

Galectina-3 em tumores de próstata: imuno-histoquímica e análise digital de imagens

Primeira submissão em 29/06/06
Última submissão em 15/09/06
Aceito para publicação em 24/10/06
Publicado em 20/12/06

Galectin-3 in prostatic tumours: immunohistochemistry and digital image analysis

Jorge Luiz Silva Araújo-Filho^{1,2}; Mario Ribeiro de Melo-Júnior^{1,3}; Consuelo Antunes Barreto Lins⁴; Romero Antunes Barreto Lins¹; Marcos Cezar Feitosa de P. Machado¹; Luiz Bezerra de Carvalho-jr¹; Nicodemus Teles de Pontes Filho^{1,2}

unitermos	resumo
Próstata	<p>A imuno-histoquímica é uma técnica de grande ajuda no diagnóstico de doenças da próstata, incluindo os tumores. De igual importância, a análise digital de imagens vem sendo cada vez mais utilizada em estudos de alterações na próstata. O presente estudo teve como objetivo quantificar morfometricamente a expressão da galectina-3 através da imuno-histoquímica em tecidos de próstata normal (PN), hiperplasia benigna da próstata (HPB) e adenocarcinoma prostático (AP). Fragmentos cirúrgicos de tecido prostático com AP ($n = 10$), HPB ($n = 12$) e PN ($n = 10$) foram fixados em formalina, submetidos à rotina histológica e embebidos em parafina. Foram feitos cortes histológicos ($4\mu\text{m}$) montados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina (HE) para confirmar o diagnóstico. As amostras teciduais selecionadas foram incubadas com anticorpo monoclonal antigalectina-3 por uma hora em temperatura ambiente (37°C) e então incubadas com um anticorpo secundário. A revelação foi realizada após incubação com diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio. A análise morfométrica foi realizada mediante uma estação de análise digital de imagens, que consiste num microscópio óptico acoplado a uma câmera digital ligada a um computador equipado com o software de análise OPTIMAS®. Nas células de adenocarcinoma foi observada diminuição significativa na marcação ($p < 0,001$) da imuno-histoquímica para galectina-3. A partir da análise digital de imagens das áreas médias marcadas obtivemos os seguintes resultados: HPB ($875,9 \pm 52,1\mu\text{m}^2$), AP ($120,2 \pm 23,3\mu\text{m}^2$) e PN ($238,4 \pm 27,6\mu\text{m}^2$). Os diferentes perfis de expressão da galectina-3 diferenciaram as células neoplásicas da próstata de células normais e demonstraram significativas alterações na expressão da galectina-3 nas lesões tumorais investigadas.</p>
Galectina-3	
Análise digital de imagens	
Tumor	

abstract key words

Immunohistochemistry helps pathologists in the diagnosis of prostatic diseases, mainly carcinomas. Equally important, digital image analysis is being increasingly used to study alterations in the prostate. The present work aims to morphometrically quantify the immunostain of galectin-3 expressed in normal prostate (NP), benign hyperplasia (BH) and prostatic adenocarcinoma (PA) in humans. Immunohistochemistry was developed using monoclonal anti-galectin-3 antibody. Surgical specimens from different patients with BH ($n = 12$), PA ($n = 10$) and NP ($n = 10$) were fixed in formalin, processed and embedded in paraffin. Hematoxylin and eosin staining was used to confirm the diagnosis. Tissue slices ($4\mu\text{m}$) were incubated with anti-galectin-3 antibody solution for one hour at room temperature and then incubated with a secondary anti-body conjugated to peroxidase (30 minutes). The stain pattern was visualized with diaminobenzidine (DAB) and hydrogen peroxide. Image analysis was carried out using a workstation consisting of a standard light microscope equipped with a digitalizing camera connected to a desktop personal computer. Image storage and retrieval was managed using the OPTIMAS® software system. For prostatic adenocarcinoma cells a significant decreased ($p < 0.001$) staining pattern for galectin-3 was observed. Computer image analysis detected stained areas of atypic prostatic cells: BH ($875.9 \pm 52.1\mu\text{m}^2$), PA ($120.2 \pm 23.3\mu\text{m}^2$) and NP ($238.4 \pm 27.6\mu\text{m}^2$). The different patterns of galectin-3 expression distinguished the neoplastic cells from normal prostatic ones and significant alterations in the galectin-3 expression into the studied tumor lesions.

Prostate
Galectin-3
Digital image analysis
Tumour

1. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).
2. Mestrado em Patologia pelo Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFPE.
3. Associação Caruaruense de Ensino Superior (ASCES).
4. Chefe do Laboratório de Patologia do Hospital Oswaldo Cruz, Universidade de Pernambuco (UPE).
Trabalho desenvolvido no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE).

Introdução

Neoplasias são desordens do crescimento e da diferenciação celular que se manifestam como tumores formados por uma massa de células atípicas, resultantes de uma série de mudanças bioquímicas no ambiente celular⁽⁴⁾.

A fim de mapear alterações específicas que ajudem o entendimento da progressão dos tumores, diversos trabalhos têm utilizado histoquímica e imuno-histoquímica de proteínas relacionadas a certas lesões tumorais^(14, 19, 49).

As galectinas vêm sendo largamente utilizadas como ferramentas imuno-histoquímicas para descrever alterações na superfície das células tumorais. Essas alterações são associadas ao crescimento de células tumorais na indução de apoptose ou metástase^(9, 12).

Alterações na expressão de glicoconjugados são frequentemente observadas em tumores, entre os diversos distúrbios celulares que resultam em neoplasias. Apesar disso, estudos acerca das alterações na glicosilação celular em determinados estágios da carcinogênese prostática são escassos⁽⁶⁾.

Nas neoplasias prostáticas, a análise histopatológica tem grande relevância clínica. Exames histológicos e sorológicos descrevem aspectos muito importantes, possibilitando o monitoramento da evolução da doença⁽⁴⁹⁾. Contudo, os métodos imuno-histoquímicos, quando analisados de forma qualitativa, têm apresentado grande disparidade e variabilidade de resultados entre diferentes observadores. Assim, a fim de prover uma escala numérica e reproduzível dos padrões de marcação dos tecidos, aumentando a sensibilidade e o controle de qualidade das análises, tem-se buscado cada vez mais refinamentos tecnológicos através de métodos morfométricos automatizados^(30, 37).

A análise digital de imagens somada aos novos métodos da biologia molecular vem sendo cada vez mais utilizada no estudo das neoplasias da próstata^(8, 15). A reconstrução tridimensional microscópica do adenocarcinoma prostático tem sido cogitada como nova ferramenta para auxiliar o prognóstico e o diagnóstico desse tipo de tumor⁽³⁾. A interpretação dos resultados das técnicas histoquímicas somada aos métodos computacionais de análise de imagens está sendo bastante útil, especialmente nos casos onde as suspeitas clínicas de câncer prevalecem depois de biópsias com resultados negativos pelos métodos tradicionais⁽²⁷⁾.

Apesar de todas as inter-relações feitas de imuno-histoquímica com galectinas e células tumorais, existem poucos trabalhos demonstrando a eficiência do emprego

dessa técnica na marcação de lesões tumorais de próstata, benignas ou malignas. Parece haver ainda muitas aplicações reservadas para esse promissor campo de investigação.

Assim, este estudo objetiva avaliar as diferenças entre lesões benignas e malignas da próstata refletidas na sua expressão de carboidratos através da imuno-histoquímica com a galectina-3 e análise computadorizada de imagens.

Metodologia

Seleção de casos

Foram escolhidos blocos de parafina contendo fragmentos de tecido prostático anteriormente diagnosticados com adenocarcinoma prostático ($n = 10$) ou hiperplasia prostática benigna (HPB, $n = 12$), dos arquivos do setor de patologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), órgão suplementar da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), e de um laboratório particular do Recife. Para controle, foram utilizados fragmentos de próstata ($n = 10$) sem distúrbios de natureza anatômica ou funcional, recolhidos do Serviço de Verificação de Óbito (SVO) da Universidade Federal de Pernambuco. Todas as amostras foram oriundas de homens com idades entre 45 e 80 anos (média = 62,2 anos).

O protocolo experimental desenvolvido no presente trabalho foi submetido e aprovado pelo comitê de ética de pesquisas envolvendo seres humanos da Universidade Federal de Pernambuco (Centro de Ciências Biológicas [CCB/UFPE], ofício 155/2005).

Processamento histológico

Os fragmentos teciduais selecionados para controle foram fixados em formalina a 10%, submetidos à rotina histológica e incluídos em parafina; em seguida confeccionaram-se os blocos. De todos os blocos foram obtidos cortes com 4µm de espessura, montados em lâminas histológicas silanizadas, coradas por hematoxilina e eosina e analisadas por um patologista (C.A.B.L.), confirmando a hipótese clínica de acordo com os achados histopatológicos. Para discriminação dos tumores foi empregada a classificação da Organização Internacional de Classificação Histológica de Tumores (Heenan *et al.*, 1996).

Imuno-histoquímica para galectina-3

Foi testada a imunorreatividade da antigalectina-3 conjugada a peroxidase (Sigma, USA) utilizando o protocolo desenvolvido por Hsu *et al.* (1981). Os tecidos foram des-

parafinizados em xilol e hidratados em álcool (70%-100%). As lâminas com tecidos prostáticos (4 μ m) foram incubadas com tampão citrato a 100°C por 30 minutos sob vapor úmido, lavadas (por cinco minutos) com solução tampão salina de fosfato (PBS) e incubadas com soro de carneiro liofilizado (a fim de evitar reações cruzadas), em seguida incubadas com peróxido de hidrogênio por cinco minutos e lavadas normalmente com PBS, sendo incubadas com uma solução contendo anticorpo monoclonal antigalectina-3 (na diluição 1:400) por 30 minutos, em temperatura ambiente (37°C). Em seguida, os tecidos foram incubados com anticorpo secundário biotilado (Kit LSAB DAKO/USA). A revelação do anticorpo foi obtida através da reação da enzima peroxidase visualizada pela incubação dos tecidos em uma solução contendo diaminobenzidina (DAB + H₂O₂). Os cortes foram contracolorados com hematoxilina e analisados em microscópio óptico (Olympus BH-2, Japão).

Análise computadorizada de imagens

Imagens digitais foram capturadas das lâminas histológicas com um sistema de videocâmera acoplado a um microscópio óptico (Olympus BH-2), já utilizado com sucesso em análises diagnósticas⁽³¹⁾. O sistema interativo de análise de imagens utiliza Software OPTIMAS™ e câmera digital CCBBW 410 (Samsung), disponíveis no Departamento de Patologia da UFPE.

Os perfis de marcação da imuno-histoquímica para galectina-3 (magnificação 200x) revelados pela reação do DAB + peroxidase foram captados pelo ajuste do contraste do nível de cinza (*gray value*). A partir da captura das imagens dos tecidos marcados com a galectina-3 padronizou-se a margem de variação (*threshold range*).

O parâmetro morfométrico adotado foi a área média total (μm^2) composta pelo somatório das estruturas citoplasmáticas marcadas (perfil de marcação da imuno-histoquímica para galectinas-3) por campo captado (área de 12.234 μm^2) na lâmina histológica. A análise quantitativa das células marcadas foi realizada por meio de sistema automático, estudando-se cinco campos em cada caso.

Para minimizar distorções nos valores das medições devido à presença de células não-marcadas, aplicou-se um fator de correção (FC) de acordo com a equação $FC = s/S$, onde *s* é o valor da área superficial marcada e *S*, a área total medida⁽⁴⁵⁾.

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando os testes de Tukey e *t* de Student para um nível de significância ($p < 0,05$).

Resultados

No presente estudo foi identificada uma expressão citoplasmática da galectina, principalmente nos casos de HPB (**Figura 1**) e tecido normal (**Figura 2**).

Nossos resultados demonstraram que ocorrem alterações significativas nos padrões de expressão da proteína galectina-3 nas células do epitélio prostático neoplásico maligno (adenocarcinoma) (**Figura 3**) indicando uma redução de 50,41% quando em comparação com o epitélio secretor normal (**Tabela 1**).

Quanto ao sistema computadorizado de imagens utilizado (Sistema OPTIMAS® 6.1), pode-se observar que as diferentes etapas desde captura (**Figura 4**), processamento (**Figura 5**) e análise morfométrica das imagens (**Figura 6**) foram executadas no mínimo espaço de tempo (20 minutos) para cada lâmina analisada, o que demonstra que, após a calibração inicial do equipamento, o método proposto não se configura uma técnica muito laboriosa.

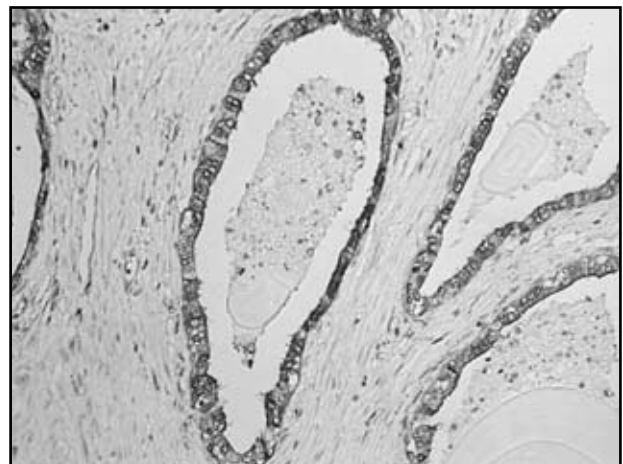


Figura 1 – Perfil da galectina-3 em tecido com hiperplasia prostática benigna (magnificação 200x)

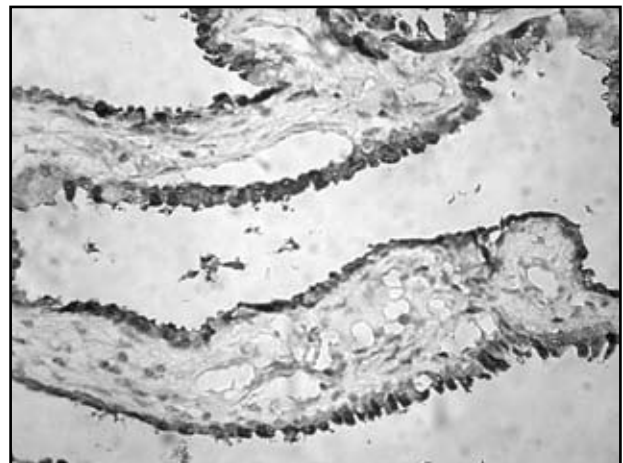


Figura 2 – Tecido prostático normal evidenciando galectina-3 nas células glandulares (magnificação 200x)

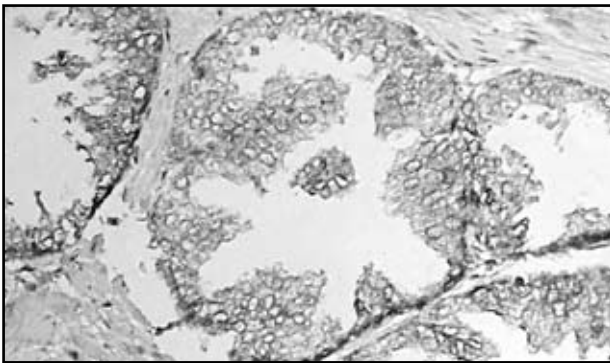


Figura 3 – Imuno-histoquímica para galectina-3 em tecido prostático com adenocarcinoma (magnificação 200x)

Área média de tecidos normais e tumorais prostáticos marcados através de imuno-histoquímica para galectina-3

Tabela 1

Tecido	Área média (µm ²)
Hiperplasia prostática benigna	875,9 ± 52,1*
Adenocarcinoma prostático	120,2 ± 23,3*
Próstata normal	238,4 ± 27,6

*p < 0,001.

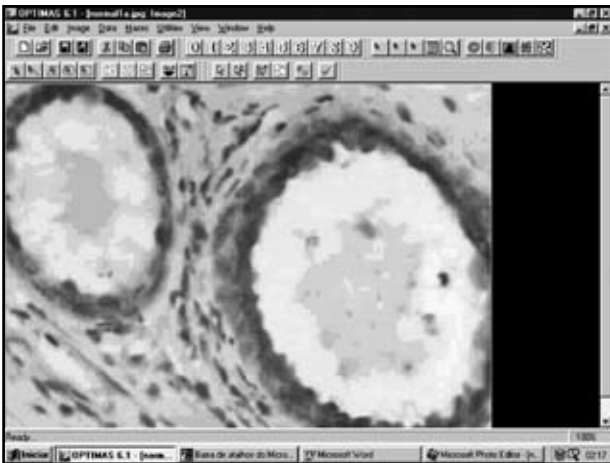


Figura 4 – Imagem da tela do programa de análise de imagens (OPTIMAS 6.1), durante a captura (área total do campo = 12.234µm²)

Discussão

Mudanças qualitativas e quantitativas nos componentes glicoprotéicos das membranas celulares são altamente significativas no desenvolvimento e na progressão de muitos processos neoplásicos⁽⁵⁰⁾. Em células neoplásicas o aumento no conteúdo e/ou na expressão de carboidratos superficiais tem sido amplamente documentado através de histoquímica e imuno-histoquímica^(20, 44). As galectinas,

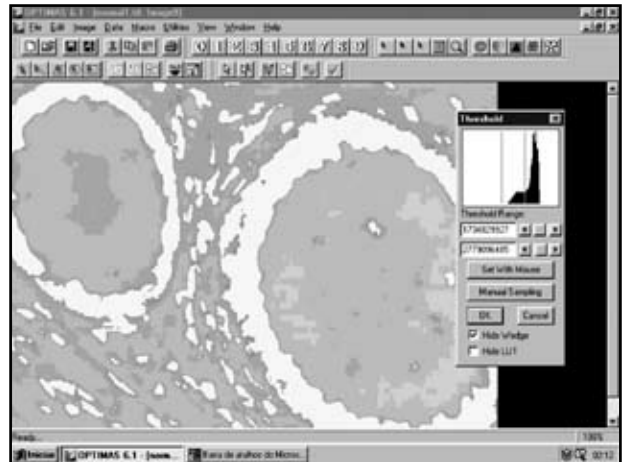


Figura 5 – Imagem da tela do programa de análise de imagens (OPTIMAS 6.1), ajuste do contraste (Caixa de diálogo à direita)

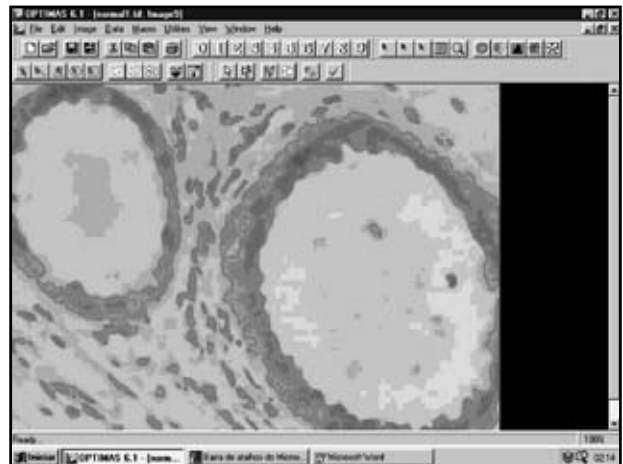


Figura 6 – Imagem da tela do programa de análise de imagens (OPTIMAS 6.1), área média de células marcadas (Áreas teciduais marcadas)

particularmente, estão sendo testadas como ferramentas sensíveis, estáveis e de fácil utilização para distinguir células transformadas e não-transformadas^(4, 5, 10, 48).

As galectinas são observadas em vários tipos de células e tecidos, e diversas funções são descritas para elas. As galectinas têm recebido cada vez mais atenção científica devido às suas diversas funções, não só na glicobioquímica, mas também na medicina, com possível ação farmacológica. A mais estudada é a galectina-3, uma proteína com diversos papéis biológicos.

No presente trabalho, a redução significativa nos padrões de expressão da galectina-3 em adenocarcinoma prostático corrobora os resultados de trabalhos recentes que relatam no câncer de próstata uma expressão reduzida da galectina-3 à medida que ocorre a progressão da doença⁽¹¹⁾. Em contrapartida, há maior expressão dessa proteína em fragmentos de tecido normal quando comparados à contraparte maligna⁽⁴⁸⁾.

Muitas galectinas ainda necessitam ser mais precisamente determinadas, o que demonstra que estudos sobre a expressão tecidual ou a localização intracelular da galectina-3 são importantes no entendimento do comportamento de alguns cânceres^(22, 35, 43, 48).

Em 1986, Gabius *et al.* publicaram o primeiro trabalho relatando a expressão da galectina-3 no carcinoma de mama. Após essa descoberta, trabalhos preliminares comparando a expressão da galectina-3 em carcinoma de cólon com o tecido normal adjacente foram realizados^(24, 26, 42).

Estudos posteriores tiveram como objetivo avaliar a expressão imuno-histoquímica da galectina-3 em lesões cancerígenas, como em melanoma^(40, 47), fibrossarcoma^(1, 39, 40), células do tumor pancreático⁽⁴¹⁾, adenocarcinoma⁽²³⁾, leucemia^(7, 29), câncer de cólon⁽¹⁷⁾, de próstata^(10, 33), e de mama^(25, 29).

Várias evidências têm demonstrado a importância das interações de células cancerígenas e resíduos de carboidratos durante a progressão do câncer^(39, 48), sugerindo a existência de grande número de moléculas envolvidas nesse evento biológico.

As glicoproteínas e os carboidratos da superfície celular têm papel fundamental na interação célula/célula, e mudanças nesses glicoconjugados nas células cancerosas aparentemente estão associadas à adesão celular alterada e ao desenvolvimento das propriedades invasivas do tumor⁽³²⁾.

Chan⁽⁶⁾ também demonstrou que alfa e betagalactosídeos e o ácido siálico contidos nos glicoconjugados são expressos pelas células prostáticas neoplásicas. Pode-se constatar que, em geral, quanto mais anaplásica (desdiferenciada) torna-se uma célula, mais intensa é a sua marcação imuno-histoquímica por determinadas galectinas, o que indica que a distribuição e a natureza dos glicoconjugados superficiais foram alteradas⁽⁴⁴⁾.

Está claro que a galectina-3 possui diversas funções na patogenia do câncer, na proliferação e na disseminação das metástases. Além disso, foram encontradas alterações não somente na expressão membranar da galectina-3, mas também na sua distribuição intracelular em determinados celulares^(10, 48).

Nas amostras estudadas neste trabalho, foi constatado aumento médio de 367,4% quando em comparação com a expressão da galectina-3 entre tecidos com HPB e tecidos prostáticos normais, o que corrobora estudos anteriores^(4, 5, 10, 48).

É interessante notar que a localização citoplasmática da galectina-3 está relacionada com eventos inibidores da

progressão tumoral, visto que sua localização celular parece variar durante a carcinogênese^(4, 5, 22, 36, 48). Entretanto, a transformação maligna de células da tireóide é acompanhada de uma concentração intensa de galectina-3 com perfil exclusivamente membranar⁽³⁴⁾.

Diversos trabalhos têm demonstrado comportamentos antagônicos no que se refere à expressão de galectinas em lesões prostáticas^(4, 5, 10, 18). No trabalho de Ellerhorst⁽¹⁰⁾ a galectina-1 foi expressa nos fragmentos de próstata normal, neoplasia intra-epitelial prostática e adenocarcinoma. Entretanto, a galectina-3 apresentou expressão diminuída em adenocarcinoma e metástases do câncer de próstata em comparação com o tecido normal e o HPB. Esse resultado confirma os dados obtidos por este estudo quando comparamos os casos de adenocarcinoma prostático com tecido normal e lesão benigna (HPB).

De acordo com os dados encontrados neste estudo pode-se sugerir que a diminuição na expressão da galectina-3 está associada à progressão do câncer de próstata. Contudo, são necessários mais estudos principalmente devido ao fato de que o aumento na expressão da galectina-3 em alguns tecidos e sua diminuição em outros indica sua diferente função nas diferentes patologias nos tecidos, ora agindo como fator de desenvolvimento tumoral, ora protegendo contra a progressão do tumor.

Tanto na prática clínica como em trabalhos experimentais é de fundamental importância a utilização de métodos para quantificar parâmetros relevantes observados na formação de tecido tumoral. Alguns métodos morfométricos semiquantitativos têm sido utilizados, porém demandam maior tempo, são trabalhosos e os resultados não são precisos. Atualmente é possível obter determinação quantitativa através de análise digital de imagens. Esse método tem sido altamente validado devido a resultados precisos quando comparado aos métodos de *score* semiquantitativos e/ou descritivos⁽²⁾.

A partir dos resultados da análise morfométrica utilizando o sistema de análises OPTIMAS™ 6.1, pode-se constatar a eficiência desse sistema para avaliar tecidos marcados com a técnica de imuno-histoquímica.

Todavia existem algumas limitações, como padronização (calibração), alto preço do equipamento e longo período de treinamento, que podem ser as causas da lenta implantação dessa metodologia nos laboratórios de patologia, tanto para uso na rotina histológica como para utilização em imuno-histoquímica de tecidos com lesões tumorais⁽²⁾.

Poucos trabalhos têm empreendido a utilização de métodos morfométricos computadorizados para o estudo

de distúrbios morfológicos da próstata^(3, 8, 15). Entretanto, aqueles que o fazem relatam os potenciais ganhos para o entendimento da carcinogênese prostática, principalmente como um instrumento de relevante valor prognóstico.

A quantificação morfométrica das lesões tumorais enfrenta algumas dificuldades, como a grande variedade histológica, a etiologia e a evolução natural da doença, a distribuição e a composição bioquímica bastante variável dos tumores⁽²⁾.

Dessa forma, de acordo com os dados qualitativos (imuno-histoquímica) e quantitativos (análise de imagens) obtidos, pode-se constatar que as galectinas podem servir como importantes sinalizadores das alterações bioquímicas específicas nas células, com isso auxiliando na distinção entre lesões tumorais benignas e malignas da próstata.

Conclusões

A partir dos resultados obtidos conclui-se que houve redução estatisticamente significativa na expressão tecidual de galectina-3 em células do adenocarcinoma prostático (50,41%) quando comparadas ao tecido normal.

Todas as amostras de hiperplasia prostática benigna apresentaram aumento significativo na expressão celular da galectina-3 (367,4%) quando comparadas com a contraparte maligna e o tecido normal.

O sistema de análise de imagens utilizado (OPTIMAS™ 6.1) demonstrou ser ferramenta eficiente na quantificação da expressão citoplasmática da galectina-3 pela técnica de imuno-histoquímica.

Referências

1. AGRWAL, N.; WANG, J. L.; VOSS, P. G. Carbohydrate-binding protein 35. Levels of transcription and mRNA accumulation in quiescent and proliferating cells. *J Biol Chem*, v. 264, p. 17236-42, 1989.
2. BARBOSA-JÚNIOR, A. A. Morphological computer-assisted quantitative estimation of stained fibrous tissue in liver sections: applications in diagnosis and experimental research. *J Bras Patol*, v. 37(3), p. 197-200, 2001.
3. BOAG, A. H.; KENNEDY, L. A.; MILLER, M. J. Three-dimensional microscopic image reconstruction of prostatic adenocarcinoma. *Arch Pathol Lab Med*, v. 125(4), p. 562-6, 2001.
4. CALIFICE, S. et al. Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs. tumor promotion of cytoplasmic galectin-3. *Oncogene*, v. 23, p. 7527-36, 2004a.
5. CALIFICE, S.; CASTRONOVO, V.; VAN DEN BRULE, F. Galectin-3 and cancer (Review). *Int J Oncol*, v. 25(4), p. 983-92, 2004b.
6. CHAN, F. L.; CHOI, H. L.; HO, S. M. Analysis of glycoconjugate patterns of normal and hormone-induced dysplastic noble rat prostates and an androgen-independent noble rat prostate tumor by lectin and protein blotting. *Prostate*, v. 46(1), p. 21-32, 2001.
7. CHERAYIL, B. J. et al. Molecular cloning of a human macrophage lectin specific for galactose. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 87, p. 7324-8, 1990.
8. DANIELSEN, H. E.; KILDAL, W.; SUBDO, J. Digital image analysis in pathology: exemplified in prostatic cancer. *Tidsskr Nor Laeg*, v. 120(4), p. 479-88, 2000.
9. DUMIC, J.; DABELIC, S.; FLÖGEL, M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta*, v. 1760, n. 4, p. 616-35, 2006.
10. ELLERHORST, A. et al. Galectin-1 and galectin-3 expression in human prostate tissue and prostate cancer. *Urol Res*, v. 27, p. 362-7, 1999.
11. ELLERHORST, J. et al. Differential expression of endogenous galectin-1 and galectin-3 in human prostate cancer cell lines and effects of overexpressing galectin-1 on cell phenotype. *Int J Oncol*, v. 14, p. 217-24, 2002.
12. ELOLA, M. T. et al. Galectin-1 receptors in different cell types. *J Biomed Sci*, v. 12(1), p. 13-29, 2005.
13. EUSEBI, V. et al. Transcontinental consults in surgical pathology via the internet. *Hum Pathol*, v. 28, p. 13-6, 1997.
14. FAGGIANO, A. et al. Differential expression of galectin 3 in solid cell nests and C cells of human thyroid. *J Clin Pathol*, v. 56, p. 142-3, 2003.
15. FELLEPA, E. J. et al. Three-dimensional ultrasound analysis of the prostate. *Molecular Urology*, v. 4(3), p. 133-9, 2000.
16. FIGUERÊDO-SILVA, J. et al. Esquistossomose mansônica experimental: estudo morfométrico e experimental das células calciformes intestinais. *An Fac Med Univ Fed Pernamb*, v. 44, p. 21-5, 1999.
17. FODDY, L.; STAMATOGLU, S. C.; HUGHES, R. C. An endogenous carbohydrate-binding protein of baby hamster kidney (BHK21 C13) cells. Temporal changes in cellular expression in the developing kidney. *J Cell Sci*, v. 97, p. 139-48, 1990.
18. FRANCOIS, C. et al. Galectin-1 and galectin-3 binding pattern expression in renal cell carcinomas. *Am J Clin Pathol*, v. 112, p. 194-203, 1999.
19. HELIN, H. O. et al. Virtual microscopy in prostate histopathology: simultaneous viewing of biopsies stained sequentially with hematoxylin and eosin, and methylacetyl-coenzyme a racemase/p63 immunohistochemistry. *J Urol*, v. 175, p. 495-9, 2006.
20. HERLING, M. et al. Glycohistochemical monitoring of chemically induced sarcomas at different stages of tumorigenesis. *In Vivo*, v. 14(4), p. 499-506, 2000.
21. HERMAN, C. J. Image cytometry in pathology. *Hum Pathol*, v. 27, p. 435-6, 1996.

22. HONJO, Y. et al. Expression of cytoplasmic galectin-3 as a prognostic marker in tongue carcinoma. *Clin Cancer Res*, v. 6, p. 4635-40, 2000.
23. INUFUSA, H. et al. Role of galectin-3 in adenocarcinoma liver metastasis. *Int J Oncology*, v. 19, p. 913-9, 2001.
24. IRIMURA, T. et al. Increased content of an endogenous lactose-binding lectin in human colorectal carcinoma progressed to metastatic stages. *Cancer Res*, v. 51, p. 387-93, 1991.
25. LE MARER, N.; HUGHES, R. C. Effects of the carbohydrate-binding protein galectin-3 on the invasiveness of human breast carcinoma cells. *J Cell Physiol*, v. 168, p. 51-8, 1996.
26. LOTAN, R. et al. Lactose-binding lectin expression in human colorectal carcinomas. Relation to tumor progression. *Carbohydr Res*, v. 213, p. 47-57, 1991.
27. MONTIRONI, R. et al. Nuclear changes in the normal-looking columnar epithelium adjacent to and distant from prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer: Morphometric analysis in whole-mount sections. *Virchows Archives*, v. 437(6), p. 625-34, 2000.
28. MULLER, W. E. Origin of metazoan adhesion molecules and adhesion receptors as deduced from cDNA analyses in the marine sponge *Geodia cydonium*: a review. *Cell Tissue Res*, v. 289, p. 383-95, 1997.
29. NANGIA-MAKKER, P. et al. Regulation of the expression of galactoside-binding lectin during human monocytic differentiation. *Cancer Res*, v. 53, p. 5033-7, 1993.
30. NOVIK, V. I. The use of computer technology in the cytologic diagnosis of neoplasms. *Vopr Onkol*, v. 46(2), p. 239-42, 2000.
31. OBERHOLZER, M. et al. Methods in quantitative image analysis. *Histochem Cell Biol*, v. 105, p. 333-55, 1996.
32. OKUYAMA, T. et al. Interrelation between tumor-associated cell surface glycoprotein and host immune response in gastric carcinoma patients. *Cancer*, v. 82(8), p. 1468-75, 1998.
33. PACIS, R. A. et al. Decreased galectin-3 expression in prostate cancer. *Prostate*, v. 44(2), p. 118-23, 2000.
34. PARON, I. et al. Nuclear localization of galectin-3 in transformed thyroid cells: a role in transcriptional regulation. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 302, p. 545-53, 2003.
35. PIANTELLI, M. et al. Lack of expression of galectin-3 is associated with a poor outcome in node-negative patients with laryngeal squamous-cell carcinoma. *J Clin Oncol*, v. 20, p. 3850-6, 2002.
36. PUGLISI, F. et al. Galectin-3 expression in non-small cell lung carcinoma. *Cancer Lett*, v. 212, p. 233-9, 2004.
37. RASHBASS, J. The impact of information technology on histopathology. *Histopathology*, v. 36(1), p. 1-7, 2000.
38. RAZ, A.; LOTAN, R. Endogenous galactoside-binding lectins: a new class of functional tumor cell surface molecules related to metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, v. 6, p. 433-52, 1987.
39. RAZ, A.; CARMIL, P.; PAZERINI, G. Expression of two different endogenous galactoside-binding lectins sharing sequence homology. *Cancer Res*, v. 48, p. 645-9, 1988.
40. RAZ, A. et al. Molecular cloning and chromosomal mapping of a human galactoside-binding protein. *Cancer Res*, v. 51, p. 2173-8, 1991.
41. SCHAFFERT, C.; POUR, P. M.; CHANEY, W. G. Localization of galectin-3 in normal and diseased pancreatic tissue. *Int J Pancreatol*, v. 23, p. 1-9, 1998.
42. SHEKHAR, M. P. et al. Alterations in galectin-3 expression and distribution correlate with breast cancer progression: functional analysis of galectin-3 in breast epithelial/endothelial interactions. *Am J Pathol*, v. 165, p. 1931-41, 2004.
43. SHIMAMURA, T. et al. Clinicopathological significance of galectin-3 expression in ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Clin Cancer Res*, v. 8, p. 2570-5, 2002.
44. TAKAHASHI, T. et al. Alpha 1,6 fucosyltransferase is highly and specifically expressed in human ovarian serous adenocarcinomas. *Int J Cancer*, v. 88(6), p. 914-9, 2000.
45. VAN BEMMEL, J. H.; MUSEN, M. A. Biostatistical methods. In: VAN BEMMEL, J. H.; MUSEN, M. A. (eds.). *Handbook of Medical Informatics*. Germany: Springer-Verlag, 1997. Cap. 24, p. 387-96.
46. VAN DEN BRULE, F.; CALIFICE, S.; CASTRONOVO, V. Expression of galectins in cancer: a critical review. *Glycoconj J*, v. 19, p. 537-42, 2004.
47. VAN DEN BRULE, F. A. et al. Galectin-3, a laminin binding protein, fails to modulate adhesion of human melanoma cells to laminin. *Neoplasia*, v. 42, p. 215-9, 1995.
48. VAN DEN BRULE, F. A. et al. Alteration of the cytoplasmic/nuclear expression pattern of galectin-3 correlates with prostate carcinoma progression. *Int J Cancer*, v. 89, p. 361-7, 2000.
49. WAWROSCHEK, F. et al. The influence of serial sections, immunohistochemistry, and extension of pelvic lymph node dissection on the lymph node status in clinically localized prostate cancer. *Eur Urol*, v. 43, p. 132-7, 2003.
50. YU, L. G. et al. Opposite effects on human colon cancer cell proliferation of two dietary Thomsen-Friedreich antigen-binding lectins. *J Cell Physiol*, v. 186(2), p. 282-7, 2001.

Endereço para correspondência

Nicodemos Teles de Pontes Filho
 Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA),
 Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
 Av. Prof. Moraes Rêgo s/n, Campus Universitário
 CEP 50670-910 – Recife-PE
 e-mail: ntpf@ig.com.br