSE *guidelines* e apresente como um ficheiro complementar o protocolo do estudo, se houver um.

Num estudo de precisão de diagnóstico, siga as STARD *guidelines*.

Num estudo observacional, siga as STROBE *guidelines*.

Num *Guideline* clínico incentivamos os autores a seguir a GRADE *guidance* para classificar a evidência.

**■ Artigos de Revisão:**

Destinam-se a abordar de forma aprofundada, o estado actual do conhecimento referente a temas de importância. Estes artigos serão elaborados a convite da equipa editorial, contudo, a título excepcional, será possível a submissão, por autores não convidados (com ampla experiência no tema) de projectos de artigo de revisão que, julgados relevantes e aprovados pelo editor, poderão ser desenvolvidos e submetidos às normas de publicação.

Comprimento máximo: 3500 palavras de texto (não incluindo resumo, legendas e referências). Não pode ter mais do que um total de 4 tabelas e / ou figuras, e não mais de 50-75 referências.

O resumo dos artigos de revisão não deve exceder as 250 palavras e serão estruturados (com cabeçalhos: Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusão).

**■ Caso Clínico:**

O relato de um caso clínico com justificada razão de publicação (raridade, aspectos inusitados, evoluções atípicas, inovações terapêuticas e de diagnóstico, entre outras). As secções serão: Introdução, Caso Clínico, Discussão, Bibliografia.

O texto não deve exceder as 1.000 palavras e 15 refe-

rências bibliográficas. Deve ser acompanhado de figuras ilustrativas. O número de tabelas/figuras não deve ser superior a 5.

Inclua um resumo não estruturado que não exceda 150 palavras, que sumarie o objectivo, pontos principais e conclusões do artigo.

**■ Imagens em Medicina (Imagem Médica):**

A Imagem em Medicina é um contributo importante da aprendizagem e da prática médica. Poderão ser aceites imagens clínicas, de imagiologia, histopatologia, cirurgia, etc. Podem ser enviadas até duas imagens por caso.

Deve incluir um título com um máximo de oito palavras e um texto com um máximo de 150 palavras onde se dê informação clínica relevante, incluindo um breve resumo do historial do doente, dados laboratoriais, terapêutica e condição actual. Não pode ter mais do que três autores e cinco referências bibliográficas. Não precisa de resumo.

Só são aceites fotografias originais, de alta qualidade, que não tenham sido submetidas a prévia publicação. Devem ser enviados dois ficheiros: um com a qualidade exigida para a publicação de imagens e outra que serve apenas para referência em que o topo da fotografia deve vir indicado com uma seta. Para informação sobre o envio de imagens digitais, consulte as «Normas técnicas para a submissão de figuras, tabelas ou fotografias».

**■ Guidelines / Normas de orientação:**

As sociedades médicas, os colégios das especialidades, as entidades oficiais e / ou grupos de médicos que desejem publicar na Acta Médica Portuguesa recomendações de prática clínica, deverão contactar previamente o Conselho Editorial e submeter o texto completo e a versão para ser publicada. O Editor-Chefe poderá colocar como exigência a publicação exclusiva das recomendações na Acta Médica Portuguesa.

Poderá ser acordada a publicação de uma versão resumida na edição impressa cumulativamente à publicação da versão completa no *site* da Acta Médica Portuguesa.

**■ Cartas ao Editor:**

Devem constituir um comentário a um artigo da Acta Med Port ou uma pequena nota sobre um tema ou caso clínico. Não devem exceder as 400 palavras, nem conter mais de uma ilustração e ter um máximo de 5 referências bibliográficas. Não precisam de resumo.

Deve seguir a seguinte estrutura geral: Identificar o artigo (torna-se a referência 1); Dizer porque está a escrever; fornecer evidência (a partir da literatura ou a partir de uma experiência pessoal) fornecer uma súmula; citar referências.

A(s) resposta(s) do(s) Autor(es) devem observar as mesmas características.

Uma Carta ao editor discutindo um artigo recente da Acta Med Port terá maior probabilidade de aceitação se for submetida quatro semanas após a publicação do artigo.

**Abreviaturas:** Não use abreviaturas ou acrónimos no título nem no resumo, e limite o seu uso no texto. O uso de acrónimos deve ser evitado, assim como o uso excessivo e desnecessário de abreviaturas. Se for imprescindível recorrer a abreviaturas não consagradas, devem ser definidas na primeira utilização, por extenso, logo seguido pela abreviatura entre parênteses. Não coloque pontos finais nas abreviaturas.

**Unidades de Medida:** As medidas de comprimento, altura, peso e volume devem ser expressas em unidades do sistema métrico (metro, quilograma ou litro) ou seus múltiplos decimais.

As temperaturas devem ser dadas em graus Celsius (°C) e a pressão arterial em milímetros de mercúrio (mm Hg).

Para mais informação consulte a tabela de conversão “Units of Measure” no *website* da AMA Manual Style.

**Nomes de Medicamentos, Dispositivos ou outros Produtos:** Use o nome não comercial de medicamentos, dispositivos ou de outros produtos, a menos que o nome comercial seja essencial para a discussão.

## IMAGENS

Numere todas as imagens (figuras, gráficos, tabelas, fotografias, ilustrações) pela ordem de citação no texto.

Inclua um título/legenda para cada imagem (uma frase breve, de preferência com não mais do que 10 a 15 palavras).

A publicação de imagens a cores é gratuita.

No manuscrito, são aceitáveis os seguintes formatos: BMP, EPS, JPG, PDF e TIF, com 300 *dpis* de resolução, pelo menos 1200 *pixels* de largura e altura proporcional.

As Tabelas/Figuras devem ser numeradas na ordem em que são citadas no texto e assinaladas em numeração árabe e com identificação, figura/tabela. Tabelas e figuras devem ter numeração árabe e legenda. Cada Figura e Tabela incluídas no trabalho têm de ser referidas no texto, da forma que passamos a exemplificar:

Estes são alguns exemplos de como uma resposta imunitária anormal pode estar na origem dos sintomas da doença de Behçet (Fig. 4).

Esta associa-se a outras duas lesões cutâneas (Tabela 1).

Figura: Quando referida no texto é abreviada para Fig., enquanto a palavra Tabela não é abreviada. Nas legendas ambas as palavras são escritas por extenso.

Figuras e tabelas serão numeradas com numeração árabe independentemente e na sequência em que são referidas no texto.

Exemplo: Fig. 1, Fig. 2, Tabela 1

**Legendas:** Após as referências bibliográficas, ainda no ficheiro de texto do manuscrito, deverá ser enviada legenda detalhada (sem abreviaturas) para cada imagem. A imagem tem que ser referenciada no texto e indicada a sua localização aproximada com o comentário “Inserir Figura nº 1... aqui”.

**Tabelas:** É obrigatório o envio das tabelas a preto e

branco no final do ficheiro. As tabelas devem ser elaboradas e submetidas em documento *word*, em formato de tabela simples (*simple grid*), sem utilização de tabuladores, nem modificações tipográficas. Todas as tabelas devem ser mencionadas no texto do artigo e numeradas pela ordem que surgem no texto. Indique a sua localização aproximada no corpo do texto com o comentário “Inserir Tabela nº 1... aqui”. Neste caso os autores autorizam uma reorganização das tabelas caso seja necessário.

As tabelas devem ser acompanhadas da respectiva legenda/título, elaborada de forma sucinta e clara.

Legendas devem ser auto-explicativas (sem necessidade de recorrer ao texto) – é uma declaração descritiva.

Legenda/Título das Tabelas: Colocada por cima do corpo da tabela e justificada à esquerda. Tabelas são lidas de cima para baixo. Na parte inferior serão colocadas todas as notas informativas – notas de rodapé (abreviaturas, significado estatístico, etc.) As notas de rodapé para conteúdo que não caiba no título ou nas células de dados devem conter estes símbolos \*, †, ‡, §, ||, ¶, \*\*, ††, ‡‡, §§, ||||, ¶¶.

**Figuras:** Os ficheiros «figura» podem ser tantos quantas imagens tiver o artigo. Cada um destes elementos deverá ser submetido em ficheiro separado, obrigatoriamente em versão electrónica, pronto para publicação. As figuras (fotografias, desenhos e gráficos) não são aceites em ficheiros *word*.

Em formato TIF, JPG, BMP, EPS e PDF com 300 *dpis* de resolução, pelo menos 1200 *pixels* de largura e altura proporcional.

As legendas têm que ser colocadas no ficheiro de texto do manuscrito.

Caso a figura esteja sujeita a direitos de autor, é responsabilidade dos autores do artigo adquirir esses direitos antes do envio do ficheiro à Acta Médica Portuguesa.

Legenda das Figuras: Colocada por baixo da figura, gráfico e justificada à esquerda. Gráficos e outras figuras são habitualmente lidos de baixo para cima.

Só são aceites imagens de doentes quando necessárias para a compreensão do artigo. Se for usada uma figura em que o doente seja identificável deve ser obtida e remetida à Acta Médica Portuguesa a devida autorização. Se a fotografia permitir de forma óbvia a identificação do doente, esta poderá não ser aceite. Em caso de dúvida, a decisão final será do Editor-Chefe.

• **Fotografias:** Em formato TIF, JPG, BMP e PDF com 300 *dpis* de resolução, pelo menos 1200 *pixels* de largura e altura proporcional.

• **Desenhos e gráficos:** Os desenhos e gráficos devem ser enviados em formato vectorial (AI, EPS) ou em ficheiro bitmap com uma resolução mínima de 600 dpi. A fonte a utilizar em desenhos e gráficos será obrigatoriamente Arial.

As imagens devem ser apresentadas em ficheiros separados submetidos como documentos suplementares, em condições de reprodução, de acordo com a ordem em que

são discutidas no texto. As imagens devem ser fornecidas independentemente do texto.

#### AGRADECIMENTOS (facultativo)

Devem vir após o texto, tendo como objectivo agradecer a todos os que contribuíram para o estudo mas não têm peso de autoria. Nesta secção é possível agradecer a todas as fontes de apoio, quer financeiro, quer tecnológico ou de consultoria, assim como contribuições individuais. Cada pessoa citada nesta secção de agradecimentos deve enviar uma carta autorizando a inclusão do seu nome.

#### REFERÊNCIAS

Os autores são responsáveis pela exactidão e rigor das suas referências e pela sua correcta citação no texto.

As referências bibliográficas devem ser citadas numericamente (algarismos árabes formatados sobrescritos) por ordem de entrada no texto e ser identificadas no texto com algarismos árabes. **Exemplo:** “Dimethylfumarate has also been a systemic therapeutic option in moderate to severe psoriasis since 1994<sup>13</sup> and in multiple sclerosis<sup>14</sup>.”

Se forem citados mais de duas referências em sequência, apenas a primeira e a última devem ser indicadas, sendo separadas por traço<sup>5-9</sup>.

Em caso de citação alternada, todas as referências devem ser digitadas, separadas por vírgula<sup>12,15,18</sup>.

As referências são alinhadas à esquerda.

Não deverão ser incluídos na lista de referências quaisquer artigos ainda em preparação ou observações não publicadas, comunicações pessoais, etc. Tais inclusões só são permitidas no corpo do manuscrito (ex: P. Andrade, comunicação pessoal).

As abreviaturas usadas na nomeação das revistas devem ser as utilizadas pelo National Library of Medicine (NLM) *Title Journals Abbreviations* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>

**Notas:** Não indicar mês da publicação.

Nas referências com 6 ou menos Autores devem ser nomeados todos. Nas referências com 7 ou mais autores devem ser nomeados os 6 primeiros seguidos de “et al”.

Seguem-se alguns exemplos de como devem constar os vários tipos de referências.

#### Artigo:

Apelido Iniciais do(s) Autor(es). Título do artigo. Título das revistas [abreviado]. Ano de publicação; Volume: páginas.

1. Com menos de 6 autores

Miguel C, Mediavilla MJ. Abordagem actual da gota. *Acta Med Port.* 2011;24:791-8.

2. Com mais de 6 autores

Norte A, Santos C, Gamboa F, Ferreira AJ, Marques A, Leite C, et al. Pneumonia Necrotizante: uma complicação rara. *Acta Med Port.* 2012;25:51-5.

#### Monografia:

Autor/Editor AA. Título: completo. Edição (se não for a primeira). Vol.(se for trabalho em vários volumes). Local de publicação: Editor comercial; ano.

1. Com Autores:

Moore, K. *Essential Clinical Anatomy*. 4th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins; 2011.

2. Com editor:

Gilstrap LC 3rd, Cunningham FG, VanDorsten JP, editors. *Operative obstetrics*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill; 2002.

#### Capítulo de monografia:

Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations in human solid tumors. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. *The genetic basis of human cancer*. New York: McGraw-Hill; 2002. p. 93-113.

#### Relatório Científico/Técnico:

Lugg DJ. Physiological adaptation and health of an expedition in Antarctica: with comment on behavioural adaptation. Canberra: A.G.P.S.; 1977. Australian Government Department of Science, Antarctic Division. ANARE scientific reports. Series B(4), Medical science No. 0126

#### Documento electrónico:

1. CD-ROM

Anderson SC, Poulsen KB. Anderson's electronic atlas of hematology [CD-ROM]. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.

2. Monografia da Internet

Van Belle G, Fisher LD, Heagerty PJ, Lumley TS. *Biostatistics: a methodology for the health sciences* [e-book]. 2nd ed. Somerset: Wiley InterScience; 2003 [consultado 2005 Jun 30]. Disponível em: Wiley InterScience electronic collection

3. Homepage/Website

Cancer-Pain.org [homepage na Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01; [consultado 2002 Jul 9]. Disponível em: <http://www.cancer-pain.org/>.

#### PROVAS TIPOGRÁFICAS

Serão da responsabilidade do Conselho Editorial, se os Autores não indicarem o contrário. Neste caso elas deverão ser feitas no prazo determinado pelo Conselho Editorial, em função das necessidades editoriais da Revista. Os autores receberão as provas para publicação em formato PDF para correcção e deverão devolvê-las num prazo de 48 horas.

#### ERRATA E RETRACÇÕES

A Acta Médica Portuguesa publica alterações, emendas ou retracções a um artigo anteriormente publicado. Alterações posteriores à publicação assumirão a forma de errata.

#### NOTA FINAL

Para um mais completo esclarecimento sobre este assunto aconselha-se a leitura do *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* do International Committee of Medical Journal Editors, disponível em <http://www.ICMJE.org>.