



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

2011/2012

Jaime Manuel Martins Pereira Rodrigues
Mecanismos de regulação da diferenciação
intestinal normal e metaplásica

março, 2012

FMUP



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Jaime Manuel Martins Pereira Rodrigues
Mecanismos de regulação da diferenciação
intestinal normal e metaplásica

Mestrado Integrado em Medicina

Área: Anatomia Patológica

**Trabalho efetuado sob a Orientação de:
Professora Doutora Maria Leonor Martins Soares David**

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

março, 2012

FMUP

Eu, Jaime Manuel Martins Pereira Rodrigues, abaixo assinado, nº mecanográfico 060801028, 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: Jaime Manuel Martins Pereira Rodrigues

Nome: Jaime Manuel Martins Pereira Rodrigues

Endereço eletrónico: jay_prodrigues84@hotmail.com **Telefone ou Telemóvel:** 914089521

Número do Bilhete de Identidade: 13368341

Título da ~~Dissertação~~/Monografia (cortar o que não interessa):

Mecanismos de regulação da diferenciação intestinal normal e metaplásica

Orientador:

Professora Doutora Maria Leonor Martins Soares David

Ano de conclusão: 2012

Designação da área do projeto:

Anatomia Patológica

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

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

Assinatura: Jaime Manuel Martins Pereira Rodrigues

TÍTULO: Mecanismos de regulação da diferenciação intestinal normal e metaplásica

TITLE: Mechanisms of regulation of normal and metaplastic intestinal differentiation

Diferenciação intestinal normal e metaplásica

Autores: Jaime Rodrigues*, Leonor David†

Afiliação:

* Aluno do 6º Ano do Mestrado Integrado de Medicina, Faculdade de Medicina do Porto

† Professora Catedrática, Faculdade de Medicina do Porto

Correspondência:

Jaime Manuel Martins Pereira Rodrigues

Serviço de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina do Porto

Alameda Professor Hernâni Monteiro

4200-319 Porto – Portugal

Contacto Telefónico: 914089521

E-mail: jay_prodrigues84@hotmail.com

Professora Doutora Maria Leonor Martins Soares David

Serviço de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina do Porto

Alameda Professor Hernâni Monteiro

4200-319 Porto – Portugal

E-mail: ld@med.up.pt

Contagem de Palavras:

Resumo – 169 palavras

Abstract – 161 palavras

Texto Principal – 4917 palavras

RESUMO

O trato gastrointestinal é uma estrutura superiormente organizada com origem nas três camadas germinativas embrionárias: endoderme, mesoderme e ectoderme. As alterações morfológicas que acompanham a sua formação são relativamente bem conhecidas, no entanto, os mecanismos moleculares subjacentes estão ainda pouco definidos. A metaplasia intestinal, um processo de transdiferenciação epitelial, é considerada uma lesão precursora de adenocarcinoma gástrico, uma neoplasia com graves consequências em termos de morbilidade e mortalidade a nível mundial. Do mesmo modo que o desenvolvimento embrionário gastrointestinal, as alterações moleculares com um papel no desenvolvimento desta lesão que recapitula o desenvolvimento intestinal (fora do tempo e do lugar) são também amplamente desconhecidas.

Nesta revisão, é apresentado, sumariamente, o processo de formação do tubo digestivo, desde a sua idade embrionária até à idade adulta, sendo descrita com maior pormenor a fase de padronização ântero-posterior, nomeadamente os mecanismos moleculares que poderão aqui desempenhar uma função. Ao mesmo tempo, tenta-se estabelecer um paralelismo e perceber quais dos mecanismos descritos podem, através da sua desregulação, estar na origem da lesão metaplásica.

Palavras-Chave: Diferenciação Gastrointestinal; Desenvolvimento Gastrointestinal; Metaplasia Intestinal; CDX2; Fatores de Transcrição.

ABSTRACT

The gastrointestinal tract is an organized structure originated in the three embryonic germ layers: endoderm, mesoderm and ectoderm. The morphological changes that accompany its formation are relatively well known, however, the underlying molecular mechanisms are still poorly defined. Intestinal metaplasia, an epithelial transdifferentiation process, is considered a precursor lesion of gastric adenocarcinoma, a malignancy with serious consequences in terms of morbidity and mortality worldwide. In the same way as the gastrointestinal embryonic development, the molecular changes with a role in the development of this lesion that recapitulates the intestinal development (out of time and space) are also widely unknown.

In this review we present, briefly, the process of formation of the digestive tract, from its embryonic age to adulthood, being described in more detail the stage of antero-posterior patterning, including the molecular mechanisms that may play a role here. At the same time we try to establish a parallel and understand what mechanisms can, through their deregulation, originate the metaplastic lesion.

Keywords: Gastrointestinal Differentiation; Gastrointestinal Development; Intestinal Metaplasia; CDX2; Transcription Factors.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	5
INTRODUÇÃO	6
MÉTODOS	7
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO	8
PADRONIZAÇÃO ÂNTERO-POSTERIOR DO TUBO DIGESTIVO	11
<i>Família Cdx</i>	13
<i>Família Fgf</i>	16
<i>Família Bmp</i>	16
<i>Família Wnt</i>	17
<i>Família SOX</i>	18
<i>Outras vias de sinalização</i>	19
REGULAÇÃO CRUZADA ENTRE AS VIAS DE SINALIZAÇÃO	21
CONCLUSÃO	22
BIBLIOGRAFIA	23
FIGURAS.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TGI – Trato Gastrointestinal

MI – Metaplasia Intestinal

FT – Fatores de Transcrição

AP – Ântero-Posterior

EVA – Endoderme Visceral Anterior

PIA – Portal Intestinal Anterior

PIP – Portal Intestinal Posterior

AR – Ácido Retinóico

INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal (TGI) consiste num longo sistema tubular que compreende o esôfago, estômago, intestino delgado e intestino grosso que se forma a partir da endoderme e da mesoderme, sendo inervado por células provenientes da terceira camada germinativa, a ectoderme. Trata-se, então, de uma estrutura superiormente organizada e que serve variadas e importantes funções, incluindo a digestão e absorção de nutrientes, função endócrina e função imunitária. (1).

Tal como os outros constituintes do corpo humano, o TGI está sujeito à ocorrência de um amplo leque de patologias, entre as quais a metaplasia intestinal (MI). A MI é uma lesão pré-neoplásica que resulta de um processo de transdiferenciação do epitélio gástrico num epitélio do tipo intestinal. Esta lesão faz parte de uma sequência de alterações da mucosa gástrica que poderá, em última instância, dar origem a um carcinoma gástrico (2-5). Embora a sequência de alterações morfológicas que origina uma neoplasia gástrica seja razoavelmente bem compreendida, os mecanismos moleculares subjacentes a este processo de diferenciação intestinal metaplásico permanecem por elucidar. No entanto, a alteração fenotípica que ocorre na MI parece surgir como resultado da combinação da expressão alterada de fatores genéticos, fatores de transcrição (FT), vias de sinalização, fatores de crescimento e silenciamento epigenético (3).

Uma vez que a metaplasia envolve a alteração de um fenótipo gástrico para um fenótipo intestinal, o estudo do desenvolvimento do tubo digestivo pode ser muito útil na compreensão dos mecanismos subjacentes a este processo. A especificação regional do embrião envolve FT que regulam genes necessários a várias vias de desenvolvimento específicas. A compreensão do funcionamento destes genes na endoderme poderá ajudar a perceber o modo como a endoderme origina diferentes fenótipos ao longo do TGI, e deste modo, como se origina a MI.

Nesta revisão, irá ser abordado o desenvolvimento embrionário do TGI, dando especial ênfase à padronização ântero-posterior (AP) do tubo digestivo e às vias moleculares com um papel na sua regulação, e a partir desse ponto tentar-se-á estabelecer um paralelismo com as vias que poderão estar envolvidas no desenvolvimento da MI.

MÉTODOS

Para a elaboração deste artigo procedeu-se a uma pesquisa na base de dados da *Medline*, através da *Pubmed*, usando a seguinte *query*: (*gut OR gastrointestinal OR intestine OR intestinal OR digestive*) AND (*differentiation OR development OR organogenesis OR formation OR patterning OR morphogenesis*) AND (*endoderm OR endodermal*). A pesquisa foi limitada a artigos em língua portuguesa ou inglesa publicados nos últimos 5 anos e o campo de pesquisa ao título e resumo. Obtiveram-se um total de 201 artigos, 25 dos quais de revisão. Dos artigos de revisão foram excluídos pelo título 16. Dos restantes artigos foram excluídos 127 pelo título e 34 pelo resumo, perfazendo um total de 24 artigos selecionados. Adicionalmente foram selecionados 38 trabalhos referenciados nos vários artigos obtidos através da pesquisa inicial, perfazendo um total de 62 artigos incluídos nesta revisão. Além do mais, foram consultados dois livros sobre o desenvolvimento embrionário do trato gastrointestinal.

Com esta pesquisa pretendeu-se assim obter um conhecimento base e atual acerca do desenvolvimento intestinal normal e de seguida perceber quais os mecanismos que poderão estar implicados no desenvolvimento intestinal metaplásico.

DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

O desenvolvimento do TGI segue uma sequência de etapas bem estabelecida, através das quais múltiplos sinais maioritariamente derivados da mesoderme padronizam os futuros domínios intestinais segundo 4 eixos: ântero-posterior (AP), dorsoventral, esquerda-direita e radial (6). De facto, a extensa troca de informação entre a endoderme e a mesoderme é crítica para o normal desenvolvimento intestinal (6-8).

Em grande parte dos vertebrados, incluindo o ser humano, as camadas germinativas primárias derivam duma camada primitiva pluripotente de células epiteliais designada de epiblasto, que não exhibe ainda eixo AP. Um conjunto de células da endoderme visceral, uma camada que rodeia o epiblasto, ao mover-se para a zona anterior do embrião forma a endoderme visceral anterior (EVA) definindo assim o eixo AP inicial do embrião (9).

Durante a 3ª semana de gestação ocorre a gastrulação, o processo através do qual se formam as três camadas germinativas primárias: endoderme, mesoderme e ectoderme (10-12). Este processo, que se inicia pela formação da linha primitiva a partir do epiblasto posterior, origina a endoderme definitiva, pela substituição gradual das células da endoderme visceral (9,13).

Vários fatores estão envolvidos na regulação deste processo de diferenciação trilaminar. A proteína Nodal, um membro da superfamília TGF- β , tem um papel chave neste processo. Em todos os vertebrados a via de sinalização Nodal é necessária e suficiente para iniciar o desenvolvimento da endoderme e mesoderme, o que vem de encontro à evidência recente que sugere que a endoderme e mesoderme surgem a partir de uma célula precursora comum, a célula mesoendodérmica (1,9,13-15). A exposição à sinalização Nodal por parte das células mesoendodérmicas, durante a gastrulação, determina em qual das camadas germinativas estas se diferenciam, com altos níveis de Nodal promovendo a diferenciação endodérmica, e baixos níveis promovendo a diferenciação mesodérmica (1,9,13-16).

A sinalização Wnt parece cooperar com o nodal na padronização mesoendodérmica (9,14,15). No ratinho, quer mutantes nulos para a β -catenina quer *wnt3* não sofrem gastrulação, não produzindo endoderme definitiva ou mesoderme (17).

Além disso, no ratinho foi demonstrado que outro membro da superfamília TGF- β , a Ativina, é capaz de mimetizar a função de Nodal ao ligar-se aos mesmos recetores, promovendo assim a formação de endoderme definitiva (1,7,14,18).

Uma vez que as camadas germinativas primárias estão estabelecidas através da gastrulação, a endoderme sofre uma complexa série de transformações para dar origem ao tubo digestivo, tornando-se gradualmente padronizada e diferenciada nos vários órgãos específicos. Foram identificadas várias vias de sinalização como potenciais reguladoras deste processo de regionalização. Além disso, foram também identificados recentemente, vários genes com padrões de expressão, limitados temporalmente e espacialmente, específicos de determinadas regiões da endoderme (19).

Através da formação de duas invaginações endodérmicas opostas, portal intestinal anterior (PIA) e posterior (PIP) e da sua união na linha média, ao mesmo tempo que a endoderme lateral se dobra ventralmente, forma-se um tubo digestivo primitivo encerrado e regionalizado num eixo AP (intestino anterior cranialmente, intestino posterior caudalmente, e intestino médio entre ambos), no dia embrionário 9 (e9.0) (1,13,20-22). A camada mais externa deste tubo primitivo é a ectoderme, a camada mais interna é a endoderme e a separar estas duas camadas está a mesoderme (10,11). A camada endodérmica originará o epitélio intestinal. A mesoderme que circunda a camada endodérmica por sua vez irá condensar-se e diferenciar-se-á na lâmina própria, submucosa, tecido muscular, vasos e tecido conjuntivo do TGI (6,11,23).

Depois do tubo digestivo estar formado, o epitélio simples do TGI condensa-se e torna-se num epitélio pseudo-estratificado indiferenciado (e9.5) (1). A morfologia da célula endodérmica permanece indiferenciada até ao dia e12 (ratinho). Depois da morfogénese, e continuando no período pós-natal, os vários tipos celulares do TGI surgem a partir da endoderme indiferenciada, de maneira a originar os epitélios característicos de cada órgão (6,24). No epitélio intestinal adulto podem ser identificados dois grupos celulares predominantes: células absorptivas, designadas de enterócitos no intestino delgado e

colonócitos no intestino grosso; e vários tipos de células secretoras, as células caliciformes, células caveoladas, enteroendócrinas e células de Paneth (estas últimas apenas no intestino delgado). Todos estes tipos de células epiteliais são derivados de células estaminais multipotentes presentes no epitélio (1).

A fase de citodiferenciação coincide com a formação do 5º eixo do TGI, o eixo vilosidade-cripta, o eixo funcional do intestino, caracterizado pela formação de invaginações para o interior do lúmen, as vilosidades, que compreendem uma base mesodérmica e uma camada endodérmica (epitelial) composta, entre outras, por células precursoras das diferentes linhagens (6,11,25). O mesênquima contém, entre outros, miofibroblastos subepiteliais intestinais que se pensa serem os principais reguladores da sinalização mesenquimatosa (6,25).

Simultaneamente, e em conjunto com o alongamento do tubo digestivo, o epitélio intestinal começa a sofrer uma extensa reorganização, no sentido rostro-caudal, para formar, finalmente, um epitélio cilíndrico simples que recobre a superfície luminal do intestino (1,20,21,26).

Na sequência de uma série de eventos rotacionais que resultam no posicionamento correto do tubo digestivo dentro da cavidade abdominal (10,11,23), a porção abdominal do intestino anterior dá origem ao esófago, estômago e duodeno proximal (superiormente à ampola do ducto pancreático). O intestino médio, por sua vez, diferencia-se na porção distal do duodeno (inferiormente à ampola do ducto pancreático), jejuno, íleon, cego, cólon ascendente e dois terços proximais do cólon transversal. O intestino posterior origina o terço distal do cólon transversal, o cólon descendente, cólon sigmoide e o reto. (6,11).

PADRONIZAÇÃO ÂNTERO-POSTERIOR DO TUBO DIGESTIVO

O processo de padronização é orquestrado essencialmente por duas famílias de FT, *Hox* e *ParaHox*, e pode ser dividido em duas fases, a primeira ocorrendo durante a gastrulação ou mesmo antes, e a segunda depois da formação da endoderme definitiva (12).

Foi provado que a endoderme recebe sinais de padronização antes ainda da morfogénese do tubo digestivo (8,27). De facto, existe assimetria AP tão precocemente quanto em e5.5-e6 na endoderme visceral (9), e diferenças regionais, com a expressão diferenciada de marcadores moleculares, podem ser detetadas na fase de gastrulação (e7.5) (13,14,28,29). Estas observações sugerem que a endoderme nesta fase está já subdividida em regiões distintas que originarão os intestinos anterior, médio e posterior. Deste modo, apesar da formação da EVA e da linha primitiva no início da gastrulação serem os primeiros sinais de polaridade AP, a formação do eixo AP parece iniciar-se mesmo antes da gastrulação (30). Além disso, a expressão destes marcadores mantém-se durante a formação do tubo digestivo (29), sugerindo que a sua expressão precoce permite prever os domínios de expressão numa fase mais avançada. De acordo com isto está o facto da posição das células progenitoras endodérmicas na linha primitiva de anterior para posterior refletir a sua posição AP no futuro (15).

Uma das moléculas chave, e mais precocemente envolvidas na padronização AP é Nodal. Foi mostrado que a inativação de Nodal provoca a diminuição da expressão do gene *Homeobox Hhex*, um marcador endodérmico anterior, e de *Shh*, um marcador da mesoendoderme anterior (16,30). Em fases mais tardias da gastrulação, as células na linha primitiva mais posterior estão sob influência de menores níveis de Nodal e tendem a contribuir para a endoderme posterior (13,14). Além disso, Nodal, através de um gradiente de exposição (9,21), regula também a produção de múltiplos FT, incluindo, entre outros, *Foxa2* e proteínas “*mix-like*” (9,12,14) que parecem ser necessários para especificar diferentes regiões da endoderme: embriões *Foxa2*^{-/-} exibem defeitos ao nível dos intestinos anterior e médio, enquanto que embriões deficientes em *Mix11* apresentam defeitos no intestino posterior (9,15,28).

Deste modo, a sinalização Nodal, além do papel na diferenciação mesoendodérmica, parece desempenhar um papel secundário na especificação anterior (16,30), ou seja, confere identidade regional anterior à endoderme recém-formada (13,14).

Depois da gastrulação, no entanto, as células endodérmicas *naïve* retêm plasticidade e não estão, ainda, destinadas à formação de um órgão específico (8,14,31). De facto, nesta fase precoce do desenvolvimento, a endoderme anterior (e7.5) em cultura com mesoderme posterior expressa marcadores posteriores e vice-versa (8).

Apesar de não estar determinada nesta fase final da gastrulação, a endoderme está padronizada em domínios moleculares A-P distintos, como demonstrado pela expressão anterior de Hhex, Foxa2 e Sox2, e Cdx (1, 2 e 4) posteriormente, necessários para o desenvolvimento do intestino anterior e posterior, respetivamente, bem como para o estabelecimento do limite entre estes (14,21,28,31,32). Esta diferenciação regional grosseira é progressivamente refinada ao ponto de que ao longo da somitogénese diversos FT marcam já os diversos territórios que originarão o esófago, estômago, fígado, duodeno, pâncreas e intestino delgado e grosso (22).

De facto, depois da formação do tubo digestivo primitivo, a endoderme é padronizada adicionalmente por um conjunto de sinais (instrutivos e permissivos) principalmente provenientes da mesoderme adjacente, que progressivamente subdividem a endoderme ao longo do eixo AP, primeiro nos domínios intestinais anterior, médio e posterior, e finalmente em órgãos primitivos (14,20,22,28,31). Foi demonstrado inclusivamente que a endoderme gástrica de embrião de galinha com 4 dias, quando cultivada com mesênquima duodenal, se diferencia em epitélio do tipo intestinal, o que sugere que o mesênquima é capaz de induzir o epitélio gástrico a diferenciar-se em epitélio intestinal (33).

No entanto, a endoderme por si só é também uma fonte de sinais de padronização, comprovada pelo envolvimento do FT Sox2 endodérmico, no estabelecimento da junção piloro-duodenal (31), bem como nos limites entre o esófago/estômago queratinizado anterior e o estômago glandular posterior (34), o que nos permite concluir que a informação posicional no tubo digestivo não é apenas

proveniente da endoderme ou mesoderme, mas sim que ambas possuem informação parcial que varia ao longo do desenvolvimento.

Além de Nodal, outras vias que parecem desempenhar um papel relevante na padronização AP do tubo digestivo incluem Cdx, Wnt, Fgf, Bmp, Sox, ácido retinóico (AR), Hedgehog, Hox, Barx1 e Runx3 (Figura 1).

Família Cdx

Os embriões mamíferos contêm três genes *Homeobox* relacionados com o *Caudal* de *Drosophila* com padrões de expressão sobrepostos na sua região posterior: *Cdx1*, *Cdx2* e *Cdx4* (35-37). Devido a esta sobreposição é provável que haja redundância funcional entre os genes Cdx e que algum grau de compensação possa ocorrer em deficiências dos seus membros (37). Tanto *Cdx1* como *Cdx2*, mas não *Cdx4*, são também expressos de maneira sobreposta no epitélio do intestino adulto humano, do duodeno até ao reto (4,36), e desempenham aí um papel no desenvolvimento, manutenção, proliferação e padronização ântero-posterior epitelial (38,39).

O membro da família *ParaHox* *Cdx2* é talvez o FT intrínseco mais importante na padronização e especificação intestinal (36,38,40). Em ratinhos a sua expressão inicia-se no dia e8.5 (36,41) predominantemente na endoderme posterior. Por volta do dia e12.5, é apenas expresso na endoderme intestinal, com um limite claro ao nível da junção intestino anterior – intestino médio (32,38), com uma expressão mais marcada na região que originará o cólon proximal, diminuindo em ambas as direções (32,38,39) (Figura 1). Em contraste, o seu gene *ParaHox* relacionado, *Cdx1*, só é expresso no embrião a partir do dia e12.5, com uma expressão em crescendo ao longo do eixo AP, mais intensa no cólon distal (Figura 1), e não parece ter um papel preponderante no desenvolvimento intestinal (35,36,38,39). Em contraste com evidência anterior (40), foi mostrado recentemente que a expressão de *Cdx1* não é afetada pela perda de *Cdx2* em ratinhos em e13.5. No entanto, mutantes nulos para *Cdx1* exibiram uma redução de expressão de *Cdx2*, consistente com uma regulação cruzada entre os membros Cdx (36).

Estudos *knockout in vivo* (32) e estudos de expressão aumentada (42) indicam que Cdx2 está envolvido na morfogénese e na diferenciação do epitélio intestinal, regulando a expressão de genes Hox (32), bem como de genes diferenciadores intestinais, entre os quais MUC2 (39,43), e a sua deficiência resulta na formação de mucosa gástrica em vez de intestinal (41). De facto, foi relatada a expressão de Sox2 na endoderme, e Barx1 na mesoderme, genes caracteristicamente gástricos (24,34,44,45), no intestino médio de embriões Cdx2^{+/-} e Cdx2^{-/-} (41). A expressão de Barx1 nestes embriões e a demonstração da expressão de genes intestinais, entre os quais Cdx2, na mucosa gástrica de mutantes nulos Barx1 (45), indicam a existência de uma ansa de feedback negativo entre Barx1 e Cdx2.

A deleção de Cdx2 em ratinhos afeta preponderantemente a formação e crescimento intestinal. Gao et al. mostraram que intestino deficiente em Cdx2, de facto, sofreu uma transformação anterior, para um epitélio do tipo pavimentoso característico do esófago (40), concordante com a ativação de um programa de diferenciação do intestino anterior na zona posterior do tubo digestivo, sugerindo que o Cdx2 normalmente reprime a diferenciação do intestino anterior no tubo digestivo posterior. Além disso foi também concluído que o Cdx2 é essencial para a expressão inicial e/ou manutenção subsequente de vários FT pró-intestinais, incluindo Cdx1. A ausência de Cdx1, apesar de em desacordo com um trabalho recente (36), vem de encontro a outros resultados (35) e sugere que a sua ativação está diretamente dependente de Cdx2, o que reflete a sua expressão sequencial na endoderme (40). No entanto, no mesmo trabalho, surpreendentemente, foi constatado que, perante a deficiência de Cdx2, o código Hox entérico primário manteve-se e, adicionalmente, a expressão de outros genes tais como Barx1 manteve-se inalterada o que suporta a ideia que o intestino deficiente em Cdx2, apesar de sofrer uma transformação de posterior para anterior, mantém ainda relativa identidade AP (40).

Noutro trabalho recente, Grainger et al. mostraram que a perda de Cdx2 em ratinhos no dia e13.5, ou seja numa fase mais tardia, provocou a transformação parcial do epitélio intestinal para uma identidade pilórica, com expressão aumentada de marcadores gástricos, entre os quais o Sox2, e diminuição do marcador intestinal IFABP (36), resultados em acordo com o estudo previamente citado (40) comprovando uma anteriorização do trato intestinal aquando da perda de Cdx2.

Em conjunto, estes estudos permitem concluir que a perda de Cdx2 afeta a padronização intestinal de uma forma dependente do tempo, com uma perda mais precoce a resultar numa transformação anterior mais marcada.

Através destes estudos, concluímos então que o Cdx2 é necessário, numa fase inicial, para estabelecer uma identidade posterior da endoderme e reprimir uma identidade anterior (40), e, numa fase mais tardia, para manter a identidade A-P (36,40), o que sugere que uma combinação de moléculas responsáveis pela padronização A-P, referidas adiante, entre as quais Wnt, Fgf, Bmp e AR, integrem a sua sinalização e regulem a atividade Cdx2 na endoderme, funcionando Cdx2 como um ponto de convergência destas vias (46,47) (Figura 2). De facto, os mecanismos pelos quais a expressão de Cdx2 é regulada parecem ser complexos e são ainda amplamente incompreendidos. Além do mais as diferentes vias de sinalização terão provavelmente diferentes efeitos sobre a expressão de Cdx2 em períodos diversos do desenvolvimento (1).

Tanto Cdx1 como Cdx2, além de expressos de forma restrita no epitélio do intestino delgado e cólon humanos, são também expressos ectopicamente em lesões de MI humana do estômago (43,48). A expressão ectópica de Cdx2 no estômago de ratinho resulta na transformação de mucosa gástrica em mucosa do tipo intestinal, ou seja, no desenvolvimento de MI, comprovada pela presença de células e genes específicos intestinais, alterações idênticas às observadas em MI humana, o que comprova a capacidade deste gene *homeobox* na especificação intestinal epitelial ectópica e o seu papel central na indução da MI (42,48). Tal como Cdx2, e mais importante que a demonstração da sua expressão, foi mostrado também que ratinhos transgénicos com expressão de Cdx1 no estômago desenvolvem MI (49).

A associação de Cdx1 e Cdx2 com a expressão da mucina MUC2 (43), marcadora de diferenciação intestinal (50), e a sua expressão aumentada em tecidos displásicos e neoplásicos gástricos (4), é outro ponto a favor da hipótese de que estes genes estão envolvidos na diferenciação intestinal durante a carcinogénese gástrica.

Concluindo, estes resultados sugerem que os genes Cdx, principalmente Cdx2, são essenciais para o estabelecimento da identidade intestinal (Figura 2), mas também sugerem um papel, através de

programas independentes, de Cdx1 e de Cdx2 na transdiferenciação da mucosa gástrica para um tipo intestinal característico da MI, apesar da manutenção da diferenciação intestinal parecer dependente da presença de Cdx2 (43).

Família Fgf

Dentro da família Fgf, o Fgf4 em especial parece ter um papel importante na padronização ântero-posterior do tubo digestivo, tanto durante a gastrulação como numa fase mais tardia. (8,27). Foi demonstrado que sinalização Fgf é necessária para a expressão normal dos três genes Cdx durante a fase de gástrula (46). No ratinho e galinha foi demonstrado que a endoderme que não recebe sinalização Fgf4 desenvolve características de intestino anterior, enquanto a endoderme mais posterior é progressivamente programada após exposição a concentrações mais altas deste FT, através da expressão de Cdx (Figura 2) e da inibição da expressão dos genes anteriores Hhex e Foxa2. A exposição da endoderme na fase tardia de gástrula ao Fgf4 resulta na expressão anterior de genes que normalmente são posteriores, tais como o Cdx e Pdx1 (8,27). Foi recentemente reportado que o Fgf2, e não Fgf4, poderá ser o principal sinalizador Fgf com função de padronização em células estaminais humanas (51).

Posto isto, parece razoável sugerir que o gradiente de expressão mesodérmica de Fgf iniciado na gastrulação possa estar envolvido no estabelecimento do domínio de expressão de Cdx2, com resultante especificação final da mucosa intestinal.

Família Bmp

As Bmp são proteínas de sinalização pertencentes à superfamília TGF- β cruciais para o normal desenvolvimento intestinal, contribuindo para a sua padronização, desenvolvimento e diferenciação (52,53). Experiências em *zebrafish*, *Xenopus* e galinha sugerem que, durante os estádios precoces de

desenvolvimento (gastrulação), a sinalização Bmp promove o desenvolvimento da endoderme posterior (52,54,55).

No intestino esta via de sinalização, através de Bmp2 e Bmp4, é uma mediadora chave na manutenção da diferenciação e da arquitetura do epitélio intestinal. Foi demonstrado que estes FT estão aumentados e ativos juntamente com Cdx2 na MI e regulam positivamente a sua expressão (Figura 2), bem como de MUC2, nas linhagens de células gástricas, através de vias canónicas, nomeadamente Smad4, um transdutor da sinalização Bmp (53).

Família Wnt

A sinalização Wnt é evidente precocemente no desenvolvimento gastrointestinal e em e6.5 é já regulada de forma diferenciada na endoderme visceral ao longo do eixo AP, sendo mais intensa no seu lado posterior do que no seu lado anterior (17).

Foi descoberto recentemente que a sinalização Wnt ativa Cdx2 precocemente na endoderme (Figura 2), levando a uma migração posterior da endoderme definitiva através da indução de um programa genético intestinal nas células endodérmicas anteriores (56). Mutantes duplos nulos Tcf1/4, em e8.5, não formam o PIP e perdem a expressão de marcadores da endoderme posterior (57).

Em sapos e *zebrafish*, a sinalização Wnt/ β -catenina, de forma semelhante ao Fgf, é necessária e suficiente para promover o desenvolvimento intestinal posterior e inibir o desenvolvimento anterior (14).

Mais tardiamente, a repressão da via de sinalização Wnt, incluindo Tcf1/Tcf4^{-/-} ou o ligando Wnt5a em ratinho, resulta num desenvolvimento intestinal incompleto com diminuição da expressão de Cdx2 e uma expansão posterior do marcador anterior Sox2, consistente com uma anteriorização do TGI (57), fenótipo muito semelhante à perda de Cdx2 em e13.5 (36). Pelo contrário, ativar Wnt mais anteriormente pode causar MI, semelhante à observada em humanos (28).

Endoderme derivada de células estaminais exposta a wnt3a aumenta a expressão de Cdx2 (18). Foi demonstrado ainda que a expressão de Wnt3a e Wnt5a está diminuída em resposta a diminuição de Cdx e que aumentando a expressão de Cdx aumenta a expressão dos genes Wnt (37), o que em conjunto com o facto de ratinhos sem expressão de Wnt3a e Cdx2 apresentarem fenótipos semelhantes (32) e com os resultados acima citados, sugere a existência de uma ansa de feedback positivo entre estas duas vias para o normal desenvolvimento posterior.

Muito recentemente foi demonstrado que a ativação da sinalização Wnt é suficiente para induzir a diferenciação intestinal a partir de endoderme derivada de células estaminais humanas e de ratinho (56), ao contrário de outro trabalho (7) onde foi necessária a expressão simultânea de sinais Wnt e Fgf para indução de diferenciação intestinal.

Concluimos então que a diferenciação de estruturas mais anteriores, tais como o estômago, requer a repressão da via Wnt (24,45), enquanto que o desenvolvimento do tubo posterior está dependente de Wnt (57).

Família Sox

FT gástricos, tais como os genes Sox, poderão estar também envolvidos no desenvolvimento de MI. Sox2 é normalmente expresso na mucosa gástrica, com expressão muito atenuada ou mesmo ausente no epitélio intestinal (34,44), mas a sua expressão está diminuída na MI (44), o que poderá indicar uma inibição bidirecional entre Sox2 e Cdx com um papel relevante na origem da MI. Além do mais, o esófago de ratinhos mutantes Sox2 expressa ectopicamente genes normalmente expressos no epitélio intestinal. No entanto não se observa aumento da expressão dos genes Cdx1 e Cdx2, o que sugere que apesar de haver uma libertação de repressão de genes glandulares, não há uma mudança de diferenciação de linhagem de esófago para intestino (34).

Outras vias de sinalização

O AR é importante na promoção da formação do intestino posterior (58), estimulando diretamente a expressão de genes Cdx (59) (Figura 2). Pelo contrário, o intestino anterior só se forma na ausência de AR (59).

No estômago a expressão de Shh, um membro da família Hedgehog, é reduzida pela infecção por *H. Pylori*, um fator desencadeante de MI, e está ausente na MI (20). Ratinhos *Shh*^{-/-} apresentam transformação intestinal do estômago (60), o que em conjunto sugere que Shh poderá estar envolvido no aparecimento da MI. No entanto, não foram observadas células caliciformes no epitélio, nem foi documentada expressão de Cdx2 nem de MUC2, e os marcadores gástricos permaneceram expressos, o que sugere que o Shh pode ser importante para restringir a expressão de marcadores gástricos mas não há evidência de MI, não se podendo excluir, no entanto, para já um papel de Sox2 na sua etiologia (20).

Mutações nos genes Hox indicam que estes são também necessários para o desenvolvimento do TGI: a expressão anterior do gene *Hoxa13* posterior resulta na transformação do estômago em epitélio intestinal (28), e a expressão anômala de *Hoxd13* no intestino médio de galinha causa o desenvolvimento de intestino posterior (6).

A especificação do estômago necessita do *Barx1*, um FT exclusivo da mesoderme gástrica. A perda de função de *Barx1* afeta profundamente a diferenciação gástrica, sem afetar a diferenciação intestinal, com a expressão de marcadores intestinais (*Cdx2*) ectopicamente ativados no estômago distal (24,45). A expressão de *Barx1* é transitória, ocorrendo apenas durante a organogénese, sendo deste modo, improvável que participe na manutenção da mucosa gástrica ou na prevenção da MI em adultos. No entanto, a MI pode resultar em parte de uma lesão induzida pela reativação de sinalização Wnt durante a vida adulta, quando *Barx1* não está presente para a inibir (24).

No ser humano, a expressão de *Runx3* está marcadamente diminuída na MI (61), e em ratinhos, células epiteliais gástricas *Runx3*^{-/-} diferenciam-se *in vivo* em células do tipo intestinal com expressão de *Cdx2*, o que poderá significar que a perda de *Runx3* poderá ser o evento desencadeador da

expressão de *Cdx2* no estômago com resultante diferenciação intestinal, e que na mucosa gástrica normal *Cdx2* será inibido direta ou indiretamente por *Runx3* (62).

Um estudo recente demonstrou a possível existência de *Pinin* como um regulador adicional da expressão de *Cdx2* (47).

REGULAÇÃO CRUZADA ENTRE AS VIAS DE SINALIZAÇÃO

A informação disponível até ao momento suporta um modelo em que fatores posteriorizantes como Cdx, Wnt, Fgf4 e Bmp, entre outros citados, progressivamente estabelecem regiões cada vez mais posteriores da endoderme. O modo como estas diversas vias de sinalização interagem entre si e, nomeadamente, como regulam a expressão de Cdx2, tanto na mucosa intestinal normal como em estados metaplásicos, isso sim, está amplamente por esclarecer. No entanto, várias interações moleculares são já evidentes.

Além da regulação de diversas vias sobre a expressão de Cdx2, como foi já explicitado, foi também já sugerida a existência de regulação cruzada entre os diversos FT. Foi demonstrado ser necessária atividade sinérgica em simultâneo das vias Wnt e Fgf para induzir a formação sustentada da linhagem posterior endodérmica com expressão de Cdx2 (7,46). Fgf4 e AR parecem também cooperar sinérgicamente na indução posterior da endoderme, estimulando a expressão de Cdx2 (59,63).

Outros FT endodérmicos, nomeadamente da família Sox (Sox2 e Sox9), contrabalançam o efeito destes FT posteriorizantes, sugerindo que a demarcação entre as células gástricas e intestinais possa envolver o balanço entre as ações antagonistas de Sox2 e destas vias, entre as quais a via Wnt (35,64). Realmente, parece claro que o antagonismo entre uma via Wnt/Cdx2 promotora intestinal e uma via Barx1/Sox2 determinam os limites entre o estômago e o intestino (31,41).

Outro possível mecanismo através do qual os diversos FT citados, incluindo Cdx2, controlam a identidade dos segmentos do TGI é através da regulação direta da expressão de genes Hox em domínios precisos ao longo do eixo AP (28), servindo os genes Hox para integrar toda a informação reguladora e conferir informação posicional ao longo do eixo boca-ânus (6).

Além das vias de sinalização citadas, múltiplas mutações somáticas específicas no epitélio metaplásico foram sugeridas como potenciais biomarcadores desta lesão, podendo ajudar a entender os processos subjacentes ao seu desenvolvimento, sendo alguns dos marcadores mais promissores até à data a presença de aneuploidia, ativação da telomerase, perda de heterozigotia de p53 e expressão aumentada de ciclina D1 (3,5).

CONCLUSÃO

O estudo do desenvolvimento intestinal, nomeadamente a nível molecular, é uma área de conhecimento ainda bastante limitada, mas com um grande potencial de gerar conhecimento acerca do desenvolvimento intestinal normal e metaplásico e, a partir daí, dar-nos capacidade de intervir na sua progressão.

Como foi possível constatar, os genes Cdx, nomeadamente Cdx2, parecem ser de facto os reguladores principais da diferenciação intestinal normal, bem como parecem estar largamente envolvidos no processo de transdiferenciação epitelial metaplásico. No entanto, o controlo da expressão genética quer ao longo do desenvolvimento intestinal quer na MI é bastante complexo e parece depender de várias famílias de moléculas de sinalização além de Cdx, entre as quais Fgf, Bmp e Wnt. De facto, apesar de complexo, o conhecimento até à data sugere que os genes envolvidos na diferenciação intestinal normal estão, de algum modo, envolvidos no desenvolvimento da MI. À medida que o conhecimento nesta área aumenta, no entanto, é cada vez maior o número de potenciais candidatos a desempenhar uma função neste processo e aumentam também os resultados contraditórios a este respeito, o que poderá ser um entrave à definição clara dos mecanismos envolvidos na MI.

Tendo em consideração que a MI se comporta como uma lesão precursora de displasia e neoplasia gástrica, são necessários estudos mais extensos sobre a origem molecular da MI se pretendermos prevenir o desenvolvimento desta neoplasia em indivíduos que possuam esta lesão e assim limitar as consequências nefastas deste processo neoplásico.

BIBLIOGRAFIA

1. Spence JR, Lauf R, Shroyer NF. Vertebrate intestinal endoderm development. *Dev Dyn* 2011;240:501-20.
2. Mesquita P, Raquel A, Nuno L, et al. Metaplasia--a transdifferentiation process that facilitates cancer development: the model of gastric intestinal metaplasia. *Crit Rev Oncog* 2006;12:3-26.
3. Gutierrez-Gonzalez L, Wright NA. Biology of intestinal metaplasia in 2008: More than a simple phenotypic alteration. *Dig Liv Dis* 2008;40:510-22.
4. Kang JM, Lee BH, Kim N, et al. CDX1 and CDX2 Expression in Intestinal Metaplasia, Dysplasia and Gastric Cancer. *J Korean Med Sci* 2011;26:647-53.
5. Busuttill RA, Boussioutas A. Intestinal metaplasia: A premalignant lesion involved in gastric carcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24:193-201.
6. McLin VA, Henning SJ, Jamrich M. The role of the visceral mesoderm in the development of the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 2009;136:2074-91.
7. Spence JR, Mayhew CN, Rankin SA, et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature* 2011;470:105-9.
8. Wells JM, Melton DA. Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers. *Development* 2000;127:1563-72.
9. Zorn AM, Wells JM. Molecular basis of vertebrate endoderm development. *Int Rev Cytol* 2007;259:49-111.
10. Sadler TW, Langman J. *Langman's medical embryology*. 11th ed. Baltimore, Md.: Lippincott William & Wilkins; 2009.
11. Schoenwolf GC, Larsen WJ. *Larsen's human embryology*. 4th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone/Elsevier; 2009.

12. Heath JK. Transcriptional networks and signaling pathways that govern vertebrate intestinal development. *Curr Top Dev Biol* 2010;90:159-92.
13. Lewis SL, Tam PP. Definitive endoderm of the mouse embryo: formation, cell fates, and morphogenetic function. *Dev Dyn* 2006;235:2315-29.
14. Zorn AM, Wells JM. Vertebrate endoderm development and organ formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2009;25:221-51.
15. Grapin-Botton A, Constam D. Evolution of the mechanisms and molecular control of endoderm formation. *Mechanisms of development* 2007;124:253-78.
16. Vincent SD, Dunn NR, Hayashi S, Norris DP, Robertson EJ. Cell fate decisions within the mouse organizer are governed by graded Nodal signals. *Genes & development* 2003;17:1646-62.
17. Marikawa Y. Wnt/beta-catenin signaling and body plan formation in mouse embryos. *Seminars in cell & developmental biology* 2006;17:175-84.
18. Cao L, Gibson JD, Miyamoto S, et al. Intestinal lineage commitment of embryonic stem cells. *Differentiation; research in biological diversity* 2011;81:1-10.
19. Kimura W, Alev C, Sheng G, Jakt M, Yasugi S, Fukuda K. Identification of region-specific genes in the early chicken endoderm. *Gene expression patterns : GEP* 2011;11:171-80.
20. van den Brink GR. Hedgehog signaling in development and homeostasis of the gastrointestinal tract. *Physiological reviews* 2007;87:1343-75.
21. Noah TK, Donahue B, Shroyer NF. Intestinal development and differentiation. *Experimental cell research* 2011;317:2702-10.
22. Grapin-Botton A, Melton DA. Endoderm development: from patterning to organogenesis. *Trends in genetics : TIG* 2000;16:124-30.
23. Rubin DC. Intestinal morphogenesis. *Curr Opin Gastroenterol* 2007;23:111-4.

24. Kim BM, Buchner G, Miletich I, Sharpe PT, Shivdasani RA. The stomach mesenchymal transcription factor Barx1 specifies gastric epithelial identity through inhibition of transient Wnt signaling. *Dev Cell* 2005;8:611-22.
25. Yeung TM, Chia LA, Kosinski CM, Kuo CJ. Regulation of self-renewal and differentiation by the intestinal stem cell niche. *Cell Mol Life Sci* 2011;68:2513-23.
26. Sancho E, Batlle E, Clevers H. Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:695-723.
27. Dessimoz J, Opoka R, Kordich JJ, Grapin-Botton A, Wells JM. FGF signaling is necessary for establishing gut tube domains along the anterior-posterior axis in vivo. *Mechanisms of development* 2006;123:42-55.
28. Grapin-Botton A. Antero-posterior patterning of the vertebrate digestive tract: 40 years after Nicole Le Douarin's PhD thesis. *The International journal of developmental biology* 2005;49:335-47.
29. Moore-Scott BA, Opoka R, Lin SC, Kordich JJ, Wells JM. Identification of molecular markers that are expressed in discrete anterior-posterior domains of the endoderm from the gastrula stage to mid-gestation. *Dev Dyn* 2007;236:1997-2003.
30. Lu CC, Robertson EJ. Multiple roles for Nodal in the epiblast of the mouse embryo in the establishment of anterior-posterior patterning. *Dev Biol* 2004;273:149-59.
31. Sherwood RI, Chen TY, Melton DA. Transcriptional dynamics of endodermal organ formation. *Dev Dyn* 2009;238:29-42.
32. Chawengsaksophak K, de Graaff W, Rossant J, Deschamps J, Beck F. Cdx2 is essential for axial elongation in mouse development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:7641-5.
33. Yasugi S, Mizuno T. Molecular analysis of endoderm regionalization. *Development, growth & differentiation* 2008;50 Suppl 1:S79-96.

34. Que J, Okubo T, Goldenring JR, et al. Multiple dose-dependent roles for Sox2 in the patterning and differentiation of anterior foregut endoderm. *Development* 2007;134:2521-31.
35. Benahmed F, Gross I, Gaunt SJ, et al. Multiple regulatory regions control the complex expression pattern of the mouse Cdx2 homeobox gene. *Gastroenterology* 2008;135:1238-47, 47 e1-3.
36. Grainger S, Savory JG, Lohnes D. Cdx2 regulates patterning of the intestinal epithelium. *Dev Biol* 2010;339:155-65.
37. Faas L, Isaacs HV. Overlapping functions of Cdx1, Cdx2, and Cdx4 in the development of the amphibian *Xenopus tropicalis*. *Dev Dyn* 2009;238:835-52.
38. Silberg DG, Swain GP, Suh ER, Traber PG. Cdx1 and Cdx2 expression during intestinal development. *Gastroenterology* 2000;119:961-71.
39. Guo RJ, Suh ER, Lynch JP. The role of Cdx proteins in intestinal development and cancer. *Cancer biology & therapy* 2004;3:593-601.
40. Gao N, White P, Kaestner KH. Establishment of intestinal identity and epithelial-mesenchymal signaling by Cdx2. *Dev Cell* 2009;16:588-99.
41. Stringer EJ, Pritchard CA, Beck F. Cdx2 initiates histodifferentiation of the midgut endoderm. *FEBS letters* 2008;582:2555-60.
42. Mutoh H, Hakamata Y, Sato K, et al. Conversion of gastric mucosa to intestinal metaplasia in Cdx2-expressing transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;294:470-9.
43. Almeida R, Silva E, Silva F, et al. Expression of the intestine-specific transcription factors, CDX1 and CDX2, in intestinal metaplasia and gastric carcinomas. *Gastroenterology* 2002;122:A519-A.
44. Tsukamoto T, Mizoshita T, Mihara M, et al. Sox2 expression in human stomach adenocarcinomas with gastric and gastric-and-intestinal-mixed phenotypes. *Histopathology* 2005;46:649-58.

45. Kim BM, Miletich I, Mao J, McMahon AP, Sharpe PA, Shivdasani RA. Independent functions and mechanisms for homeobox gene *Barx1* in patterning mouse stomach and spleen. *Development* 2007;134:3603-13.
46. Keenan ID, Sharrard RM, Isaacs HV. FGF signal transduction and the regulation of *Cdx* gene expression. *Dev Biol* 2006;299:478-88.
47. Joo JH, Taxter TJ, Munguba GC, et al. *Pinin* modulates expression of an intestinal homeobox gene, *Cdx2*, and plays an essential role for small intestinal morphogenesis. *Dev Biol* 2010;345:191-203.
48. Silberg DG, Sullivan J, Kang E, et al. *Cdx2* ectopic expression induces gastric intestinal metaplasia in transgenic mice. *Gastroenterology* 2002;122:689-96.
49. Mutoh H, Hakamata Y, Satoh K, Sugano K. *Cdx1*-induced intestinal metaplasia in the transgenic mouse stomach: Comparative study with *Cdx2* transgenic mice. *Gastroenterology* 2003;124:A91-A.
50. Reis CA, David L, Correa P, et al. Intestinal metaplasia of human stomach displays distinct patterns of mucin (*MUC1*, *MUC2*, *MUC5AC*, and *MUC6*) expression. *Cancer Res* 1999;59:1003-7.
51. Ameri J, Stahlberg A, Pedersen J, et al. *FGF2* specifies hESC-derived definitive endoderm into foregut/midgut cell lineages in a concentration-dependent manner. *Stem Cells* 2010;28:45-56.
52. De Santa Barbara P, Williams J, Goldstein AM, et al. Bone morphogenetic protein signaling pathway plays multiple roles during gastrointestinal tract development. *Dev Dyn* 2005;234:312-22.
53. Barros R, Pereira B, Duluc I, et al. Key elements of the BMP/SMAD pathway co-localize with *CDX2* in intestinal metaplasia and regulate *CDX2* expression in human gastric cell lines. *The Journal of pathology* 2008;215:411-20.
54. Tiso N, Filippi A, Pauls S, Bortolussi M, Argenton F. BMP signalling regulates anteroposterior endoderm patterning in zebrafish. *Mechanisms of development* 2002;118:29-37.

55. Wills A, Dickinson K, Khokha M, Baker JC. Bmp signaling is necessary and sufficient for ventrolateral endoderm specification in *Xenopus*. *Dev Dyn* 2008;237:2177-86.
56. Sherwood RI, Maehr R, Mazzoni EO, Melton DA. Wnt signaling specifies and patterns intestinal endoderm. *Mechanisms of development* 2011;128:387-400.
57. Gregorieff A, Grosschedl R, Clevers H. Hindgut defects and transformation of the gastrointestinal tract in *Tcf4(-)/Tcf1(-)* embryos. *The EMBO journal* 2004;23:1825-33.
58. Duester G. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell* 2008;134:921-31.
59. Bayha E, Jorgensen MC, Serup P, Grapin-Botton A. Retinoic acid signaling organizes endodermal organ specification along the entire antero-posterior axis. *PloS one* 2009;4:e5845.
60. Ramalho-Santos M, Melton DA, McMahon AP. Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Development* 2000;127:2763-72.
61. Li QL, Ito K, Sakakura C, et al. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell* 2002;109:113-24.
62. Fukamachi H, Ito K, Ito Y. *Runx3(-)* gastric epithelial cells differentiate into intestinal type cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;321:58-64.
63. Johannesson M, Stahlberg A, Ameri J, Sand FW, Norrman K, Semb H. FGF4 and retinoic acid direct differentiation of hESCs into PDX1-expressing foregut endoderm in a time- and concentration-dependent manner. *PloS one* 2009;4:e4794.
64. Blache P, van de Wetering M, Duluc I, et al. SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes. *The Journal of cell biology* 2004;166:37-47.

FIGURAS

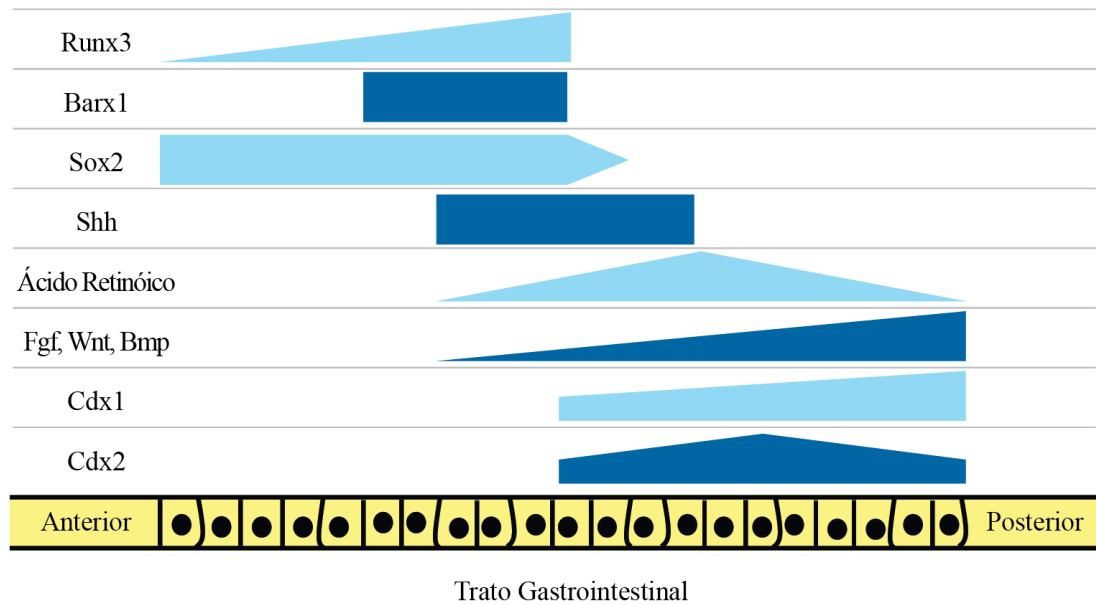


Figura 1 – Localização de vários genes com um papel na padronização ântero-posterior durante o desenvolvimento normal do trato gastrointestinal. É evidenciada a sobreposição da expressão de vários genes, tanto a nível anterior como posterior, mas é notória a existência de um gradiente ântero-posterior de expressão com alguns genes restritos ao trato gastrointestinal anterior (Sox2, Barx1 e Runx3) e outros restritos ao trato posterior (Cdx1 e 2, Fgf, Wnt, Bmp e Ácido Retinóico).

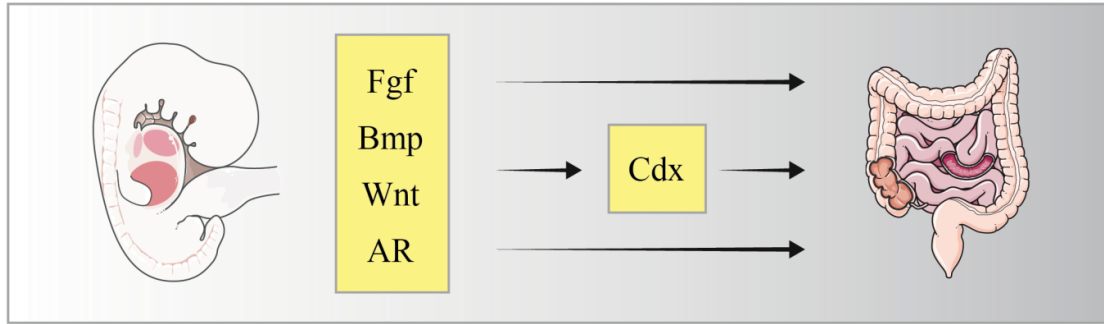


Figura 2 – Fatores de transcrição envolvidos no processo de diferenciação intestinal. Note que as diversas vias de sinalização envolvidas podem, por um lado, regular diretamente este processo ou por outro lado atuar sobre Cdx, funcionando este como um ponto de convergência das diversas vias de sinalização.

ANEXOS

Normas de publicação da revista “Arquivos de Medicina”.

Instruções aos Autores

Estas instruções seguem os "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (disponível em URL: 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).

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 χ^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 que 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 parentesis. 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
4200 – 319 Porto, Portugal

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 duma 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.