



**VNIVERSIDAD  
D SALAMANCA**  
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**IBSAL**  
Instituto de Investigación  
Biomédica de Salamanca



INSTITUTO DE  
NEUROCIENCIAS  
CASTILLA Y LEÓN

Facultad de Biología  
**TRABAJO FIN DE GRADO**

---

**OPTIMIZACIÓN DE  
INMUNOFLUORESCENCIA EN RETINA  
DE PRIMATE Y ANÁLISIS DE LA  
DISTRIBUCIÓN PROTEICA DEL  
COMPLEJO CRB**

---

Optimisation of immunofluorescence protocol in primate retina and analysis of Crb complex proteins distribution.

Eduardo Barrio Ferrero

Salamanca, 2021

Grado en Biología

21 TFG 306



## Índice de contenido

Resumen (en castellano y en inglés).....	III
Introducción .....	1
La retina.....	1
Desarrollo y envejecimiento de la retina.....	2
Capas y tipos celulares de la retina .....	2
Células de la retina .....	2
Citoarquitectura.....	4
Fototransducción .....	5
Proteínas de polaridad y distrofias retinianas.....	6
Crb.....	6
Par.....	6
Scribble.....	7
Justificación, hipótesis y objetivos.....	7
Justificación.....	7
Hipótesis.....	7
Objetivos .....	7
Materiales y métodos .....	8
Obtención de la muestra, fijación y crioprotección.....	8
Inmunofluorescencia .....	8
Preparación.....	9
Preincubación .....	9
Protocolos para reducir la autofluorescencia de los tejidos .....	9
Incubación del anticuerpo primario.....	10
Incubación del anticuerpo secundario .....	10
Montaje.....	10
Obtención y procesamiento de imágenes .....	11



Resultados .....	11
Optimización del protocolo .....	11
Localización de proteínas del complejo Crb en la retina de <i>Macaca fascicularis</i> .....	13
Discusión y conclusiones .....	16
Permeabilización de membranas .....	16
Eliminación de la autofluorescencia .....	16
Distribución de las proteínas de polaridad .....	17
Bibliografía.....	19

## RESUMEN

La retina es una estructura del sistema nervioso central especializada en la visión, que en el ojo de primates se sitúa entre la coroides y el humor vítreo. Está formada por varios tipos celulares que cumplen diferentes funciones, todas ellas necesarias para una correcta recepción y transducción de los estímulos visuales. Las proteínas de polaridad tienen un papel esencial tanto en el desarrollo de los tejidos como en la integridad y mantenimiento de sus funciones, así como en la formación y estabilización de uniones celulares. Los complejos proteicos Crb, Par y Scrib, formados por proteínas que interactúan entre sí, tienen como función definir la zona apical (Crb y Par) y basolateral (Scrib) de las células. Defectos en estos complejos se asocian con diferentes distrofias retinianas. Caracterizar estos complejos de polaridad en retina de primates es por tanto un objetivo principal para dilucidar si su defecto es responsable de problemas visuales, porque este modelo experimental permite abordar este objetivo desde un modelo evolutivamente muy cercano al humano. El objetivo de este trabajo es optimizar el protocolo para llevar a cabo ensayos de inmunofluorescencia en retina de primate y analizar la distribución de proteínas de polaridad del complejo Crb en *Macaca fascicularis*.

## ABSTRACT

The retina is a structure of the central nervous system highly specialised in vision. In the primate eye, it is placed between the choroid and the vitreous humour. It comprises several cell types with different functions, all of which are necessary for the correct reception and transduction of visual stimuli. Polarity proteins play a key role both in the formation of tissues and in the integrity and maintenance of their functions, as they are essential in the establishment of cellular junctions. Crb, Par and Scrib protein complexes are composed by proteins that interact with each other, defining the apical (Crb and Par) and basolateral (Scrib) sides of the cells. Defects in these complexes have been associated with different retinal dystrophies. To understand the distribution and interaction of these protein complexes in the primate retina is then a main objective to elucidate whether their defect is responsible of certain visual problems. Using primate retinas as experimental model allows to approach this objective with a model evolutionarily very similar to humans. This work optimises a protocol to carry out immunofluorescence assays in primate retina to analyse the distribution of Crb complex polarity proteins in *Macaca fascicularis*, in comparison with other species.



## Introducción

A lo largo de la evolución, uno de los sentidos más favorecidos ha sido la visión. En la mayor parte de los casos, los órganos encargados de la recepción de los estímulos visuales son los ojos y, más concretamente, la retina, que es la estructura sensorial de los ojos. Son órganos extraordinariamente complejos, algo que ya reconoció Charles Darwin en su momento cuando postuló la selección natural: “To suppose that the eye with all its inimitable contrivances [...] could have been formed by natural selection, seems, I confess, absurd in the highest degree...”.

### La retina

La retina es la capa más interna de la zona posterior del ojo y es la estructura del sistema nervioso central (SNC) especializada en la recepción y transducción de estímulos luminosos a impulsos nerviosos, que van por el nervio óptico hasta la corteza visual, en el encéfalo.

Debido a que se estima que alrededor del 80 % de toda la información sensorial que los humanos recibimos procede de la retina, es la parte del SNC más estudiada (1). Este estudio lo comenzó Ramón y Cajal hace más de 100 años y en la actualidad se trata de la única estructura compleja del SNC de mamíferos cuyas neuronas están completamente clasificadas e identificadas. Además, se considera que la retina no está compuesta por un tipo celular predominante y el resto son complementarias, sino que más bien, se cree que es una estructura con un funcionamiento extremadamente complejo en el que hay multitud de procesos anatómicos y fisiológicos ejecutados en paralelo (2).

En la retina podemos diferenciar entre epitelio pigmentario, en contacto con la coroides, y la retina neural, en contacto con el humor vítreo, que comprende el resto de tipos celulares de la retina. Además, la retina de primates se puede subdividir estructuralmente en zonas diferentes de forma macroscópica. Así, tendremos retina periférica y retina central. La central se caracteriza por estar más densamente poblada de neuronas y por tener un pigmento amarillento, por lo que es comúnmente llamada mácula lútea. Asimismo, en la zona central de la mácula lútea se halla la fóvea, que es el lugar de la retina que se encarga de proporcionar el mayor grado de agudeza visual, debido a que es la zona con mayor población de fotorreceptores. En los diferentes grupos de animales se pueden hallar estructuras homólogas que buscan dotar de mayor resolución a la visión: varias fóveas, fóveas convexas, una raya visual... La fóvea presenta una alta población de conos en comparación con el resto de la retina, con lo que es la parte de la retina especializada en la visión en color (3).

## Desarrollo y envejecimiento de la retina

Los ojos son una parte altamente especializada del SNC. El primer indicio morfológico de formación de los ojos en el embrión se halla en la evaginación bilateral del diencefalo (4).

Con la edad, se van acumulando en la retina sustancias que son signo de envejecimiento tisular. Tanto estas sustancias de desecho, principalmente restos lipídicos que las células del epitelio pigmentario no pueden digerir en su totalidad, como la presencia de una abundancia de pigmentos visuales en los segmentos de los fotorreceptores suponen un reto para el estudio de la retina: las técnicas de visualización de marcadores fluorescentes se ven interferidas por la presencia de estos pigmentos; así, estos pigmentos son los responsables de la autofluorescencia propia de este tejido (5,6).

Destaca entre estas moléculas la lipofuscina, un pigmento fluorescente que se va acumulando en el citoplasma de las células del SNC con el tiempo y que tiene un amplio espectro tanto de excitación como de emisión, que coincide con los láseres que comúnmente se usan en los microscopios para visualizar el marcaje tisular con fluorocromos.

## Capas y tipos celulares de la retina

### Células de la retina

Desde el punto de vista de las diferentes células que componen la retina, se han definido más de 60 tipos neuronales (2) con características que las hacen únicas, como en el caso de los bastones (fotorreceptores), que son tan abundantes que constituyen el segundo tipo de neuronas más numerosas en el organismo (7).

En base a su linaje, se clasifican en:

- A. Epitelio pigmentario (EP). Se trata de un epitelio monoestratificado de células hexagonales que contienen melanina (compuesto por el cual este epitelio se denomina pigmentario) en su zona apical. Sus células se hallan unidas lateralmente por uniones ocluyentes y adherentes, con lo que es el elemento constituyente de la barrera hematorretiniana. Entre sus funciones destacan la fagocitosis de los fotopigmentos producidos por los fotorreceptores para su reciclaje y su devolución posterior (siendo las células del EP los fagocitos más activos del organismo), absorción de la luz no captada por los fotorreceptores, mantenimiento de la adhesión retiniana, secreción de factores de crecimiento y control del trasvase de fluidos entre sus caras apical y basal (haciendo de la retina un tejido inmunoprivilegiado) (5,8,9).



## B. Células neuronales

- a. Fotorreceptores: son las células encargadas de captar los fotones de luz y en las que se tiene lugar el proceso de fototransducción. Este proceso ocurre en los segmentos externos de estas células, que es donde se halla el fotorpigmento. Se establece una clasificación en base a las condiciones lumínicas en las que su funcionamiento es óptimo, debido a diferencias tanto anatómicas como fisiológicas:
  - i. Conos: son los encargados de la visión en color. Requieren mayores cantidades de luz para funcionar correctamente y son notablemente menores en número que los bastones (en torno a 6 millones). La mayor población de conos en los mamíferos se halla en la fovea. En humanos hay 3 pigmentos (opsinas) diferentes que captarán diferentes longitudes de onda **(10)**.
  - ii. Bastones: son más numerosos (130 millones) que los conos y su pigmento es la rodopsina. Pueden activarse con un único fotón y nos dotan de la capacidad de ver en condiciones de baja luminosidad **(11)**.
- b. Células horizontales: se definen como interneuronas que modulan la información que se transmite entre los fotorreceptores y las células bipolares en la capa plexiforme externa de la retina, evitando la pérdida de intensidad. Se pueden clasificar en dos tipos dependiendo de si tienen axón (tipo B) o carecen de él (tipo A) **(12,13)**.
- c. Células bipolares: son consideradas como las células pivote de la retina, pues son el puente de comunicación entre las capas plexiforme externa y la interna, siendo postsinápticas de los fotorreceptores y presinápticas de las amacrinas y de las ganglionares. Es remarcable que en mamíferos hay grupos de células bipolares especializadas que recogen información únicamente de los conos, recibiendo el nombre de células bipolares de cono **(14,15)**.
- d. Células amacrinas: se trata de un grupo que alberga diversos tipos de células variadas tanto en forma como en sus procesos bioquímicos **(16)**. Tanto es así que sus funciones van a ser notablemente heterogéneas y específicas (en contraste con otras células más generalistas). Sus funciones más destacadas son la conexión entre las células bipolares y las ganglionares **(17)** y la modulación de la respuesta de la retina a diferentes intensidades lumínicas.
- e. Células ganglionares. Su principal función es la de enviar al cerebro la información recibida en la retina, formando con sus largos axones mielinizados el nervio óptico. Durante mucho tiempo se ha creído que los conos y bastones eran los únicos fotorreceptores en la retina, pero se ha demostrado que algunas células ganglionares

tienen un pigmento fotosensible denominado melanopsina. Las señales producidas por estas células atípicas no se relacionan con procesos formadores de imágenes, sino que tienen otras funciones como regular los ritmos circadianos o controlar el reflejo pupilar (que se conserva en ratones sin conos ni bastones) **(18,19)**.

C. Elementos gliales.

- a. Astroцитos: no se forman en la retina, sino que migran hasta ella desde el cerebro. Se suelen hallar en las capas más internas de la retina, especialmente en la capa de las fibras del nervio óptico. Están relacionadas con la vascularización de la retina, tanto en condiciones fisiológicas normales como patológicas **(20,21)**.
- b. Células de Müller: también conocidas como glía radial, se hallan distribuidas por toda la retina y entre sus funciones se encuentran dar soporte estructural, llevar a cabo el metabolismo de la glucosa para proveer de nutrientes a los fotorreceptores, controlar y mantener la barrera hematorretiniana, reciclar neurotransmisores y mantener la homeostasis del tejido, controlando iones, agua y pH. Son unas de las células más activas de la retina, contando con gran número de receptores y canales que son específicos de este tipo celular **(22)**.
- c. Microglía: se trata de células del sistema inmune procedentes del torrente sanguíneo que funcionan contra las invasiones de microorganismos, inician la respuesta inmune y llevan a cabo la reparación tisular **(22)**.

### Citoarquitectura

La arquitectura celular de la retina es muy compleja y se estudia en relación a las diferentes capas que podemos encontrar en ella. Así, cada capa estará definida por las células que hay en ella, especializadas en una función concreta. La retina sana, además, se caracteriza por tener una estructura extremadamente organizada, donde cada célula está en el número adecuado, localización concreta y con unas conexiones intercelulares determinadas.

De este modo, se pueden distinguir 10 capas ordenadas desde el exterior al interior (**Fig. 1**):

1. Epitelio pigmentario (EP).
2. Capa de los segmentos de los fotorreceptores (CF), tanto externos como internos.
3. Membrana limitante externa (MLE), constituida por los pies de las células de Müller.
4. Capa nuclear externa (CNE), donde se encuentran los núcleos de conos y bastones.
5. Capa plexiforme externa (CPE), en la que se encuentran las sinapsis entre los fotorreceptores y las células bipolares y horizontales.

6. Capa nuclear interna (CNI), formada por los núcleos de las células bipolares, horizontales y amacrinas.
7. Capa plexiforme interna (CPI), donde ocurre las sinapsis entre las células bipolares y las amacrinas y ganglionares.
8. Capa de las células ganglionares (CCG) en la que se encuentran los núcleos de las células ganglionares.
9. Capa de las fibras del nervio óptico (CFNO): se trata de los axones de las células ganglionares, que forman el nervio óptico.
10. Membrana limitante interna (MLI), cuya función es separar la retina del humor vítreo.

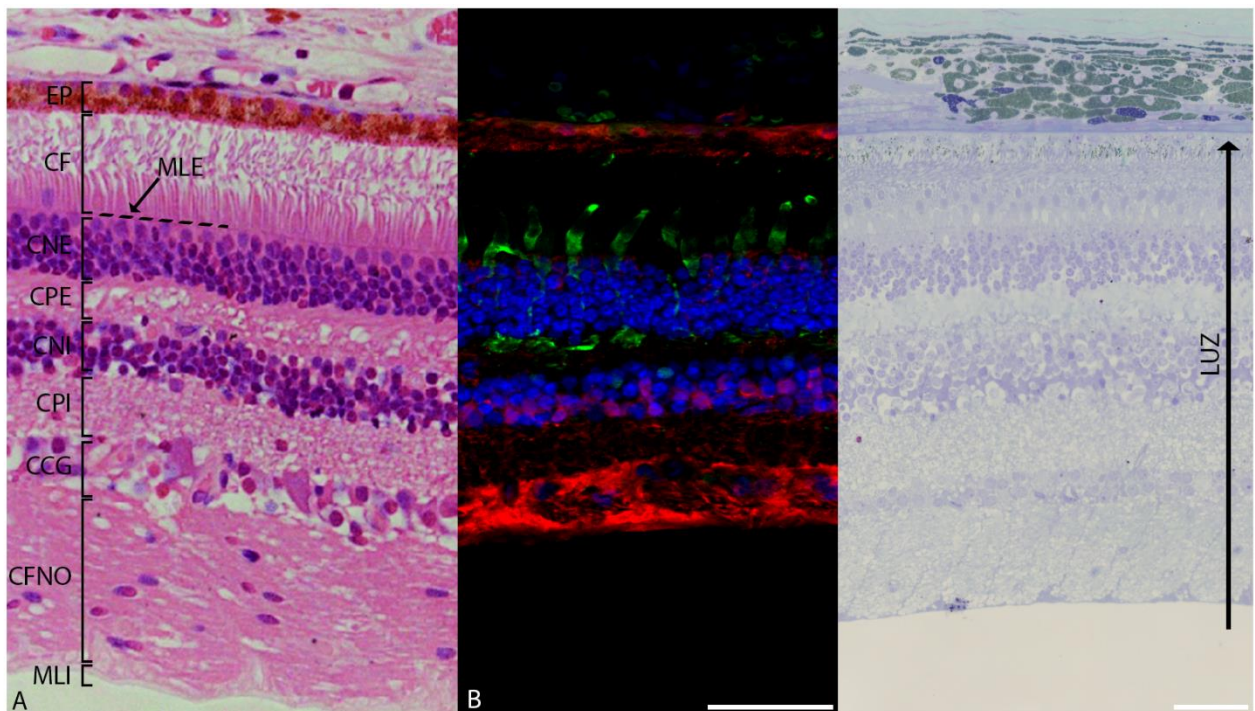


Figura 1. Composición mostrando las diferentes capas de la retina. A, modificada de (23), muestra un corte histológico de retina humana teñido con hematoxilina-eosina. B, corte de retina de *Macaca fascicularis* sobre el que se ha llevado a cabo una tinción inmunohistoquímica, marcando en verde la proteína Calbindina, en rojo CRB3 y en azul DAPI. C, corte semifino de retina de *Macaca fascicularis* teñido con azul de toluidina. Barras de escala: 50  $\mu\text{m}$ .

## Fototransducción

Se trata del proceso por el cual la energía lumínica (fotones) se convierte en estímulos nerviosos (señales químicas o eléctricas) que son transmitidos al cerebro. Tiene lugar en los segmentos externos de los fotorreceptores.

Fisiológicamente, la luz será percibida por los fotorreceptores, lo que producirá una hiperpolarización de las membranas que inicia el impulso nervioso (7). El grado de hiperpolarización de los fotorreceptores será dependiente de la cantidad de fotones absorbidos por unidad de tiempo.

Este impulso nervioso se transmitirá desde los fotorreceptores a las células bipolares y horizontales por sinapsis. Finalmente, las células ganglionares serán las encargadas de la recepción de todos los estímulos y de su transmisión a través del nervio óptico hasta la corteza cerebral.

### Proteínas de polaridad y distrofias retinianas

La polaridad celular es una característica esencial tanto para la formación de los tejidos como en el mantenimiento de su integridad. La pérdida de polaridad de los tejidos se considera un indicador de enfermedades como cáncer o las distrofias retinianas (24,25), pero también se requiere la polaridad celular para tareas como la división celular y una correcta distribución de los orgánulos. Entre las proteínas de polaridad, en la retina destacan los complejos Crb, Par y Scribble (Fig. 2), cuya presencia y correcto funcionamiento son completamente necesarios (26).

#### Crb

El complejo Crb abarca un conjunto de proteínas de polaridad (CRB1, CRB2, CRB3, PALS1 y PATJ) que se encuentran altamente conservadas en la escala evolutiva (27) y que tienen un rol importante en la formación de las uniones ocluyentes. Además, también se ha descrito su importante papel en morfogénesis y desarrollo, así como en tumorigénesis (28).

Así, se ha constatado que una ablación de *Crb1* y *Crb2* en el progenitor de las células retinianas en animales de experimentación dará lugar a una laminación anormal de la retina y un engrosamiento, dándose una situación similar a la amaurosis congénita de Leber, enfermedad que causa discapacidad visual en el ser humano (29). Igualmente, se han llevado a cabo estudios que demuestran que la pérdida de CRB2 presente en los bastones conlleva una pérdida progresiva de la sensibilidad al contraste (30).

#### Par

El complejo Par consta de proteínas conservadas en la evolución (PAR3, PAR6 y PKC) implicadas en el establecimiento de la polaridad en células epiteliales, neuroepiteliales y neuronas. Se considera la proteína PAR3 como uno de los principales actores de la determinación del axón en las neuronas (31,32).

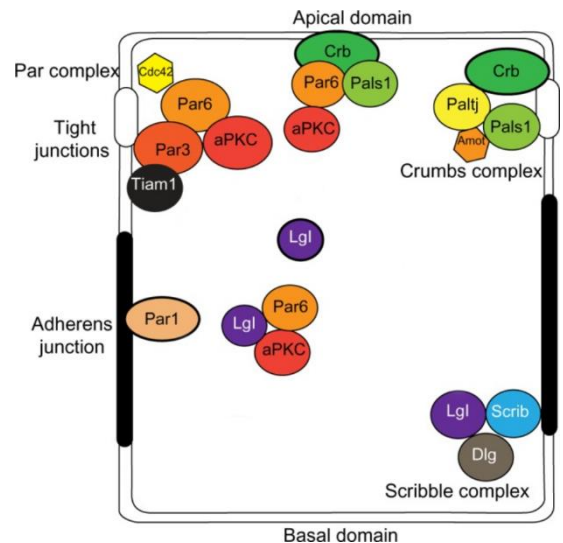


Figura 2. Esquema representativo de la localización subcelular de los diferentes complejos de polaridad. En esta imagen se observan las interacciones entre las diferentes proteínas de polaridad. Modificado de (25).

## Scribble

Este complejo, formado por proteínas como SCRIB, DLG1 y LGL2, tiene funciones como la de establecimiento de polaridad apicobasal y la de participar en la regulación de la migración y adhesión celular. Del mismo modo, se ha comprobado que la eliminación de esta proteína causa una función deficiente de E-cadherina, lo que hace que las uniones de tipo adherente no se formen (33).

## Justificación, hipótesis y objetivos

### Justificación

Como ya se ha mencionado en la introducción, las proteínas de polaridad tienen una función clave en la determinación celular en una amplia diversidad de órganos y tejidos. Así, es muy necesario conocer la distribución de estas proteínas y sus interacciones en condiciones normales, lo que permitirá establecer comparaciones con diferentes situaciones patológicas y describir su implicación en las diferentes distrofias retinianas. Estos conjuntos de proteínas y su distribución e interacción han sido ampliamente estudiados en la retina de mamíferos como ratón y rata, pero, a pesar de que son sus mutaciones en el ser humano las que sabe causan distrofias retinianas, no se ha realizado una caracterización específica en la retina de primates. Es por ello que en este trabajo nos hemos propuesto realizar un estudio más exhaustivo de la presencia de las proteínas de polaridad en la retina de *Macaca fascicularis*.

### Hipótesis

Nuestra hipótesis de partida es que las proteínas de polaridad, al ser un conjunto de proteínas que están altamente conservadas a lo largo de la evolución, tanto en su distribución como en su localización subcelular, se observarán en la retina de primates de forma análoga a lo descrito con anterioridad en otras especies de mamíferos.

### Objetivos

Los objetivos específicos de este trabajo son:

- 1- Optimizar un protocolo para la detección de proteínas por inmunofluorescencia utilizando como material biológico globos oculares de *Macaca fascicularis*, poniendo especial énfasis en la eliminación de la autofluorescencia innata de estos tejidos para facilitar la detección específica de las proteínas de interés.
- 2- Caracterizar la distribución de proteínas de polaridad de la retina de *Macaca fascicularis* en distintos tipos celulares identificados por la presencia de proteínas características de diferentes células.

- 3- Comparar la distribución de las proteínas de polaridad con lo ya descrito en otras especies. Así, se establecerá un punto intermedio entre lo descrito en roedores y lo que se conoce en el ser humano, siendo *Macaca fascicularis* evolutivamente más cercano a los humanos que otros modelos previamente utilizados (e.g. *Mus musculus*).

## Materiales y métodos

### Obtención de la muestra, fijación y crioprotección

Las porciones de retina de *Macaca fascicularis* analizadas en el presente trabajo fueron donadas por el grupo del Dr. David Williams (UCLA). Para la sedación de los animales de experimentación se empleó una mezcla de xilacina y ketamina, tras lo cual se realizó un desangrado por punción cardíaca. Los globos oculares fueron extraídos inmediatamente tras el sacrificio y la fijación se llevó a cabo utilizando 4 % paraformaldehído en tampón fosfato (TF) 0.1 M durante una semana y lavando el exceso de fijador con TF 0.1 M. Posteriormente, se obtuvieron fragmentos de cada porción de la retina neural para su análisis. Todos los procedimientos relacionados con el uso de animales de experimentación cumplen la directiva europea 2010/63/UE y española RD 53/2013.

La crioprotección se llevó a cabo utilizando soluciones crecientes de sacarosa (p/v) de 10, 20 y 30 % en TF 0.1M pH 7,4 durante 24 horas a 4 °C. Este proceso es necesario para poder llevar a cabo la congelación de las muestras, evitando que el agua presente en las células forme cristales y rompa las membranas celulares.

Posteriormente, se incluyeron las muestras en TissueTek<sup>®</sup> O.C.T. y se congelaron utilizando nitrógeno líquido, conservándolas a -20 °C hasta el momento de su seccionamiento.

Las secciones de 14 µm de grosor se obtuvieron utilizando un criostato CM1850 de Leica a -20 °C que se recogieron en portaobjetos Superfrost Ultra Plus<sup>®</sup> de ThermoFisher Scientific, y se conservaron a -20 °C hasta el proceso de tinción por inmunofluorescencia.

### Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia se trata de una técnica de inmunomarcaje que permite la detección de proteínas mediante la utilización de anticuerpos dirigidos contra residuos proteicos específicos. En este caso, se trata de inmunofluorescencia indirecta, puesto que el fluorocromo no está integrado en el anticuerpo primario, sino que se utiliza otra molécula (anticuerpo secundario) dirigida contra la fracción constante de los anticuerpos primarios, que contiene el fluorocromo.



## Preparación

Las muestras se dejaron descongelar durante 20 minutos a temperatura ambiente y se lavaron durante 10 minutos con tampón fosfato salino (TFS) pH 7,4 a temperatura ambiente. Seguidamente, se realizaron dos lavados a temperatura ambiente con TFS al que se añadió detergente Triton X-100 (TFS-Tx) (0.02 %) (v/v) para llevar a cabo la permeabilización de las membranas celulares y así, permitir el acceso de los anticuerpos al interior de las células.

## Preincubación

Se trata de un paso necesario para bloquear los sitios a los que se podrían unir de forma inespecífica los anticuerpos primarios utilizados y prevenir el marcaje de fondo. De este modo, se incubaron las muestras a temperatura ambiente en una solución de TFS-Tx (0.02 %) con BSA (bovine serum albumin, albúmina de suero bovino) 1 % (p/v) y 5 % (v/v) de suero del animal en el cual esté hecho el anticuerpo secundario, que en nuestro caso fue siempre suero de burro (sDK).

## Protocolos para reducir la autofluorescencia de los tejidos

Para llevar a cabo la eliminación de la autofluorescencia propia de este tejido, se probaron diferentes protocolos y así valorar la idoneidad de cada uno de ellos.

### 1. Sudan Black

Se trataron las muestras utilizando una disolución de Sudan Black al 0.3 % en etanol 70 % durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se dieron 4 lavados de 8 minutos en TFS-Tx (0.02 %) para eliminar el exceso de reactivo.

### 2. Azul de tripano

Se utilizó solución Trypan Blue Gibco (0.4 %) en TFS y durante 10 minutos en agitación. A continuación, se realizaron 4 lavados de 5 minutos con TFS-Tx (0.02 %).

### 3. Borohidruro de sodio

Se utilizó borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) a diferentes concentraciones (0.25 %, 0.50 % y 0.75 %) en TFS durante 10 o 15 minutos en agitación bajo una fuente de luz potente. Por último, se llevaron a cabo 2 lavados de 10 minutos con TFS-Tx (0.02 %).

### 4. Triton X-100 Surfact-Amps

Se hicieron diferentes pruebas aumentando y disminuyendo la concentración del detergente Triton en TFS (0.3 %, 0.1 % y 0.02 %) que se utiliza en todas las etapas del protocolo de inmunofluorescencia.

### Incubación del anticuerpo primario

Las muestras se incubaron con los anticuerpos seleccionados diluidos en TFS-Tx (0.02 %), BSA (1 %) y sDK (2 %) durante 24 horas a 4 °C. A continuación, las muestras se lavaron 3 veces en TFS-Tx (0.02 %) para eliminar el exceso de anticuerpo primario. Las concentraciones empleadas son variables dependiendo del anticuerpo en cuestión y se recogen en la siguiente tabla.

Anticuerpo	Casa comercial	Referencia comercial	Concentración
α GFAP	Sigma	G6171	1/500
α Calbindina	Swant	300	1/500
α CRALBP	abcam	ab15051	1/100
α CRB2	ThermoFisher (Invitrogen)	PA5-25628	1/100
α CRB3	ThermoFisher (Invitrogen)	PA5-53092	1/500
α CRB3	abcam	ab173169	1/500
α Glutamina sintetasa	Millipore	MAB302	1/500
α Ki67	abcam	ab15580	1/250
α Kir4.1	abcam	ab80959	1/400
α PALS-1	Millipore	07-708	1/200
α Parvoalbúmina	Swant	PV6-214	1/500
α PKC α	ThermoFisher (Invitrogen)	MA1-157	1/75
α PNA-FITC	Sigma	L7381	1/500
α Recoverina	Millipore	AB5585	1/1000
α Recoverina	Santa Cruz Biotechnologies	6A55CD6	1/100

### Incubación del anticuerpo secundario

Las muestras se incubaron con la mezcla de anticuerpos secundarios AlexaFluor® 488 y AlexaFluor® 555 dirigidos contra la fracción constante de los anticuerpos primarios a una concentración de 1/750 (v/v) en una disolución TFS-Tx (0.02 %), BSA (1 %), sDK (2 %) a temperatura ambiente durante 1 hora. Además, también se añadió el marcador nuclear DAPI (se une a secuencias de ADN ricas en timina y adenina) a una concentración 1/1000 (v/v).

Por último, se procedió a lavar las muestras dos veces durante 10 minutos en TFS-Tx (0.02 %) para eliminar el exceso de anticuerpos secundarios y una última vez en TFS para evitar la posible fluorescencia que podría proporcionar el Triton X-100.

También se han llevado a cabo controles negativos, sin añadir anticuerpos primarios y/o secundarios, para comprobar la especificidad del protocolo.

### Montaje

El montaje se llevó a cabo colocando un cubreobjetos, utilizando como agente fijador Prolong® Gold Antifading Reagent, un medio de montaje que protege los fluorocromos del proceso conocido como “photobleaching”, causante de la pérdida de fluorescencia durante las sesiones de microscopía.

## Obtención y procesamiento de imágenes

Para visualizar el marcaje de las secciones se emplearon un microscopio invertido Axio Observer Z1 (Zeiss) y el software Zen Pro 3.2 y un microscopio confocal invertido DMI8 Leica Stellaris con el programa LAS X. Las moléculas fluorescentes AlexaFluor<sup>®</sup> 555 y AlexaFluor<sup>®</sup> 488 se excitaron con láseres cuyas longitudes de onda son 543 y 488 nm, respectivamente; DAPI se visualizó por excitación del láser de longitud de onda de 358 nm. La captura de las imágenes se realizó utilizando los láseres secuencialmente. Las secciones se eligieron en base a la integridad de la retina y las zonas donde se observara un marcaje óptimo de las proteínas conocidas tomadas como referencia.

Por otro lado, las imágenes de campo claro se obtuvieron con un microscopio Olympus PROVIS AX70 y el software DP Controller-DP Manager.

Finalmente, se realizaron ajustes de corrección, redimensionamiento y rotulación utilizando el software de procesamiento de imágenes Adobe<sup>®</sup> Photoshop<sup>®</sup> CS6.

## Resultados

### Optimización del protocolo

Para eliminar la autofluorescencia de las muestras de retina de *Macaca fascicularis*, se realizaron distintos protocolos (Fig. 3). Por un lado, se probaron diferentes concentraciones del detergente Triton X-100 para evaluar la concentración idónea a emplear en los cortes de retina de primate, teniendo en

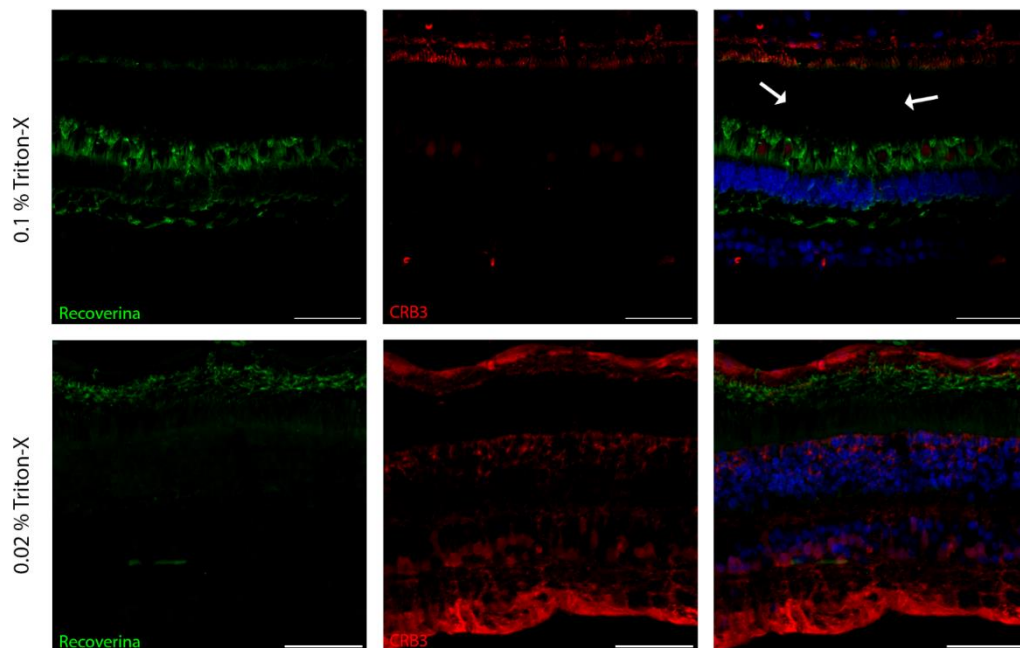


Figura 3. Análisis de los resultados de los diferentes protocolos de eliminación de fluorescencia inespecífica previos a la técnica de inmunohistoquímica. Comparación entre los resultados obtenidos utilizando 0.1 % y 0.02 % de detergente TritonX. En ambos casos, los núcleos celulares se marcan en azul con DAPI. Las flechas señalan zonas de rotura del tejido. Barras de escala: 50  $\mu$ m.

cuenta que todos estos tratamientos pueden ser agresivos con la estructura celular. De entre todas las concentraciones probadas, la que ofreció mejores resultados fue 0.02 % Tx, que muestra una mayor reducción de la autofluorescencia del fondo y la retina resultó menos dañada por el proceso.

Por otro lado, también se probaron protocolos con diferentes agentes químicos que han sido empleados ampliamente para eliminar la autofluorescencia de los tejidos y mejorar la especificidad de la señal emitida, contrastando con los controles negativos llevados a cabo (Fig. 4).

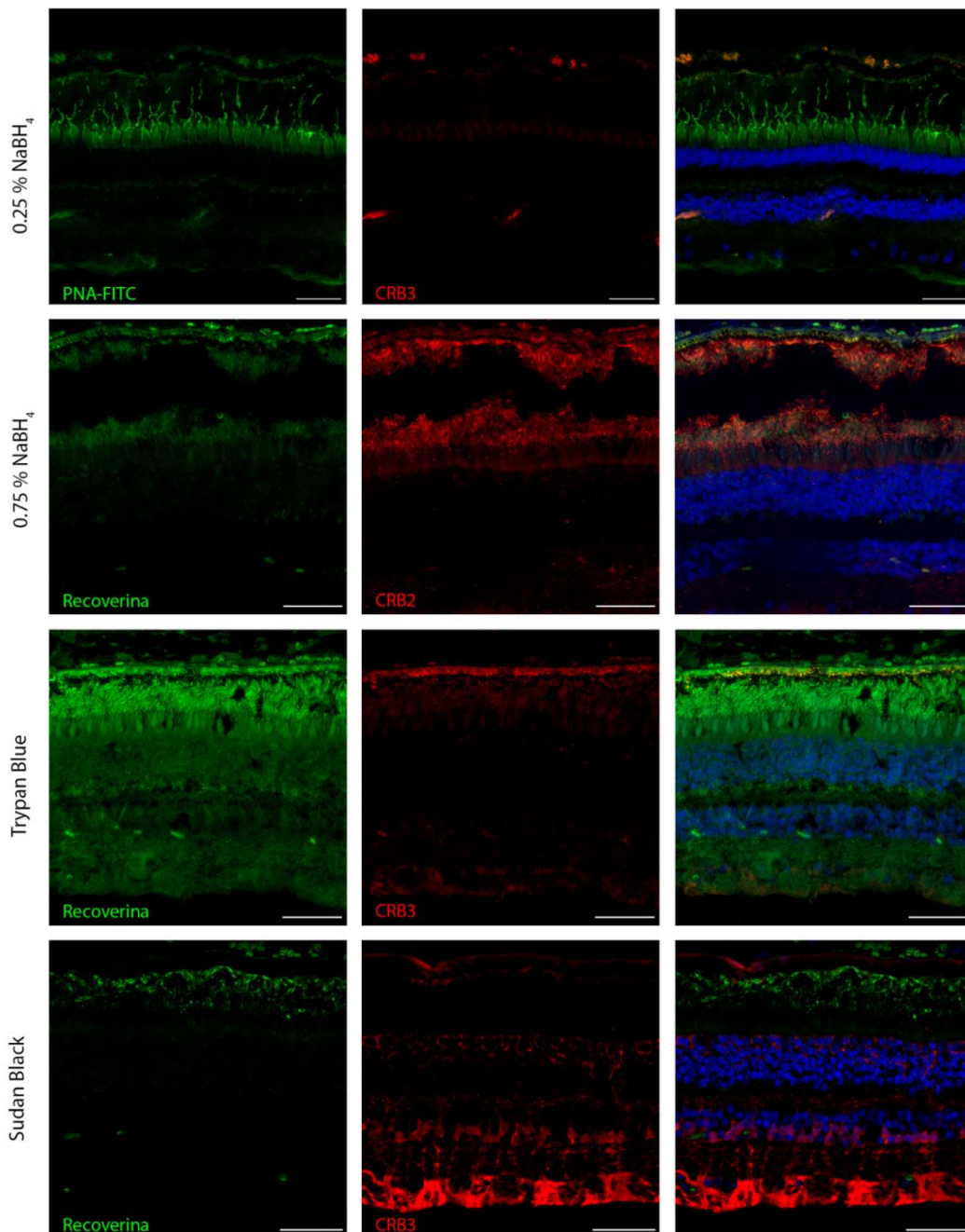


Figura 4. Análisis de la expresión de las proteínas Recoverina y CRB3 y marcaje de los conos con PNA-FITC en comparación con la emisión de autofluorescencia según la utilización de los diferentes métodos para eliminar autofluorescencia. Núcleos marcados en azul con DAPI en todos los casos. Barras de escala: 50  $\mu$ m.

En primer lugar, utilizando cualquiera de las concentraciones de borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) conocidas para este fin, se observó que el tejido se daña y que no es suficientemente eficaz para eliminar la autofluorescencia en los cortes de retina de *M. fascicularis*, y, además, se mantiene marcaje de fondo.

En segundo lugar, el uso del azul de tripano presenta una menor agresividad con el tejido, preservando su integridad, pero el marcaje sigue presentando fondo, lo que hace que la señal sea menos clara.

Por último, empleando el protocolo con Sudan Black, se observa que las estructuras celulares se mantienen intactas y, además, el marcaje de autofluorescencia de fondo se elimina completamente, asegurando por tanto que el resultado obtenido con los anticuerpos empleados se debe a una señal completamente específica.

Así, se puede llegar a la conclusión de que el agente más efectivo para eliminar la autofluorescencia propia de la retina de *Macaca fascicularis* es el Sudan Black y ha sido el empleado para el resto de los experimentos mostrados en el presente Trabajo Fin de Grado.

#### Localización de proteínas del complejo Crb en la retina de *Macaca fascicularis*

El análisis de las secciones de retina de *Macaca fascicularis* a microscopía de fluorescencia después de las distintas pruebas permitió determinar la distribución y localización de las proteínas analizadas (Figuras 5 y 6).

El marcaje inmunohistoquímico para CRB3 mostró que esta proteína está presente en la capa del EP, siendo el marcaje especialmente intenso en la cara apical de estas células. El marcaje para CRB3 recorre la MLE en toda su extensión y está ausente de los segmentos de los fotorreceptores. Además, en la CNE se observa un patrón reticulado de la tinción (Fig. 5C), que se extiende desde la MLE hacia el interior de la retina, marcando lo que parecen ser prolongaciones celulares. El marcaje de CRB3 es especialmente intenso en la zona más interna de la CNI, donde se aprecia con mucha definición que se encuentra en somas celulares (Fig. 5D). Desde estas somas se observan prolongaciones que avanzan tanto hacia el interior como hacia el exterior de la retina de una forma continua. Hacia las capas externas se observa un marcaje que es el que toma apariencia reticulada en la CNE. Este marcaje continúa hasta la MLE, por donde se extiende. En las capas internas se pueden identificar diferentes prolongaciones celulares de forma individual, que llegan a agruparse. Por último, el marcaje de CRB3 se extiende a lo largo de toda la MLI.

Con el fin de determinar en qué tipo (o tipos) celular/es se expresa CRB3, se estableció una comparación con diferentes marcadores específicos de tipos celulares retinianos. Marcando



recoverina, una proteína implicada en el ciclo visual y en el reciclaje de los pigmentos fotosensibles, localizada en los segmentos externos de los fotorreceptores en la retina de *M. fascicularis*, no se observó colocalización con CRB3 (Fig. 5A). Para identificar los conos (en la CNE y CF) y las células bipolares de cono (en la CNI), se usaron anticuerpos para marcar la proteína calbindina (Fig. 5B-D).

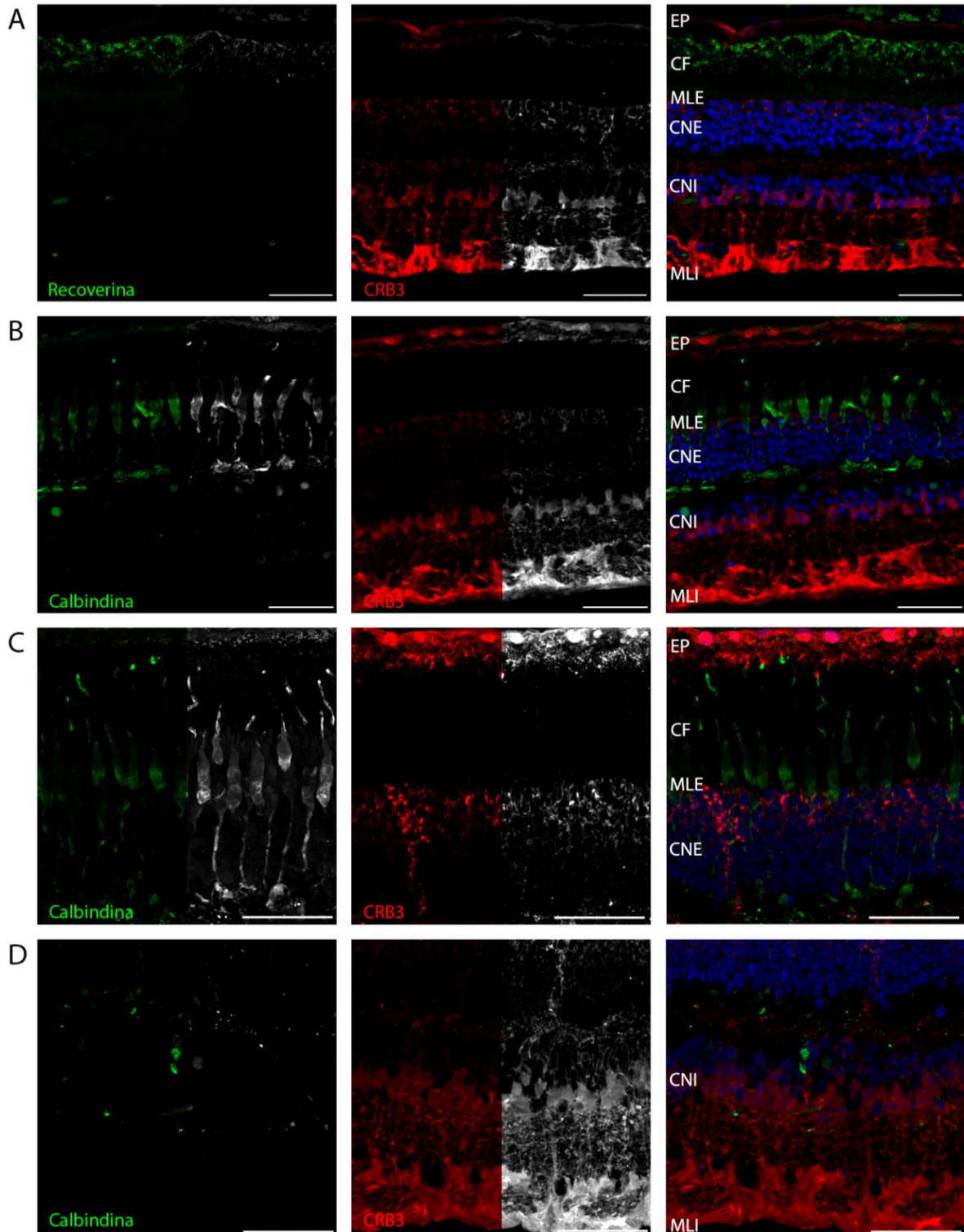


Figura 5. Visualización de las proteínas en retina de primate mediante técnica inmunofluorescente. En las imágenes de la primera y segunda columna, los colores rojo y verde se han transformado en blanco para permitir una visualización más clara del patrón de inmunomarcaje. Barras de escala: 50  $\mu$ m.



Así, se comprobó que su localización y la de CRB3 no coincidían. De hecho, en la figura 5 se observa que el marcaje para CRB3 rodea y envuelve los perfiles positivos para calbindina, una interacción especialmente evidente tanto en la CNE como en la CNI. La proteína parvalbúmina está relacionada con la señalización celular mediada por calcio y en retina está presente en las células amacrinas (CNI). Contrastando su localización con la de CRB3 en una doble inmunotinción, se comprobó que estas proteínas no coincidían en este tipo celular (Fig. 6A). La proteína de unión a retinaldehído celular 1 (CRALBP) tiene un papel importante en las conversiones enzimáticas de los pigmentos fotosensibles. Esta proteína se expresa en células de Müller (CNI) y epitelio pigmentario y la doble inmunofluorescencia con CRB3 mostró que estas dos proteínas se expresan en el soma y algunas

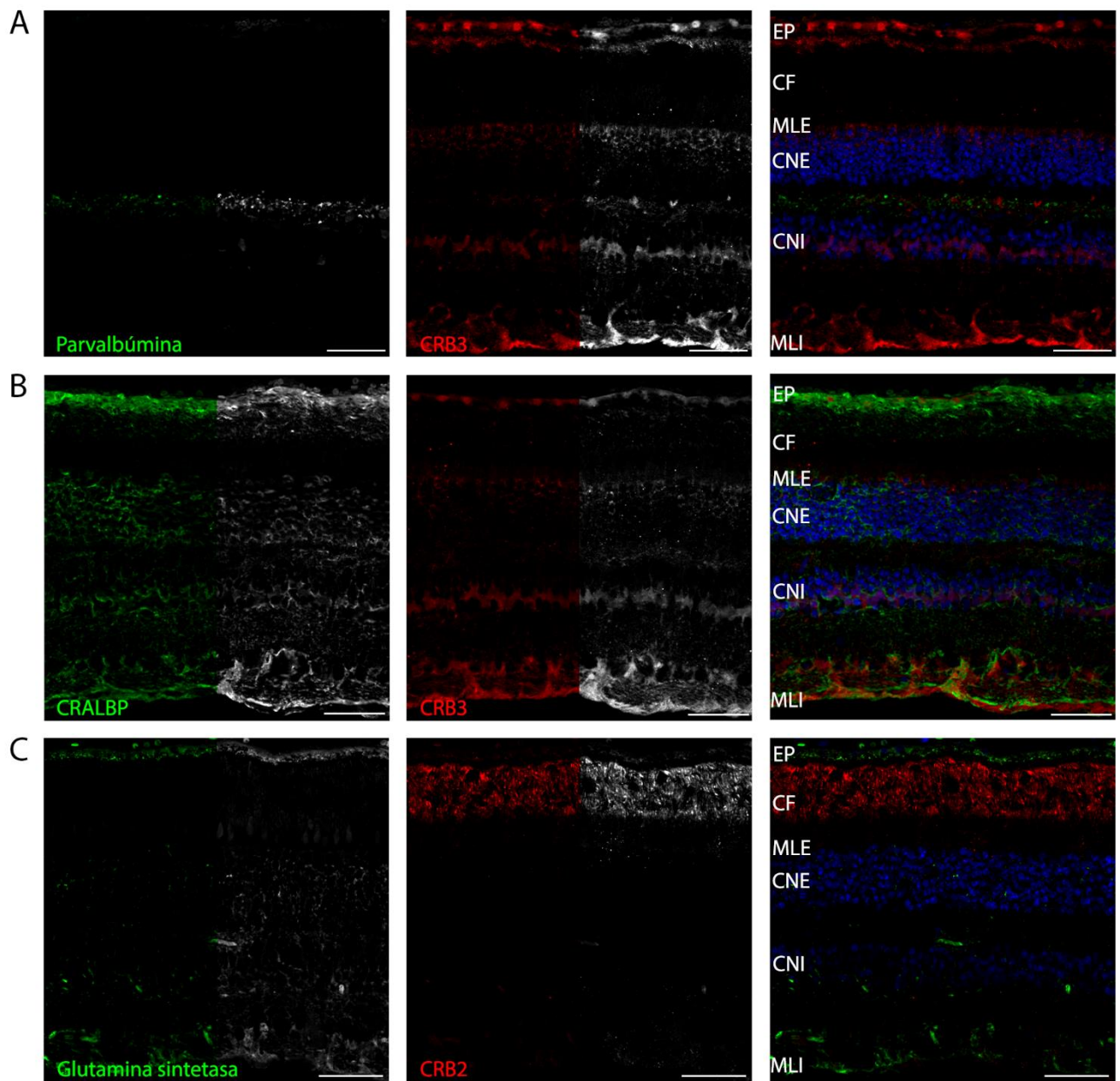


Figura 6. Visualización de las proteínas en retina de primate mediante técnica inmunofluorescente. En las imágenes de la primera y segunda columna, los colores rojo y verde se han transformado en blanco para permitir una visualización más clara del patrón de inmunomarcaje. Barras de escala: 50  $\mu$ m.

prolongaciones de las células de Müller, especialmente en la porción más escleral de la CNE, en la CNI y en las expansiones de estas células que forman la MLI (Fig. 6B).

Así, podemos afirmar que CRB3 se expresa en el soma y las prolongaciones de las células de Müller en retina de *Macaca fascicularis* y, además, en el EP se expresan tanto CRB3 como CRALBP aunque no colocalizan.

Por otro lado, también se ha investigado la localización de CRB2, otra proteína del complejo Crb en la retina de *M. fascicularis*. Se ha observado que esta proteína se expresa abundantemente en la zona de los segmentos de los fotorreceptores (CF), en concreto en los segmentos externos, así como en la zona apical de las células del EP. Además, se llevó a cabo un doble marcaje para CRB2 con glutamina sintetasa (Fig. 6C), proteína implicada en el metabolismo del nitrógeno que se expresa en las células de Müller, lo que permitió descartar la presencia de CRB2 en este tipo celular en la retina de primate.

## Discusión y conclusiones

### Permeabilización de membranas

Uno de los grandes retos que conlleva la técnica inmunohistoquímica es el de conseguir que los anticuerpos, moléculas relativamente grandes (entre 15 y 20 nm de diámetro), puedan alcanzar los péptidos contra los que se dirigen difundiéndose por el tejido (34). Por ello, se hace necesario incluir en todo el proceso un agente que permeabilice el tejido y permita la correcta penetración de los anticuerpos en las secciones de muestra. En nuestro caso, se utiliza el detergente Triton X-100 Surfact-Amps a lo largo de todo el proceso, retirándolo en el último lavado.

Debido a la naturaleza de este producto, se debe encontrar un equilibrio en la concentración utilizada acorde con el estado de las muestras; en caso de utilizar una concentración elevada, se puede provocar el colapso de las estructuras celulares y utilizándolo en cantidades deficientes no se conseguirá que los anticuerpos penetren las células. A pesar de que en otros estudios se utilizó a una concentración de 0.1 % (35), la concentración que permitió el equilibrio en nuestro caso fue de 0.02 % Tx en TFS.

### Eliminación de la autofluorescencia

La autofluorescencia ha supuesto desde siempre un gran problema en el uso de técnicas inmunohistoquímicas, pues hace que no se pueda distinguir el marcaje de fondo del generado por la técnica, por lo que no se consigue distinguir la especificidad del marcaje. En general, las técnicas inmunohistoquímicas aplicadas a muestras del sistema nervioso de animales de avanzada edad suelen ser problemáticas por la presencia de lipofucsina (6,36,37). Se trata de un pigmento fluorescente que se acumula en el citoplasma de las células del SNC y que tiene un amplio espectro de excitación y de

emisión. Es por ello que complica enormemente los experimentos a la hora su visualización, puesto que la señal emitida por la lipofucsina y por el fluoróforo de elección no se pueden discernir. Podría parecer conveniente utilizar ejemplares menos longevos para este cometido, pero los primates comienzan a acumular lipofucsina desde incluso antes de los 4 meses tras su nacimiento (6).

Por ello, en primer lugar utilizamos  $\text{NaBH}_4$ , el protocolo que se utiliza en nuestro laboratorio de forma rutinaria y con buenos resultados para el tratamiento de muestras de roedores (38), pero, en el caso de las retinas de primate, la estructura del tejido parecía verse afectada. Esto podría explicarse debido a la formación de numerosas burbujas y a la interacción de reducción-oxidación del  $\text{NaBH}_4$  con los aldehídos de la muestra.

En segundo lugar, probamos a utilizar Trypan Blue por su amplio uso en la literatura para la reducción de autofluorescencia en células y por los resultados obtenidos por otros grupos (34,39). Observamos que en la autofluorescencia se reducía en el canal para el rojo, pero no ocurría así para el verde, cuyo marcaje seguía siendo deficiente por la emisión de la lipofucsina en ese espectro, lo que hace que la señal no sea específica.

Por último, pusimos a prueba el colorante lipofílico Sudan Black que, por sus propiedades químicas, no altera estructuralmente la lipofucsina, sino que simplemente la recubre y la hace opaca (6), con lo que no produjo daños en el tejido y consiguió paliar la autofluorescencia. A diferencia de lo establecido en el trabajo citado, donde aplicaban este tratamiento tras haber realizado el ensayo inmunohistoquímico, en nuestro protocolo implementamos el uso del Sudan Black en el paso posterior a la preincubación (37). De este modo, conseguimos evitar el efecto indeseado del colorante descrito por los autores que provoca una reducción de la emisión de los anticuerpos secundarios.

#### Distribución de las proteínas de polaridad

Por último, respecto a la distribución de las proteínas del complejo de polaridad Crb, la más estudiada en retina es CRB1. Además, no conocemos que a día de hoy haya ningún estudio dedicado exclusivamente a definir la distribución de sus homólogos 2 y 3 en primates. Así, el detalle de la distribución de CRB2 y CRB3 que hemos descrito en retina de *M. fascicularis* en el presente TFG permite establecer una comparación con su distribución conocida en otras especies, tanto humanos como murinos. Para caracterizar la presencia de las proteínas CRB en los diferentes tipos celulares, nos hemos basado en la colocalización con proteínas específicas de cada tipo celular retiniano previamente descritas y caracterizadas (40), de modo que se pueden discriminar e identificar las diferentes células retinianas.

En cuanto a la expresión de CRB2 en la retina de *M. fascicularis* y su presencia en los segmentos externos de los fotorreceptores, estas observaciones difieren de lo que se ha descrito en trabajos previos en murinos (41), que han detectado esta proteína en la MLE. Sin embargo, la localización de esta proteína en la cara apical del EP sí coincide con lo observado en estos modelos experimentales (26). Por otro lado en retinas humanas, existe cierta controversia sobre los tipos celulares donde se localiza CRB2, puesto que algunos trabajos describen su presencia en las células de Müller y su ausencia en los fotorreceptores y en el EP (42), mientras que otros afirman que se halla en los segmentos de los fotorreceptores (externos o internos dependiendo de la especie) (43), estando en humanos en los segmentos internos. Esta inversión de la localización en diferentes escalones evolutivos podría deberse a la necesidad del establecimiento de mecanismos de redundancia y compensación para evitar la pérdida de función que supone un defecto en las proteínas de este complejo, mecanismo descrito previamente en neuronas de ratón (28).

La localización de CRB3 en la cara apical del EP y en la MLE (formada por células de Müller y fotorreceptores) ya ha sido descrita anteriormente en retina de murinos (38). Este trabajo aporta las primeras evidencias de la localización de CRB3 en el soma de las células de Müller, que no había sido detectada en retina de ratón, a diferencia de su presencia en la MLE, que sí había sido descrita (38,44). En contraste, la presencia de CRB3 en toda la extensión de las células de Müller coincide con la expresión de CRB1 y se ha demostrado que la ausencia de esta última en este tipo celular concreto da lugar a situaciones patológicas como la amaurosis congénita de Leber y la retinitis pigmentaria (45). La localización de CRB3 a lo largo de la MLE descrita en el presente trabajo coincide con la localización ya descrita para CRB1 y PALS1 en retina humana por otros autores (41), siendo el segundo esencial para la correcta localización del resto de proteínas del complejo Crb. Hasta la fecha se desconocía si en primates seguía ese patrón de expresión. Además, en humanos se han descrito diferentes isoformas de las proteínas CRB cuya expresión no se ha estudiado en primates, por lo que se trata de una línea futura complementaria a este trabajo, para entender mejor los mecanismos en los que las proteínas de este complejo podrían estar implicadas (43).

En **conclusión**, los resultados de este trabajo son relevantes porque es la primera vez que se ha llevado a cabo un estudio concreto de la distribución de proteínas del complejo Crb en retinas de primates, optimizando el protocolo de inmunofluorescencia. Interpretando estos experimentos y teniendo en cuenta que la falta de estas proteínas en otras especies ha dado lugar a diferentes enfermedades, creemos que se trata de un punto de partida para poder dilucidar los mecanismos esenciales para el correcto funcionamiento de la retina en los que estas proteínas conservadas en la escala evolutiva participan.

## Bibliografía

1. Hildebrand GD, Fielder AR. Anatomy and physiology of the retina. In: *Pediatric Retina*. Springer Berlin Heidelberg; 2011. p. 39–65.
2. Masland RH. The fundamental plan of the retina. Vol. 4, *Nature Neuroscience*. 2001. p. 877–86.
3. Bringmann A, Syrbe S, Görner K, Kacza J, Francke M, Wiedemann P, et al. The primate fovea: Structure, function and development. Vol. 66, *Progress in Retinal and Eye Research*. Elsevier Ltd; 2018. p. 49–84.
4. Chow RL, Lang RA. Early Eye Development in Vertebrates. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001 Nov 28;17(1):255–96.
5. Lakkaraju A. Endo-lysosome function in the retinal pigment epithelium in health and disease. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2012. p. 723–9.
6. Schnell SA, Staines WA, Wessendorf MW. Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue. *J Histochem Cytochem*. 1999 Jun 26;47(6):719–30.
7. Masland RH. The Neuronal Organization of the Retina. Vol. 76, *Neuron*. 2012. p. 266–80.
8. Marmor FM, Wolfensberger TJ. The retinal pigment epithelium. *Function and Disease*. 1998. p. 103–34.
9. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. Vol. 85, *Physiological Reviews*. 2005. p. 845–81.
10. Szél Á, Röhlich P, Caffé AR, Van Veen T. Distribution of cone photoreceptors in the mammalian retina. *Microsc Res Tech*. 1996;35(6):445–62.
11. Rieke F. Mechanisms of single-photon detection in rod photoreceptor. Vol. 316, *Methods in Enzymology*. Academic Press Inc.; 2000. p. 186–202.
12. González-Soriano J. Morphological types of horizontal cell in rodent retinae: A comparison of rat, mouse, gerbil, and guinea pig. *Vis Neurosci*. 1994 May 1;11(3):501–17.
13. Ramón y Cajal S. La retina des vertebres. In: *The vertebrate retina*. 1893. p. 775–94.
14. Nawy S, Von Gersdorff H. Bipolar cells in the vertebrate retina: From form to function. Vol. 28, *Visual Neuroscience*. 2011. p. 1–2.
15. Strettoi E, Novelli E, Mazzoni F, Barone I, Damiani D. Complexity of retinal cone bipolar cells. Vol. 29, *Progress in Retinal and Eye Research*. 2010. p. 272–83.
16. Akrouh A, Kerschensteiner D. Morphology and function of three VIP-expressing amacrine cell types in the mouse retina. *J Neurophysiol*. 2015 Aug 26;114(4):2431–8.
17. MacNeil MA, Masland RH. Extreme diversity among amacrine cells: Implications for function. *Neuron*. 1998;20(5):971–82.
18. Schmidt TM, Chen SK, Hattar S. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: Many subtypes, diverse functions. Vol. 34, *Trends in Neurosciences*. 2011. p. 572–80.
19. Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: Architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* (80- ). 2002 Feb 8;295(5557):1065–70.
20. Holländer H, Makarov F, Dreher Z, van Driel D, Chan-Ling T, Stone J. Structure of the macroglia of the retina: Sharing and division of labour between astrocytes and Müller cells. *J Comp Neurol*. 1991 Nov 22;313(4):587–603.
21. Stone J, Dreher Z. Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of the retina. *J Comp Neurol*. 1987;255(1):35–49.
22. Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, et al. Müller cells in the healthy and diseased retina. Vol. 25, *Progress in Retinal and Eye Research*. 2006. p. 397–424.
23. Trivio A, De R, Rojas B, Gallego BI, Ramirez AI, Salazar JJ, et al. Effects of Hypercholesterolaemia in the Retina. In: *Ocular Diseases*. InTech; 2012.
24. Ellenbroek SIJ, Iden S, Collard JG. Cell polarity proteins and cancer. Vol. 22, *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press; 2012. p. 208–15.
25. Chatterjee SJ, McCaffrey L. Emerging role of cell polarity proteins in breast cancer progression and metastasis. *Breast*



- Cancer Targets Ther. 2014;6(0):15–27.
26. Paniagua AE, Herranz-Martín S, Jimeno D, Jimeno ÁM, López-Benito S, Carlos Arévalo J, et al. CRB2 completes a fully expressed Crumbs complex in the Retinal Pigment Epithelium. *Sci Rep*. 2015 Sep 25;5(1):14504.
  27. Richard M, Roepman R, Aartsen WM, van Rossum AGSH, den Hollander AI, Knust E, et al. Towards understanding CRUMBS function in retinal dystrophies. *Hum Mol Genet*. 2006 Oct 15;15(SUPPL. 2):R235–43.
  28. Dolón JF, Paniagua AE, Valle V, Segurado A, Arévalo R, Velasco A, et al. Expression and localization of the polarity protein CRB2 in adult mouse brain: a comparison with the CRB1rd8 mutant mouse model. *Sci Rep*. 2018 Dec 1;8(1):1–13.
  29. Pellissier LP, Alves CH, Quinn PM, Vos RM, Tanimoto N, Lundvig DMS, et al. Targeted Ablation of Crb1 and Crb2 in Retinal Progenitor Cells Mimics Leber Congenital Amaurosis. Blackshaw S, editor. *PLoS Genet*. 2013 Dec 5;9(12):e1003976.
  30. Alves CH, Boon N, Mulder AA, Koster AJ, Jost CR, Wijnholds J. CRB2 Loss in Rod Photoreceptors Is Associated with Progressive Loss of Retinal Contrast Sensitivity. *Int J Mol Sci*. 2019 Aug 21;20(17):4069.
  31. Chen J, Zhang M. The Par3/Par6/aPKC complex and epithelial cell polarity. Vol. 319, *Experimental Cell Research*. Academic Press Inc.; 2013. p. 1357–64.
  32. Pichaud F. PAR-Complex and crumbs function during photoreceptor morphogenesis and retinal degeneration. Vol. 12, *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2018.
  33. Qin Y, Capaldo C, Gumbiner BM, Macara IG. The mammalian Scribble polarity protein regulates epithelial cell adhesion and migration through E-cadherin. *J Cell Biol*. 2005 Dec 19;171(6):1061–71.
  34. Stradleigh TW, Ishida AT. Fixation strategies for retinal immunohistochemistry. Vol. 48, *Progress in Retinal and Eye Research*. Elsevier Ltd; 2015. p. 181–202.
  35. Charrier LE, Loie E, Laprise P. Mouse Crumbs3 sustains epithelial tissue morphogenesis in vivo. *Sci Rep*. 2015 Dec 3;5(1):17699.
  36. Qin W, Luo M, Wang K, Yang M, Sheng H, He G. A combined treatment with erythrocyte lysis solution and Sudan Black B reduces tissue autofluorescence in double-labeling immunofluorescence. *Microscopy*. 2018 Dec 1;67(6):345–55.
  37. Wizenty J, Ashraf MI, Rohwer N, Stockmann M, Weiss S, Biebl M, et al. Autofluorescence: A potential pitfall in immunofluorescence-based inflammation grading. *J Immunol Methods*. 2018 May 1;456:28–37.
  38. Herranz-Martín S, Jimeno D, Paniagua AE, Velasco A, Lara JM, Aijón J, et al. Immunocytochemical Evidence of the Localization of the Crumbs Homologue 3 Protein (CRB3) in the Developing and Mature Mouse Retina. *PLoS One*. 2012 Nov 30;7(11):50511.
  39. Srivastava GK, Reinoso R, Singh AK, Fernandez-Bueno I, Hileeto D, Martino M, et al. Trypan Blue staining method for quenching the autofluorescence of RPE cells for improving protein expression analysis. Vol. 93, *Experimental Eye Research*. Academic Press; 2011. p. 956–62.
  40. Molday LL, Cheng CL, Molday RS. Cell-Specific Markers for the Identification of Retinal Cells and Subcellular Organelles by Immunofluorescence Microscopy. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2019. p. 293–310.
  41. Alves CH, Pellissier LP, Vos RM, Garrido MG, Sothilingam V, Seide C, et al. Targeted ablation of Crb2 in photoreceptor cells induces retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet*. 2014 Jul 1;23(13):3384–401.
  42. Pellissier L, Klooster J, Wijnholds J. CRB proteins expression and localization in human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014 Apr 30;55(13):2686.
  43. Quinn PM, Pellissier LP, Wijnholds J. The CRB1 complex: Following the trail of crumbs to a feasible gene therapy strategy. Vol. 11, *Frontiers in Neuroscience*. Frontiers Research Foundation; 2017.
  44. van Rossum AGSH, Aartsen WM, Meuleman J, Klooster J, Malysheva A, Versteeg I, et al. Pals1/Mpp5 is required for correct localization of Crb1 at the subapical region in polarized Müller glia cells. *Hum Mol Genet*. 2006 Sep 15;15(18):2659–72.
  45. Van De Pavert SA, Sanz AS, Aartsen WM, Vos RM, Versteeg I, Beck SC, et al. Crb1 is a determinant of retinal apical Müller glia cell features. *Glia*. 2007 Nov 1;55(14):1486–97.