

LA REGULACIÓN ANTIANGIOGÉNICA DE TROMBOSPONDINA 1 (TSP-1) Y CD36 EN EL DESARROLLO VASCULAR DE LA PLACENTA PORCINA

Mariana Fiorimanti Bessone^{1,3}, Andrea Cristofolini Córdoba^{1,3}, Guadalupe Labari Bosch¹, Tomás Díaz Torres^{2,3}, Alicia Rolando Giordano², Cecilia Merkis Jaime¹.

¹ Área de Microscopía Electrónica, Departamento de Patología Animal. ² Embriología, Departamento de Anatomía Animal. Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto. ³ CONICET. Ruta Nac. 36, Km. 601 – C.P. X5804BYA, Río Cuarto, Córdoba, ARGENTINA.

mfiorimanti@ayv.unrc.edu.ar

Resumen

La trombospondina 1 (TSP-1) es un importante factor antiangiogénico que regula el desarrollo vascular placentario. Induce la apoptosis de células endoteliales mediante la unión a CD36, un receptor de superficie celular. El objetivo de este trabajo fue detectar la localización de TSP-1 y CD36 por inmunohistoquímica, en placentas porcinas de 30, 60 y 114 días de gestación. La intensidad de inmunomarcación fue semi-cuantificada a través del valor de High Score (HS). La TSP-1 fue detectada a los 30 y 60 días de gestación, como pequeños gránulos citoplasmáticos en el epitelio uterino, lo cual sugiere un mecanismo de reserva para la autorregulación de la apoptosis y proliferación celular en el desarrollo de las vellosidades placentarias. El hallazgo de TSP-1 y CD36 en zonas perivasculares induciría la apoptosis de células endoteliales para la remodelación del lecho vascular placentario. La TSP-1 actuaría como un potente inhibidor de la angiogénesis placentaria en porcinos principalmente en el período medio de la gestación a través de la unión a VEGF, por lo tanto, los mecanismos antiangiogénicos predominantes en el desarrollo vascular placentario serían indirectos. La presencia de este factor antiangiogénico en el trofoblasto a los 114 días, participaría mediante un mecanismo autocrino en la remodelación placentaria.

Introducción

En el desarrollo vascular placentario, intervienen diversos factores antiangiogénicos que son fundamentales para un balance homeostático del proceso de vascularización y el crecimiento adecuado de los fetos. Uno de los principales factores antiangiogénicos cuya participación ha sido puesta de manifiesto en tejidos placentarios porcinos, es la trombospondina 1 (TSP-1), que ejerce su acción a través de la unión a CD36 (1). La TSP-1 fue el primer factor antiangiogénico descrito, es secretada por las plaquetas activadas y se expresa en una variedad de células vasculares normales, incluyendo células endoteliales y musculares lisas. Forma parte de la matriz extracelular, es producida por fibroblastos, células musculares lisas y células endoteliales en respuesta a una lesión vascular, factores de crecimiento y citoquinas (2,3). Esta glicoproteína de 450 kDa está constituida por tres monómeros de 150 kDa unidos por enlaces disulfuro. Cada uno de estos monómeros está compuesto por un dominio globular NH₂-terminal, seguido de una región de oligomerización tipo procolágeno, tres tipos de secuencia repetida (tipo 1, tipo 2 y tipo 3 repeticiones) y un dominio globular COOH-terminal (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10). Las distintas regiones de cada monómero de TSP-1 interactúan con diversos receptores de superficie celular para ejercer una actividad específica. La repetición tipo I, también llamada TSR o repetición tipo properdina, es considerada como el principal sitio antiangiogénico (8, 10, 11). Entre los receptores de TSP-1 presentes en las células endoteliales se pueden mencionar la proteína relacionada con el receptor LDL (LRP), proteoglicanos como heparán sulfato, CD36, CD47, integrinas (**$\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$, y $\alpha v\beta 3$**), la proteína asociada a integrinas (IAP) y uno o más receptores no identificados para el C-terminal (11, 12, 13). La interacción de TSP-1 con CD36 juega un papel significativo en la actividad antiangiogénica, tanto *in vitro* como *in vivo* (12, 14, 15, 16, 17, 18). El CD36 es un receptor glicoproteico transmembrana de 88 kDa, el cual se expresa en varios tipos de células, incluyendo monocitos, macrófagos, plaquetas, células endoteliales microvasculares, adipocitos, células epiteliales en riñón y en miocitos cardíacos (19). La unión de TSP-1 a CD36 activa una ruta de señalización que se inicia por la asociación con la tirosina quinasa fyn. Esta señal inicial en la membrana plasmática de la célula endotelial conduce a la activación de miembros de la familia MAPK (p38MAPK y JNK) y de diversas caspasas (caspasa 3 y caspasa 8) (20). La muerte celular programada constituye un factor esencial en el

desarrollo placentario (21) y ha sido ampliamente estudiada en porcinos (22). La TSP-1 induce la apoptosis exclusivamente en las células endoteliales activadas, sin afectar al endotelio maduro que se encuentra en estado quiescente debido a los mecanismos de estabilización basados en las interacciones entre células endoteliales, pericitos y con la matriz extracelular (MEC) (20). Este factor además, tiene la capacidad de inhibir la síntesis de ADN de las células endoteliales impidiendo su proliferación, regular la biodisponibilidad del factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) y de antagonizar los efectos del factor de crecimiento fibroblástico básico (FGF2) (1, 2, 11, 13, 17, 23, 24, 25). Se ha detectado la expresión de TSP-1 en diversos tejidos patológicos de humanos, como en carcinoma de células escamosas vulvar (3), en leiomiomas y leiomiomas en células del músculo liso uterino (26) y en tejido placentario de embarazos con gestosis (13). Además, ha sido estudiada en procesos fisiológicos como en el control de la angiogénesis durante el desarrollo folicular y la formación del cuerpo lúteo en ratas (17, 27). En la interfase materno fetal de cerdas gestantes, se detectó TSP-1 y el receptor CD36 a los días 20 y 50 de gestación, destacando así su posible rol antiangiogénico en estos periodos (1). Sin embargo, esta molécula antiangiogénica y su receptor aún no han sido estudiados en otros periodos más avanzados de la preñez porcina.

Objetivos

Detectar la localización del factor antiangiogénico trombospondina 1 (TSP-1) y su receptor CD36 por inmunohistoquímica, en placentas porcinas de 30, 60 y 114 días de gestación.

Materiales y métodos

Animales

Todos los procedimientos fueron avalados por el Comité de Ética de Investigación en Animales (CoEdI) de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Se trabajó con muestras placentarias obtenidas de cerdas mestizas en estadios gestacionales temprano (30 días) n=5, medio (60 días) n=5 y a término (114 días) n=5, provenientes de frigoríficos y criaderos de la zona de Río Cuarto, Argentina (33,11° S, 64,3° O), destinadas a faena y consideradas libres de enfermedad de acuerdo a la examinación

clínica y *postmortem* realizada. Se recolectaron los tractos reproductivos y se lavaron con solución salina de Hank's (SSH) (Gibco, USA) conteniendo 10.000 U/ml de penicilina G sódica, 10 mg/ml de sulfato de estreptomicina y 2,5 µg/ml de fungizona, manteniéndolos a 4 °C hasta su procesamiento en el laboratorio (28).

Obtención de placentas

Para la obtención de placentas se realizó una palpación detectando la ubicación de los fetos y se procedió a la apertura de los cuernos uterinos en forma longitudinal con una incisión por el borde anti-mesometrial. El tejido placentario se procesó por la técnica de microscopía óptica convencional, obteniendo cortes de 4 µm que fueron montados sobre portaobjetos limpios para los ensayos inmunohistoquímicos.

Inmunohistoquímica para TSP-1 y su receptor CD36

Se realizó recuperación antigénica por ebullición colocando los portaobjetos en coplin de plástico, llenos con buffer citraro 10 mM, pH 6 para TSP-1 y pH 9 para CD36, hervidos a baño María por 10 minutos y se dejó enfriar 20 minutos. Se enjuagaron con buffer fosfato salino (PBS) por 10 minutos. Posteriormente, se agregó peróxido de hidrógeno 3 % en PBS por 30 minutos y se volvió a lavar con PBS. Los anticuerpos inespecíficos fueron bloqueados con suero de caballo (TSP-1) y cabra (CD36) (1/100 PBS: 50 µL suero puro + 5 mL PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. Sin lavar, se agregó el primer anticuerpo anti-TSP-1 (Thrombospondin 1 sc-59887) y anti-CD36 (CD36 (V-19): sc-7641), ambos, dilución 1/100 (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) cubiertos con parafilm e incubados over-night en cámara húmeda a 4 °C. Para TSP-1, se utilizó como anticuerpo secundario el Polivalent Biotinylated Link (YELLOW- pool de Segundos anticuerpos-biotinilados anti-rabbit anti-mouse, Hi Def Detection TM HRP Polymer System Cell Marque, USA) incubando cada reactivo por 20 minutos a temperatura ambiente; mientras que para CD36, se agregó el segundo anticuerpo **biotinilado ImmunoCruz™ goat ABC Staining System: sc-2023** (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) (preparado en botella tapa verde, ±1µg/mL) por 30 minutos. Se añadió AB enzyme reagent (complejo Avidina-HRP botella tapa púrpura) por 30 minutos. Entre cada paso se lavó con PBS. Las proteínas inmunoreactivas se visualizaron mediante el cromógeno diaminobencidina (DAB Cell Marque, USA).

Finalmente, se contrastó con hematoxilina de Mayer (Dako, USA). Por último, las secciones se deshidrataron en serie de alcoholes de graduación creciente (70 %, 80 %, 90 %, 100 %) seguidas de xilol 100 %, fueron montados con Entellán (Merk, Alemania). La observación se realizó a través de un microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss), se evaluaron 5 campos al azar por periodo gestacional, para cada una de las determinaciones. Los resultados obtenidos fueron expresados en forma semicuantitativa en función de la marcación observada: (-) negativa, (+) débil, (++) abundante, (+++) cuantiosa. Se determinó la distribución de la intensidad de **inmunomarcación a través del valor de High Score (HS), definido como $HS = \sum P_i (i+1)$** ; donde i: intensidad de marcación y P_i : porcentaje de células para cada marcación. La adquisición de imágenes se realizó mediante una cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón) adosada al microscopio.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente con el software InfoStat (29) para evaluar la dependencia de High Score de TSP-1 y su receptor CD36 con respecto a los estadios gestacionales estudiados. Se realizó un ANOVA con un test *a posteriori* LSD-Fisher. Cuando un test paramétrico no pudo ser realizado, un ANOVA no paramétrico con rangos, test de Kruskal Wallis, fue utilizado (29).

Resultados y discusión

La presencia de factores antiangiogénicos es esencial para la regulación del crecimiento de los nuevos vasos sanguíneos que se desarrollan en la placenta a lo largo de la gestación. La TSP-1 fue localizada por inmunohistoquímica en el epitelio uterino de las vellosidades placentarias a los 30 días de gestación, destacándose la presencia de pequeños gránulos citoplasmáticos inmunomarcados positivamente (+++) (Figura 1). La expresión de TSP-1 citoplasmática en estas células epiteliales uterinas, sugiere un mecanismo de reserva para la autorregulación de la apoptosis y proliferación celular en el desarrollo de las vellosidades placentarias. Estudios de Cristofolini *et al.* (2011), han postulado que la apoptosis en la gestación temprana sería responsable de la remodelación en la interfase placentaria que favorecería el contacto materno-fetal en porcinos.

A los 60 días de gestación, TSP-1 fue inmunolocalizada en el tejido conectivo materno con tinción abundante (++) y también en el epitelio uterino, con tinción cuantiosa (+++). A diferencia de lo hallado por Edwards *et al.* (2011), las glándulas uterinas fueron negativas al igual que el endotelio de los vasos sanguíneos. Además, se detectó un patrón regular de tinción débil (+) y abundante (++) alrededor de la mayoría de los vasos sanguíneos en el estroma materno (Figura 2). Esta localización es coincidente con estudios de Edwards *et al.* (2011) en placentas porcinas de 20 y 50 días de gestación, y con Ostankova *et al.* (2011) en placentas humanas, quienes hallaron la expresión positiva de TSP-1 en el estroma situado cercano a los vasos sanguíneos de las vellosidades intermedias.

En el periodo de gestación a término, de 114 días, se observó una inmunotinción abundante (++) en el estroma fetal como así también en el epitelio trofoblástico. De acuerdo a estos resultados se propone que la TSP-1 presente en el trofoblasto participaría activamente mediante un mecanismo de acción autocrino en la remodelación placentaria, contribuyendo a la separación de las membranas maternas y fetales durante el parto. Por otro lado, se observó inmunomarcación positiva (++) en el endotelio de algunos vasos sanguíneos fetales, donde por unión de la región TSR I presente en TSP-1 al receptor de superficie celular CD36, posibilitaría la inducción de la vía apoptótica en las células endoteliales activadas (Figura 3).

Es importante destacar el hallazgo de células ahusadas y globosas con presencia de gránulos citoplasmáticos inmunomarcados intensamente (+++) en todos los periodos. Estas células fueron detectadas en la base de las vellosidades y se proyectaban hacia la parte apical de las mismas, acompañadas en la mayoría de los casos por un halo de tinción inmunopositivo. La manifestación de este tipo celular podría estar vinculado al proceso de síntesis de TSP-1, siendo compatible con fibrocitos y macrófagos presentes en el tejido conectivo placentario, tanto materno como fetal, coincidiendo con los sitios de producción de esta glicoproteína (11).

El receptor CD36, también fue detectado por inmunohistoquímica en las vellosidades placentarias de los tres periodos estudiados. A los 30 días de gestación fue hallado en el estroma materno, se encontraron células globosas, con gránulos citoplasmáticos marcando intensamente (+++). Una tinción débil fue hallada en el corion fetal. El epitelio uterino y glandular en el componente materno, y el epitelio trofoblástico

resultaron negativos en este periodo, como así también los endotelios de las vasos sanguíneos, tanto maternos como fetales. Hacia la mitad y el final de la gestación se observó una distribución similar de CD36 en las estructuras placentarias anteriormente mencionadas y alrededor de los vasos sanguíneos (Figura 4). Estos resultados sugieren que la principal vía de regulación de la angiogénesis en el desarrollo vascular, no es directamente a través de la unión de TSP-1 a CD36, sino que podrían estar mediando otros efectos indirectos de TSP-1, como la unión a VEGF o FGF2, reduciendo así la supervivencia de las células endoteliales, la migración y la germinación vascular.

En lo que refiere al análisis estadístico, a partir de los valores de HS para TSP-1, se observa un aumento estadísticamente significativo el día 60 de gestación y una disminución hacia el final de la preñez. Este aumento coincide con elevados niveles de HS detectados para VEGF por Sanchis *et al.* (2015), en el mismo periodo de preñez, lo cual permite inferir que altos niveles de expresión de TSP-1 estarían regulando la angiogénesis estimulada por este factor. Entre el periodo temprano y final, de 30 y de 114 días respectivamente, no se observan diferencias estadísticamente significativas (Figura 5).

El análisis estadístico para el receptor CD36, muestra una menor fluctuación de los valores de HS, comparada a la del ligando TSP-1. Sin embargo, hay una mayor expresión a los 30 días y desciende hacia los días 60 y 114 de gestación, mostrando diferencias estadísticamente significativas (Figura 5). En este periodo la remodelación del lecho vascular para el crecimiento placentario predominaría por sobre las demandas del crecimiento fetal porcino.

Conclusiones

En el desarrollo vascular placentario porcino es fundamental el equilibrio entre los factores angiogénicos y antiangiogénicos. La presencia de TSP-1 en zonas perivasculares induciría la apoptosis en las células endoteliales vía CD36 para la remodelación del lecho vascular placentario. El hallazgo de TSP-1 en el epitelio uterino, sugiere un mecanismo de reserva para la autorregulación de la apoptosis y proliferación celular en el desarrollo de las vellosidades placentarias a lo largo de la gestación. La TSP-1 podría actuar como un potente inhibidor de la angiogénesis placentaria en porcinos principalmente en el período medio de la gestación (60 días) a través de la unión a VEGF. La presencia de este factor antiangiogénico en el trofoblasto al final de la gestación (114) participaría activamente mediante un mecanismo de acción autocrino en la remodelación placentaria, contribuyendo a la separación de las membranas maternas y fetales durante el parto. Los mecanismos de acción antiangiogénicos de TSP-1 predominantes en el desarrollo vascular placentario a lo largo de la gestación porcina serían indirectos.

Bibliografía

1. Edwards AK, van den Heuvel MJ, Wessels JM, Lamarre J, Croy BA, Tayade C. Expression of angiogenic basic fibroblast growth factor, platelet derived growth factor, thrombospondin-1 and their receptors at the porcine maternal-fetal interface. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011; 9:5. doi: 10.1186/1477-7827-9-5.
2. Simantov R and Silverstein RL. CD36: A critical anti-angiogenic receptor. *Bioscience*. 2003; 8: 874-882.
3. Tringler B, Grimm C, Sliutz G, Leodolter S, Speiser P, Reinthaller A, Hefler LA. Immunohistochemical expression of thrombospondin-1 in invasive vulvar squamous cell carcinoma. *Gynecol Oncology*. 2005; 99:80-3.
4. Lawler J and Hynes RO. The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different proteins. *The Journal of Cell Biology*. 1986; **103** (5):1635-1648.
5. Tan K, Duquette M, Liu J, Dong Y, Zhang R, Joachimiak A, Lawler J, Wang J. Crystal structure of the TSP-1 type 1 repeats: a novel layered fold and its biological implication. *The Journal of Cell Biology*. 2002; **159** (2):373-382.
6. Adams J, Bentley A, Kvensakul M, Hatherley D, Hohenester E. Extracellular matrix retention of thrombospondin 1 is controlled by its conserved C-terminal region. *Journal Cell Science*. 2008; 121: 784-795.
7. Campbell NE, Kellenberger L, Greenaway J, Moorehead R, Linnerth-Petrik M, Petrik J. Extracellular matrix proteins and tumor angiogenesis. *Journal of Oncology*. 2010; 586905.
8. Rusnati M, Urbinati C, Bonifacio S, Presta M, Taraboletti G. Thrombospondin-1 as a paradigm for the development of antiangiogenic agents endowed with multiple mechanisms of action. *Pharmaceuticals*. 2010; 3:1241-1278.
9. Adams JC and Lawler J. The thrombospondins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2011; 3: (10), a009712.
10. Bienes-Martinez R. Regulación de la proteína de matriz extracelular trombospondina-1 por el gen supresor de tumores VHL y por la hipoxia. Departamento de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid. 2013; 1-195.

11. Lawler PR and Lawler J. (2012) Molecular basis for the regulation of angiogenesis by thrombospondin-1 and -2. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012; **2** (5), a006627.
12. Chen H, Herndon ME, Lawler J. The cell biology of thrombospondin-1. *Matrix Biology*, 2000; 19 (7):597-614.
13. Ostankova YV, Klimovskaya YS, Gorskaya OA, Kolobov AV, Kvetnoi IM, Selkov SA, Sokolov DI. Expression of thrombospondin-1 gene mRNA and protein in the placenta in gestosis. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2011; **151** (2):215.
14. Dawson DW, Pearce SF, Zhong R, Silverstein RL, Frazier WA, Bouck NP. CD36 mediates the *In vitro* inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *J Cell Biol*. 1997; 138:707-717.
15. Dawson DW, Volpert OV, Pearce SF, Schneider AJ, Silverstein RL, Henkin J, Bouck NP. Three distinct D-amino acid substitutions confer potent antiangiogenic activity on an inactive peptide derived from a thrombospondin-1 type 1 repeat. *Mol Pharmacol*. 1999; **55** (2):332-8.
16. Jimenez B, Volpert OV, Crawford SE, Febbraio M, Silverstein RL, Bouck N. Signals leading to apoptosis dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat Med*. 2000; **6**, 41-48.
17. Osz K, Ross M, Petrik J. The thrombospondin-1 receptor CD36 is an important mediator of ovarian angiogenesis and folliculogenesis. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2014; 12:21.
18. Park, YM. CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. *Experimental & Molecular Medicine*. 2014; **46**(6), e99.
19. Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation and lipid metabolism. *J Clin Inv*. 2001; 108: 785-791.
20. Jiménez B. Mecanismo de inhibición de la angiogénesis tumoral por trombospondina-1. *Nefrología*. 2003; 23:49-53.
21. Merkis C, Cristofolini A, Sanchis G, Koncurat M. Expression of death cellular receptors FAS/CD95 and DR4 during porcine placentation. *Int J Morphol*. 2010; 28(3): 829-834.

22. Cristofolini A, Merkis C, Sanchis G, Turiello P, Campos M, Konkurat M. IAp in crossbred swines. *Biocell*. 2011; 35(2): A134.
23. Armstrong LC, Bjorkblom B, Hankenson KD, Siadak AW, Stiles CE, Bornstein P. Thrombospondin 2 inhibits microvascular endothelial cell proliferation by a caspase-independent mechanism. *Mol Biol Cell*. 2002; **13** (6): 1893-1905.
24. Mirochnik Y, Kwiatek A, Volpert O. Thrombospondin and apoptosis: molecular mechanisms and use for design of complementation treatments. *Current Drug Targets*. 2008; **9** (10):851-862.
25. Klenotic PA, Page RC, Li W, Amick J, Misra S, Silverstein RL. Molecular basis of anti-angiogenic thrombospondin-1 type 1 repeat domain interactions with CD36. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2013; **33** (7): 1655-1662.
26. Bodner-Adler B, Nather A, Bodner K, Czerwenka K, Kimberger O, Leodolter S, Mayerhofer K.. Expression of thrombospondin 1 (TSP 1) in patients with uterine smooth muscle tumors: an immunohistochemical study. *Gynecol Oncol*. 2006; 103: 186-189.
27. Petrik J, Gentry P, Feige J, LaMarre J. Expression and localization of thrombospondin-1 and -2 and their cell-surface receptor, CD36, during rat follicular development and formation of the corpus luteum. *Biol Reprod*. 2002; 67: 1522-1531.
28. Sanchis E, Cristofolini A, Merkis C. Porcine placental immunoexpression of vascular endothelial growth factor, placenta growth factor, Flt-1 and Flk-1. *Biotechnics and Histochemistry*. 2015; **90**(7): 486-494.
29. Di Rienzo J, Casanoves F, Balzarini M, Gonzalez L, Tablada M, Robledo C. InfoStat versión 2009. 2009; Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Anexos

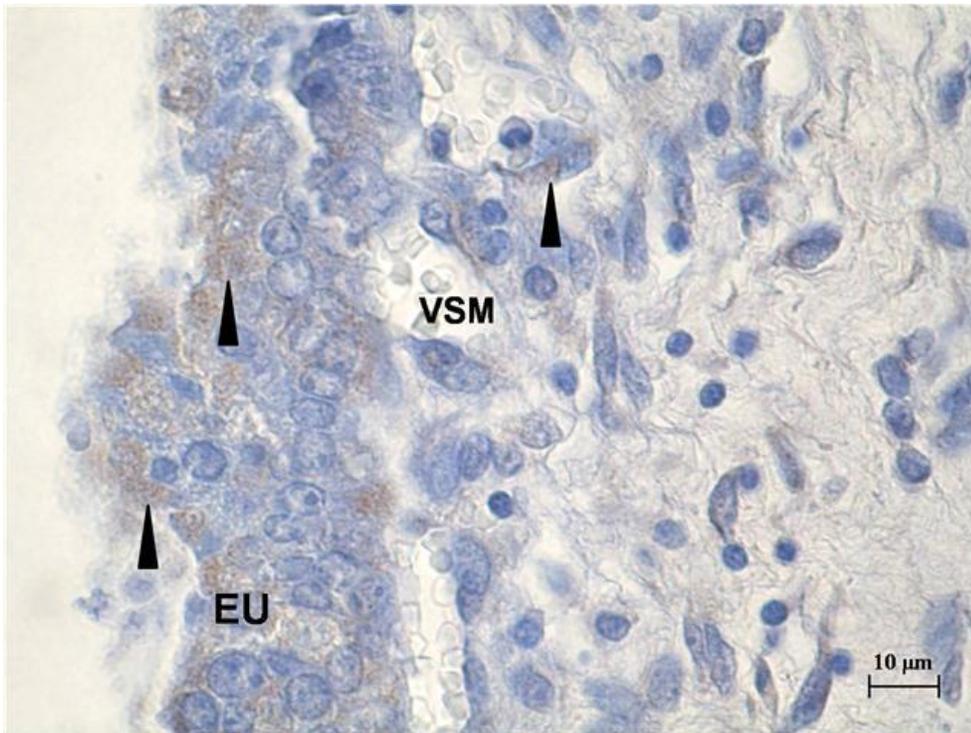


Figura 1. Inmunolocalización de TSP-1 en tejido placentario porcino materno de 30 días de gestación, contrastado con hematoxilina (1000x). **EU:** epitelio uterino; **VSM:** vaso sanguíneo materno. Puntas de flecha indican inmunomarcación positiva.

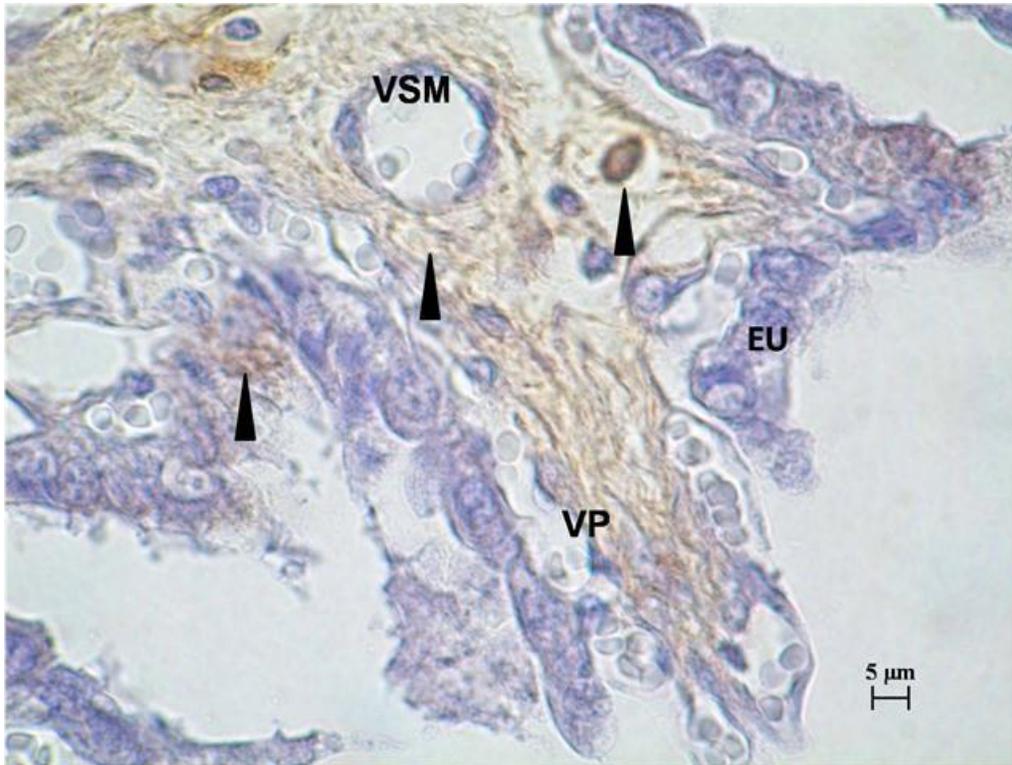


Figura 2. Inmunolocalización de TSP-1 en tejido placentario porcino materno de 60 días de gestación, contrastado con hematoxilina (1000x). **EU:** epitelio uterino; **VSM:** vaso sanguíneo materno; **VP:** vellosidad placentaria. Puntas de flecha indican inmunomarcación positiva.

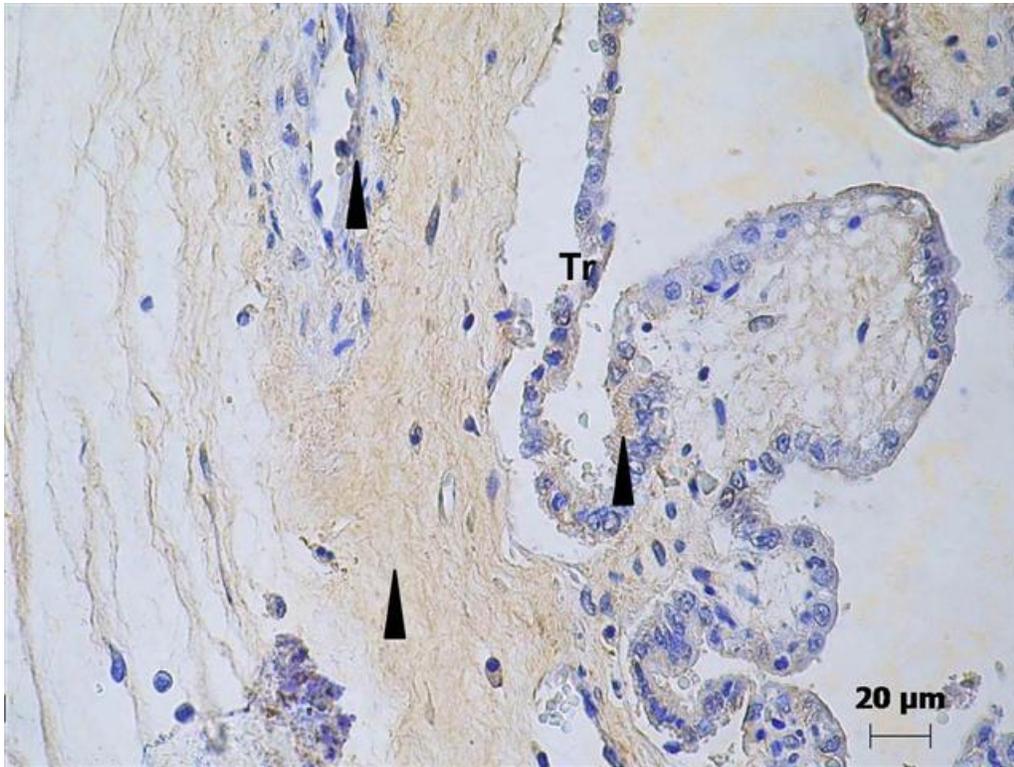


Figura 3. Inmunolocalización de TSP-1 en tejido placentario porcino fetal de 114 días de gestación, contrastado con hematoxilina (400x). **Tr:** trofoblasto. Puntas de flecha indican inmunomarcación positiva.

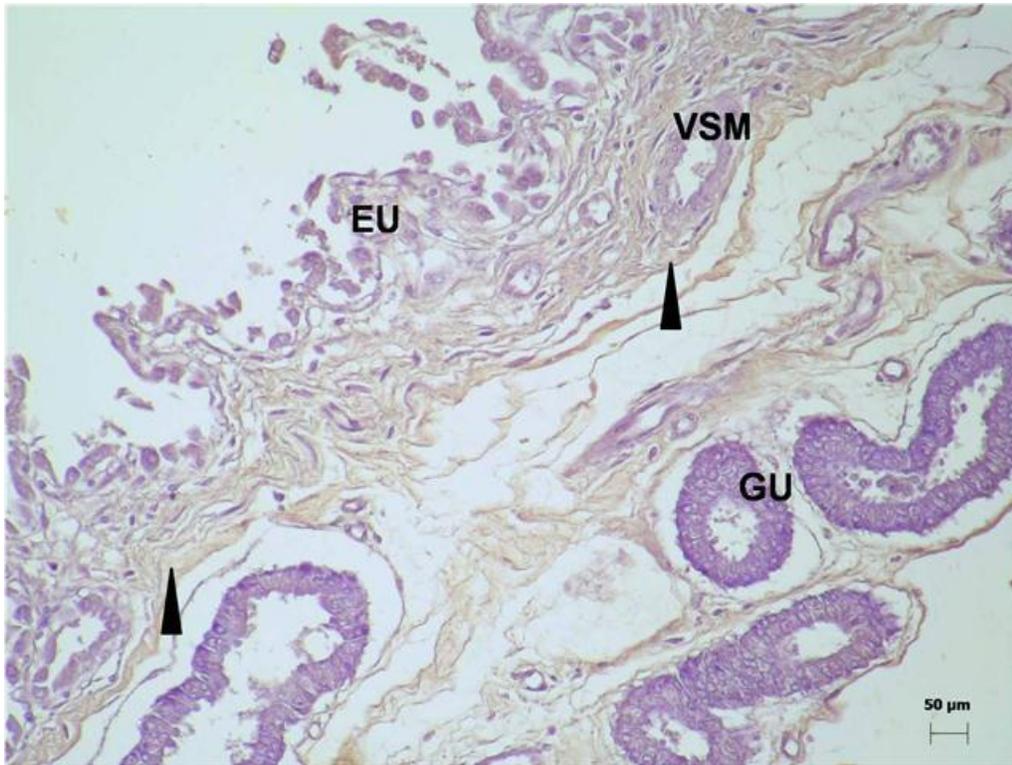


Figura 4. Inmunolocalización de CD36 en tejido placentario porcino materno de 60 días de gestación, contrastado con hematoxilina (200x). **EU:** epitelio uterino; **VSM:** vaso sanguíneo materno; **GU:** glándulas uterinas. Puntas de flecha indican inmunomarcación positiva.

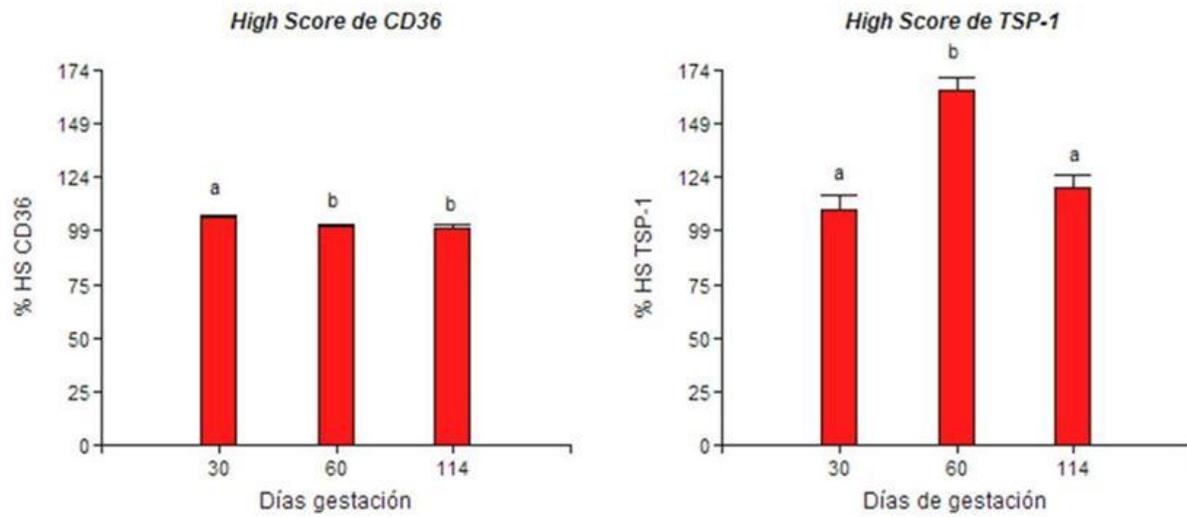


Figura 5. Niveles de High Score de TSP-1 y su receptor CD36 en función de los periodos de gestación: temprano 30, medio 60 y tardío de 114. Letras diferentes a y b muestran diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.01$).