

## **CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE MUERTE CELULAR INDUCIDO POR STICHOLISINA II EN CÉLULAS RAJI.**

Carmen Soto Febles <sup>1</sup>, Rancés Blanco Santana <sup>2</sup>, Tania Griñán Ramírez <sup>2</sup>, Justo Viera Alfonso <sup>2</sup>, Juan Carlos Rodríguez Cavas <sup>3</sup>, Ana María Hernández Vázquez <sup>2</sup>, Carlos Álvarez Valcárcel <sup>1</sup>.

1 Centro de Estudios de Proteínas, Facultad de Biología Universidad de La Habana, Cuba

2 Centro de Inmunología Molecular, La Habana, Cuba

3 Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología

Correo electrónico: carmensoto@fbio.uh.cu

### **RESUMEN**

Sticholisina II (St II) es una citolisina producida por la anemona marina *Stichodactyla helianthus*. Esta toxina posee una elevada afinidad por la esfingomielina e induce muerte celular a través de la formación de poros en las membranas. En este trabajo se caracteriza el mecanismo de muerte celular inducido por St II en células tumorales mediante el análisis de algunos aspectos morfológicos y bioquímicos utilizando como modelos células Raji y un mieloma en ratones Balb/c. La actividad citotóxica de St II contra células Raji se testó mediante la liberación de LDH y por la incorporación de yoduro de propidio a través del poro de la toxina. La actividad de las caspasas se determinó mediante un kit de detección de caspasas y se observaron las células al microscopio de fluorescencia. St II resultó ser citotóxica contra las células Raji. La formación de poro de St II en células Raji condujo a un incremento del volumen celular y a la liberación de los componentes citoplasmáticos, lo cual fue observado al microscopio 'óptico y que son característicos de una muerte celular por necrosis. En las células tratadas con St II no hubo inducción de caspasas, ni formación de cuerpos apoptóticos. La administración intratumoral de St II a un mieloma desarrollado en ratones Balb/c, demostró que la toxina indujo una necrosis extensa en el tumor sin provocar toxicidad sistémica aparente. Una mejor comprensión de la interacción de St II con las membranas puede contribuir al diseño racional de inmunotoxinas con potencial terapéutico.

## **INTRODUCCIÓN**

La Sticholisina II (St II) es una proteína citolítica producida por la anémona marina *Stichodactyla helianthus*. Esta toxina pertenece a la familia de las actinoporinas las cuales se caracterizan por una masa molecular de 20kDa, pI básico, capacidad de formar poros oligoméricos en membranas naturales y modelos y elevada afinidad por la esfingomiélin, considerándose a este fosfolípido su receptor natural (Lanio y col. 2001). Su actividad citotóxica y citolítica (Tejuca y col, 1999; Lanio y col, 2001) resulta con mayor probabilidad de la formación de poros oligoméricos hidrofílicos de alrededor de 1nm de radio en la membrana celular (Tejuca, y col, 2001). Se ha demostrado que la formación del poro por esta toxina en la membrana eritrocitaria conduce al movimiento de iones a favor de su gradiente electroquímico, y el agua accede al interior de la célula para equilibrar la descompensación osmótica que se genera ya que la hemoglobina no puede salir al exterior celular a través del poro. Los mecanismos de los cuales dispone la célula para contrarrestar este daño no son suficientes, de manera tal que el eritrocito rebasa su volumen crítico y estalla (Tejuca y col, 2001; Celedón y col, 2005). Se conoce que St II posee un sitio de reconocimiento a fosfocolina (Mancheño y col, 2003) y que se une a esfingomiélin y a la fosfatidilcolina no así al colesterol ni a fosfatidiletanolamina (Martínez y col. 2007). Los reportes sobre la acción de las actinoporinas en otros modelos celulares son escasos (Tejuca y col, 1999; Tejuca y col, 2004) y por lo general no abordan los cambios morfológicos y fisiológicos inducidos en las células por la acción de las toxinas. La pérdida de integridad de la membrana plasmática conlleva a la muerte celular. El estudio con la actinoporina RTX-A producida por la anémona *Heteractis crispa* sugiere un mecanismo de muerte mediado por apoptosis (Fedorov y col, 2010), lo que no se corresponde con ensayos realizados en proteínas formadoras de poros las cuales inducen un mecanismo de necrosis rápida en diferentes tipos celulares (Knapp y col, 2010).

Entre las aplicaciones más atractivas de esta toxina se encuentra la construcción de inmunotoxinas contra células tumorales y parasitarias (Tejuca y col, 2004) y su utilización como herramientas para liberar antígenos al citosol de las células del sistema inmune (Lanio y col, 2010).

El conocimiento de las alteraciones de la morfofisiología celular que se generan como resultado de la acción de St II resulta esencial para el diseño de conjugados con fines terapéuticos que incluyan a las proteínas formadoras de poros como elementos tóxicos o moduladores de la respuesta celular. En este trabajo nos proponemos evaluar algunos marcadores morfológicos y bioquímicos de la muerte celular inducida por la St II en células de linfoma B humano (Raji).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Purificación de la Sticholisina II.** La purificación de St II se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento previamente descrito por Lanio y col (2001). La determinación de la concentración de la proteína se realizó por medidas de absorbancia a una  $\lambda$  de 280 nm y se utilizó el coeficiente de extinción para St II de 1.87 mg/mL descrito previamente por Lanio y col., 2001.

**Actividad citotóxica de St II en células Raji.** Las células de linfoma B humano (células Raji) se cultivaron en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino 10 % y que contenía penicilina y estreptomina. La viabilidad celular se siguió mediante la tinción con Tripán Azul.

La actividad permeabilizante de St II en estas células se llevó a cabo mediante la incorporación de yoduro de propidio (PI) a través del poro de la toxina medida por citometría de flujo. Las suspensiones celulares se incubaron con la toxina y 5 min antes de la lectura en el citómetro de flujo se adicionó el PI. Las cinéticas se realizaron durante 25 min a diferentes concentraciones de toxina. Los resultados obtenidos se representan como porcentaje de células permeabilizadas en función del tiempo de ensayo.

### **Ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa.**

La determinación de la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del kit de detección de citotoxicidad de la LDH (Roche). El porcentaje de citotoxicidad se determinó mediante la siguiente ecuación: Citotoxicidad (%) =  $(DO-DL)/(DH-DL) \times 100$  donde:

DO es el valor de absorbancia experimental, DL es la absorbancia en ausencia de toxina (liberación espontánea de LDH), DH es la absorbancia en presencia de Tritón X-100 (1%).

A partir de estos valores se construyeron las curvas de citotoxicidad en función de la concentración de toxina y del ajuste a una función de Boltzman se determinó la concentración de toxina necesaria para la liberación del 50 % de la LDH presente en las células.

### **Cambios morfológicos inducidos por St II en células Raji.**

Las células Raji se incubaron con diferentes concentraciones de St II (0.1, 10, 100 y 1000 pM durante 10 min. Luego se secaron y se fijaron con formaldehído 4%. Las muestras se sometieron a la tinción con Hematoxilina/Eosina y se observaron al microscopio óptico.

#### **Formación de cuerpos apoptóticos inducidos por la toxina**

Las células Raji se incubaron con St II por 24 h en medio libre de suero. Luego se secaron y fijaron con formaldehído 4 %. Las muestras se sometieron a la tinción con Hematoxilina/Eosina y se observaron al microscopio óptico. Paralelamente se preparó el control negativo en ausencia de toxina y el control positivo en presencia de Doxorubicina.

#### **Activación de caspasas inducida por la toxina en células Raji**

La activación de caspasas fue determinada usando un Kit de ensayo de detección de caspasa (Immunochemistry Technologies, LLC) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células Raji se cultivaron a una densidad óptima para la inducción de apoptosis con Doxorubicina 0.5  $\mu$ M durante 24h. Paralelamente las células se incubaron con diferentes concentraciones sublétricas de St II. Las muestras se observaron bajo el microscopio de fluorescencia usando un filtro (excitación 550 nm, emisión 580 nm) para ver la fluorescencia roja de las células positivas a caspasas.

#### **Actividad antitumoral de St II in vivo.**

Para la evaluación de la actividad antitumoral de St II in vivo, se inocularon 32 ratones BALB/c con 300000 células de X63 en 200 $\mu$ L de PBS, por vía subcutánea en el flanco. Inmediatamente después los ratones de cada tratamiento se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos de 8 ratones cada uno. A los 14 días de inoculados, recibieron la primera dosis de St II por vía intratumoral. Las otras dos dosis la recibieron en días alternos durante 1 semana. Se monitoreó el volumen tumoral tres veces por semana y la supervivencia de los ratones. Pasado ese tiempo, los ratones se sacrificaron y se analizaron los tumores y los órganos (hígado, bazo, pulmón, riñón) para determinar la toxicidad de St II en los mismos y el efecto de St II en el tumor. Las muestras se sometieron a un análisis patológico.

### **RESULTADOS**

La sticholisina II es una proteína potencialmente citotóxica, lo cual parece ser el resultado de la formación de poros oligoméricos e hidrofílicos de alrededor de 1 nm de radio hidrodinámico interno tanto en membranas naturales como modelos (Tejuca y col., 1999; Lanio y col., 2001; Tejuca y col., 2001; Anderluh y Macek, 2002). Las actinoporinas son toxinas muy potentes que afectan a la casi totalidad de las células eucariontes sobre las cuales han sido ensayadas (Giraldi y col., 1976;

Ávila y col., 1988, 1989; Zorec y col., 1990; Batrukova y col, 1991; Pederzolli y col., 1995; Anderluh y Macek, 2002; 2003; Tejuca y col., 2004; Soletti y col., 2008; García y col., 2009; Ravindran y col., 2010; Sánchez y col., 2012). La razón para esta aparente no selectividad es que emplean la esfingomielina, un lípido ubicuo en las células animales, como aceptor de baja afinidad (Macek y col., 1995).

### **Actividad citotóxica de St II en células Raji**

La actividad citotóxica de St II se evaluó en células Raji como modelo para caracterizar el mecanismo de muerte celular inducida por estas toxinas. De acuerdo con los datos obtenidos a partir de mediciones realizadas en liposomas (De los Ríos y col, 1998), los poros formados por St II permiten la entrada de cationes al interior celular y por tanto de cationes propidios los cuales se asocian con los ácidos nucleicos y se obtiene como resultado un incremento de la intensidad de la fluorescencia del PI, lo que permite cuantificar las células permeabilizadas por las toxinas. (Alegre-Cebollada y col, 2006)

La actividad permeabilizante de St II en células Raji se llevó a cabo por la medición de la incorporación de PI (Figura 1A) a través del poro de la toxina medido por citometría de flujo. Como se puede observar, el tratamiento con las toxinas hizo a las células más permeables al fluoróforo y la señal fluorescente se detectó pocos minutos después de la adición de la toxina. La actividad permeabilizante de St II es dependiente de la dosis y del tiempo de ensayo En la Figura 1B, se muestra la incorporación de PI al interior celular a través del poro de St II en función del tiempo observada al microscopio de fluorescencia.

### **Cambios morfológicos inducidos por St II en células Raji observados al microscopio óptico.**

Para estudiar el efecto de St II sobre las células Raji mediante el microscopio óptico de campo brillante las células se incubaron con diferentes concentraciones de St II durante 10 minutos. Luego se sometieron a la tinción con hematoxilina/eosina y se observaron al microscopio 'óptico de campo brillante. Como se puede observar en las Figura 2 A y B, St II induce un incremento del volumen celular característico de una muerte celular por necrosis, con la liberación del contenido intracelular producto de la ruptura de la membrana celular como ha sido descrito por varios autores (Majno y Joris, 1995; Lecoeur y col, 2001), para caracterizar la muerte celular por necrosis oncolítica. Este resultado fue dependiente de la concentración de toxina en el ensayo (Figura 2C).

### **Formación de cuerpos apoptóticos inducidos por St II.**

Para evaluar la formación de cuerpos apoptóticos inducida por St II, se incubaron las células Raji con St II 100 pM durante 24 h. Pasado ese tiempo se sometieron a tinción con hematoxilina/eosina y posterior observación al microscopio 'óptico de campo brillante. Paralelamente se trataron células con Doxorubicina, un inductor de apoptosis. Como se puede observar en la Figura 3, la Doxorubicina fue capaz de inducir la aparición de cuerpos apoptóticos, en tanto, la toxina no indujo la formación de los mismos en las condiciones ensayadas, lo cual es característico de una muerte celular no apoptótica. La formación de cuerpos apoptóticos ocurre sin liberación del contenido citoplasmático u orgánulos subcelulares al medio externo ya que, a diferencia de la muerte celular por necrosis, no se produce rotura de la membrana plasmática.

#### **Activación de las enzimas caspasas inducida por St II en células Raji.**

La activación de las caspasas es una característica de la apoptosis. Las vías de señalización en la apoptosis convergen en la activación de las caspasas intracelulares las cuales propagan la señalización de muerte mediante la degradación de proteínas claves en la función celular. La Doxorubicina, provocó la activación de caspasas en un 65 %, en tanto, St II no mostró diferencias significativas con relación al control (aproximadamente un 10 %) medido por microscopía de fluorescencia (Figura 4). Este resultado sugiere que St II induce un mecanismo de muerte independiente de la activación de las caspasas.

#### **Actividad antitumoral de St II in vivo**

El análisis patológico mostró en el grupo control la existencia de células de carácter neoplásico con formas que variaban desde redondeadas a fusiformes, con núcleos claros y redondeados con varios nucléolos evidentes, presentando campos de células diferenciadas a moderadamente diferenciadas así como zonas pequeñas de necrosis con predominio de neutrófilos. En los grupos tratados con St II se evidenció un área extensa de necrosis intratumoral en varios campos con predominio de neutrófilos, que rompía la infraestructura tumoral, evidenciándose una posible acción antineoplásica (Figura 5). Los órganos analizados de los animales tratados con St II no mostraron alteraciones aparentes con relación a los órganos del grupo control (no tratado).

#### **CONCLUSIONES**

1. La actividad permeabilizante de las sticholisinas medida por la incorporación de yoduro de propidio a través del poro de la toxina resultó ser dependiente de la dosis y del tiempo de reacción.
2. La incubación de células de linfoma B humano con concentraciones sublétales de St II durante 24 h no indujo activación de caspasas a diferencia de las células tratadas con Doxorubicina, un inductor de apoptosis.

3. La incubación de las células Raji con St II provocó hinchamiento celular así como la liberación del contenido citoplasmático al medio extracelular y no ocurrió formación de cuerpos apoptóticos mediante microscopia óptica a diferencia de las células tratadas con Doxorubicina donde si se evidencia la formación de éstos.

5 El análisis anatomopatológico del efecto intratumoral de St II mostró una extensa necrosis con predominio de neutrófilos, que rompía la infraestructura tumoral sugiriendo una posible acción antineoplásica de esta toxina.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alegre- Cebollada, J; Rodríguez-Crespo, I; Gavilanes J; Martínez, A (2006). Detergent-resistant membranes are platforms for actinoporin pore-forming activity on intact cells. *FEBS Journal* (273): 863-871.
- Anderluh, G. y P. Maček (2002): Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (*Anthozoa: Actiniaria*). *Toxicon* 40: 111–124.
- Anderluh G y Maček P. (2003). Dissecting the actinoporin pore-forming mechanism. *Structure* 11:1312-1313.
- Avila, A. D., de Acosta, M.C., Lage, A., (1988). A new immunotoxin built by linking a hemolytic toxin to a monoclonal antibody specific for immature T lymphocytes. *Int. J. Cancer* 42, 568–571.
- Avila, A.D., de Acosta, M.C., Lage, A., (1989). A carcinoembryonic antigen directed immunotoxin built by linking a monoclonal antibody to a hemolytic toxin. *Int. J. Cancer* 43, 926–929.
- Batrukova, M.A; Rubtsov, A.M; Alvarez, C; Gomez, T; Lanio, M.E. (1991). The effect of a toxic polypeptide fraction from *Stoichactis helianthus* on sarcoplasmic reticulum ATPase. *J. Chem Biochem Kinetics* 1 (4): 267-270.
- Celedon G, Venegas F, Campos A M, Martinez D, Soto C, Alvarez C and Lissi E (2005) Role of endogenous channels in red bloodcells response to their exposure to the pore forming toxin sticholysin II; *Toxicon* 46 297–307
- De los Ríos, V., J. M. Mancheño, M. E. Lanio, M. Oñaderra and J. G. Gavilanes (1998): Mechanism of the leakage induced on lipid model membranes by the hemolytic protein sticholysin II from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Eur. J. Biochem.* 252: 284–289.
- Fedorov S, Dyshovoy S, Monastyrnaya M, Shubina L, Leychenko E, Kozlovskaya E, Jin J, Kwab J, Dong Z, Stonik V. (2010) The anticancer effects of actinoporin RTX-A from the sea anemone *Heteractis crispa*. *Toxicon* 55: 811-817

- Garcia, T; Martínez, D; palmero, A; Soto,C; Tejuca,M; Pazos, F; Menéndez, R; Álvarez, C; Garateix, A (2009) Pharmacological effects of two cytolytins isolated from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*; *J. Biosci.* 34: 891–898.
- Giraldi, T., Ferlan, I. y Romeo, D (1976). Antitumor activity of equinotoxin. *Chem Biol Interact.* 13: 199.
- Knapp, O; Maier, E; Ben Mkaddem, S; Benz, R; Bens, M;chenal, A; Geny, B; Vandewalle, A; Popoff, M (2010). Clostridium septicum alpha-toxin forms pores and induces rapid cell necrosis. *Toxicon*, 55:61-72.
- Lanio, M. E., V. Morera, C. Álvarez, M. Tejuca, T. Gómez, F. Pazos, V. Besada, D. Martínez, V. Huerta, G. Padrón and M. D. Chávez (2001): Purification and characterization of two hemolysins from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* 39: 187–194.
- Lanio, M. E., Lombardero, J., Fernández, L., Laborde, R., Cruz, Y., Luzardo, M.C., Mesa, C., Álvarez, C., Pazos, F., Tejuca, M., Valle, A., Alonso, M.E y Canet, L. (2010): Composiciones vacunales a base de Sticholysina encapsulada en liposomas. Patente CU-2010-144.
- Lecoeur, H., Prevost MC, Gougeon, ML (2001). Oncosis is associated with exposure of phosphatidylserine residues on the outside layer of the plasma membrane: Reconsideration of the specificity of the annexin V/Propidium iodide assay. *Cytometry* 44:65-72.
- Macek, P., Zecchini M., Pederzolli C., Dalla-Serra M and Menestrina G (1995) Intrinsic tryptophan fluorescence of equinatoxin II, a pore-forming polypeptide from the sea anemone *Actinia equina* L, monitors its interaction with lipid membranes. *Eur. J. Biochem.* 234, 329-335
- Majno G, Jorris I. (1995). Apoptosis, oncosis and necrosis. *Am J Pathol.*146:3-15.
- Mancheño, J. M., J. Martín-Benito, M. Martínez-Ripoll, J. G. Gavilanes and J. A. Hermoso (2003): Crystal and electron microscopy structures of sticholysin II actinoporin reveal insights into the mechanism of membrane pore formation. *Structure* 11: 1319–1328.
- Martínez, D., A. Otero, C. Álvarez, F. Pazos, M. Tejuca, M. E. Lanio, I. Gutiérrez-Aguirre, A. Barlič, I. Iloro, J. L. Rodríguez, J. M. González-Mañas and E. Lissi (2007): Effect of sphingomyelin and cholesterol in the interaction of St II with lipidic interfaces. *Toxicon* 49 (1): 68–81.
- Pederzolli, C., Belmonte, G., Dalla-Serra, M., Macek, P. y Menestrina, G. (1995). Biochemical and cytotoxic properties of conjugates of transferrin

with Equinotoxin II, a cytolysin from sea anemone. *Bioconj Chem* 6: 166-177

- Ravindran V., Kannan, L y Vankateshvaran, K (2010). Biological activity of sea anemone proteins: II Cytolysis and cell line toxicity. *Indian Journal of Experimental Biology* 48: 1233-1236
- Sanchez P, Chieppa, G, Desideri, A, Cannata,S, Romano, E, Luly, P, Rufini, S (2012). Sticholysin II: A pore-forming toxin as a probe to recognize sphingomyelin in artificial and celular membranes. *Toxicon* 60 : 724–733.
- Soletti, R.C; Pinto De-Faria, G., Vernal, P., Terenzi, H., Anderluh, G., Borges, H.L Moura N., Vivaldo, G y Nelson H (2008). Potentiation of anticancer-drug cytotoxicity by sea anemone pore-forming proteins in human glioblatoma cells. *Anti Cancer Drugs* 19:517-525.
- Tejuca, M., Anderluh, G., Maček, P., Marcet, R., Torres, D., Sarracent, J., Alvarez,C., Lanio, M.E, Dalla Serra, M, Menestrina, G (1999) Antiparasite activity of sea-anemone cytolysins on *Giardia duodenalis* and specific targeting with anti-*Giardia* antibodies, *Int. J. Parasitol.* 29 489–498.
- Tejuca, M., M. Dalla Serra, C. Potrich, C. Álvarez and G. Menestrina (2001): Sizing the radius of the pore formed in erythrocytes and lipid vesicles by the toxin sticholysin I from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *J. Membr. Biol.* 183: 125–135.
- Tejuca, M., Diaz, I., Figueredo,R., Roque,L., Pazos,F., Martinez, D., IznagaEscobar, N., Perez,R., Alvarez,C., Lanio,M.E.,(2004).Construction of an immunotoxin with the pore forming protein StI and ior C5, a monoclonal antibody against a colon cancer cell line. *Int. Immunopharmacol.* 6, 731–744.
- Zorec, R., Tester, M., Maček, P., Mason, W.T. (1990) Cytotoxicity of equinatoxin II from the sea anemone *Actinia equina* involves ion channel formation and an increase in intracellular calcium activity, *J. Membr. Biol.* 118 243–249.

## ANEXOS

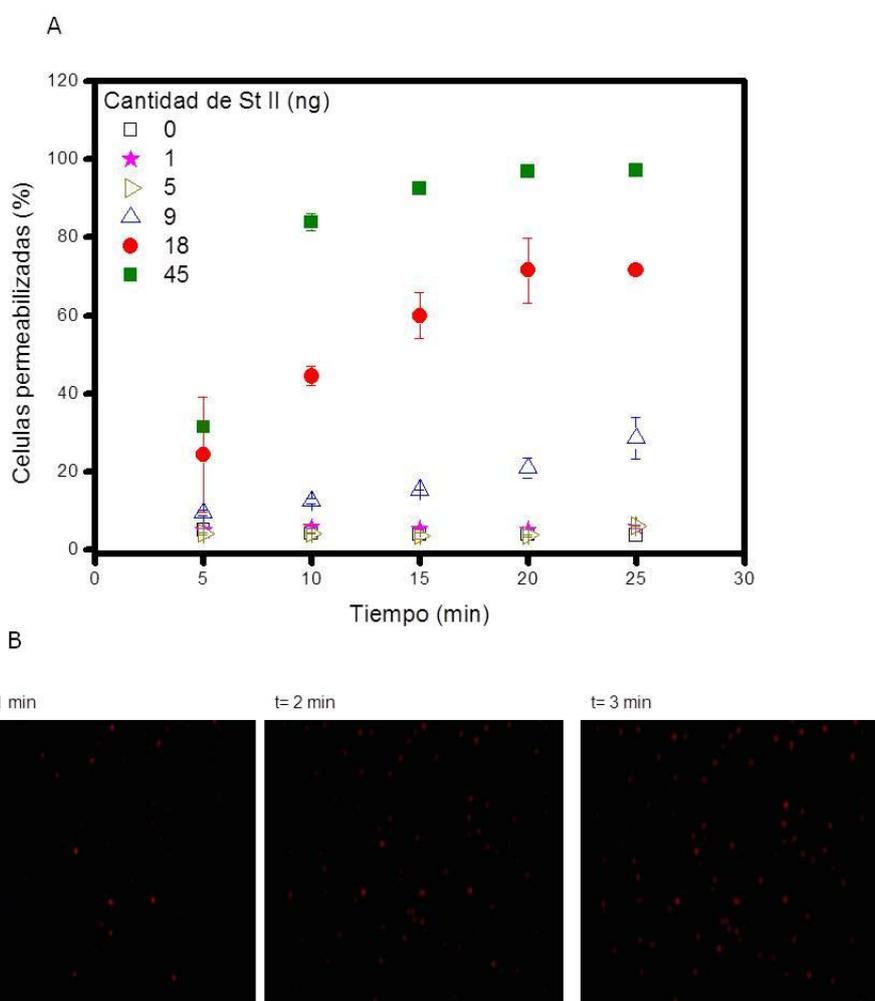


Figura 1. Actividad permeabilizante de St II en células Raji. A: Cinéticas de permeabilización inducida por diferentes cantidades St II. Se midió la incorporación de yoduro de propidio a través del poro de la toxina. Los puntos representan la media y la desviación estándar de al menos tres ensayos realizados. B: Fotografías

al microscopio de fluorescencia de la incorporación de yoduro de propidio a través del poro de la toxina a diferentes tiempos.

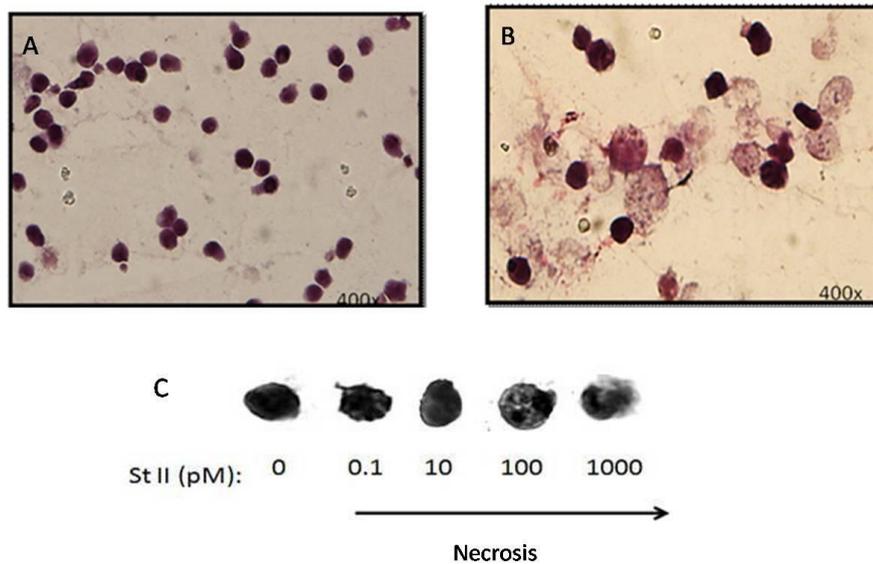
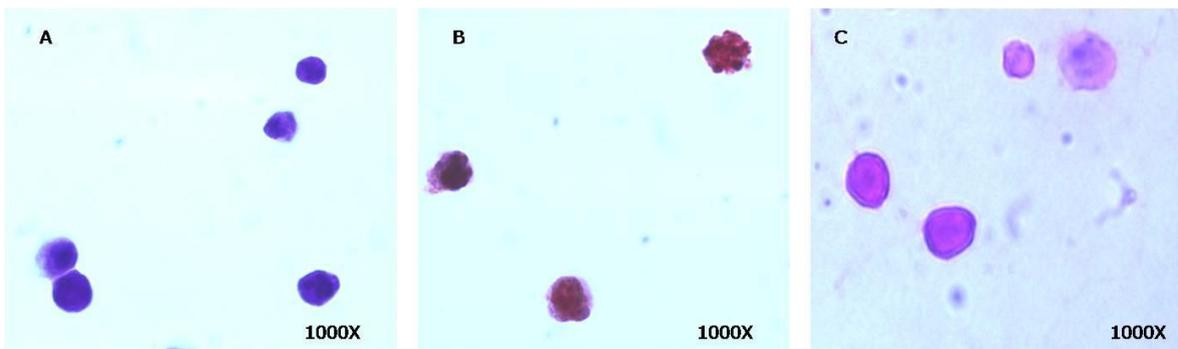


Figura 2 Observación al microscopio óptico del efecto de St II sobre células Raji. A: Células controles B: Células tratadas con St II 100 pM. St II induce incremento del volumen celular y liberación del contenido citoplasmático al medio extracelular. Magnificación 400x C: Células tratadas con diferentes concentraciones de St II. St II induce incremento del volumen celular y liberación del contenido citoplasmático al medio extracelular dependiente de la dosis utilizada en el ensayo. En todos los casos, las muestras se tiñeron con hematoxilina/eosina. Concentración celular:  $5 \times 10^5$  cells/mL.



**Figura 3. Formación de cuerpos apoptóticos.** A: Células Raji sin tratar (control). B: Células Raji tratadas con Doxorubicina 0.5  $\mu\text{M}$  y C: Células Raji incubadas con St II (100 pM) durante 24h. Las muestras se tiñeron con hematoxilina/eosina. Concentración celular:  $5 \times 10^5$  células/mL. St II no indujo la formación de cuerpos apoptóticos. Magnificación 1000x.

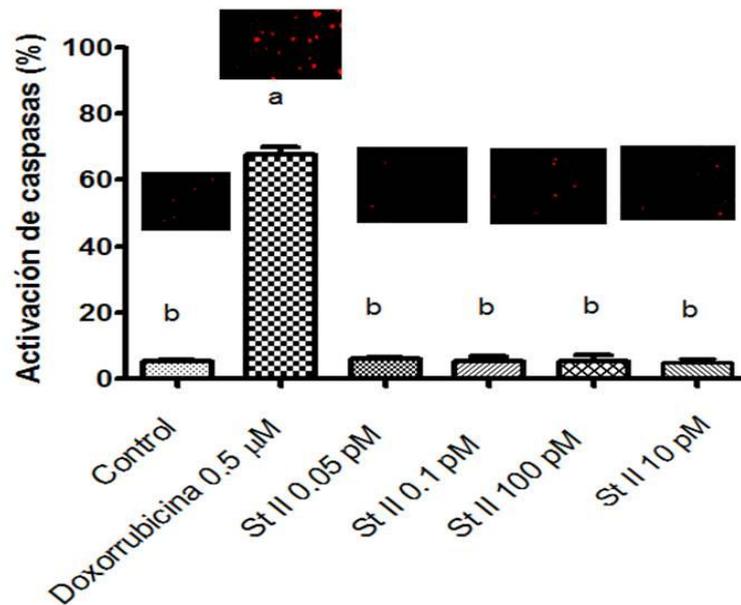


Figura 4. Activación de caspasas inducidas por St II detectada por microscopía de fluorescencia. St II no mostró activación de caspasas a las 24 h de tratamiento en las concentraciones ensayadas. Existen diferencias significativas entre las células tratadas con Doxorubicina y las tratadas con St II. Las diferencias significativas entre el porcentaje de activación de caspasas se encontraron mediante un ANOVA y un análisis de Duncan ( $p < 0.001$ ).

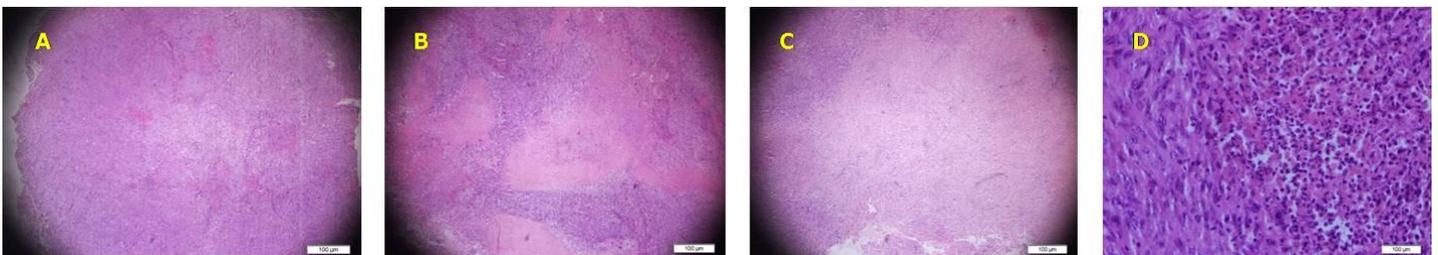


Figura 5. Actividad antitumoral in vivo de St II. A: Mieloma sin tratar (control). B: Mieloma tratado con St II (500 nM). C: Mieloma tratado con St II (30  $\mu\text{M}$ ). D: Infiltrado de neutrófilos en mieloma tratado con St II (500 nM). Los tumores se procesaron y los cortes se tiñeron con hematoxilina/eosina.