

COMPUESTOS INDÓLICOS Y SULFATO DE NEOMICINA: INDUCTORES DE DIFERENCIACIÓN EN LÍNEAS CELULARES MUSCULARES Y DE RABDOMIOSARCOMA

INDOLE COMPOUNDS AND NEOMYCIN SULFATE: DIFFERENTIATION INDUCTORS IN MUSCLE AND RHABDOMYOSARCOMA CELL LINES

*NICOLÁS BLANCO^{1,2}, NATALIA FRATTINI^{1,2}, LUCÍA PRONSATO^{1,2}, LORENA MILANESI^{1,2}, AN-
DREA VASCONSUELO^{1,2}.*

¹Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina. ²Instituto de Ciencias Biológicas y Biomédicas del Sur (INBIOSUR)-CONICET, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN

Introducción: El cáncer tiene alta relevancia entre las causas de mortalidad infantil. Dentro de los cánceres pediátricos, los sarcomas de partes blandas constituyen el 7% de los casos diagnosticados, de los cuales el 50% aproximadamente corresponden a rhabdomiosarcoma (RMS), con una incidencia estimada de 4,71 (casos por millón) en niños y adolescentes menores de 20 años (1). Se ha documentado extensamente que la diferenciación celular es un proceso clave en la inhibición del crecimiento tumoral y en el grado de eficacia de los tratamientos disponibles. Se ha evidenciado que la vía de señalización celular PLC/PKC está implicada en la diferenciación del músculo esquelético regulando factores de transcripción relacionados a la miogénesis, como son los factores nucleares de células T activadas C1, C2 y C3 (2,3). Estudios recientes de nuestro laboratorio demuestran que la inhibición de dicha vía,

mediante el empleo de estaurosporina, bisindolilmaleimida y sulfato de neomicina, induce la diferenciación tanto en células musculares normales como en células tumorales (4).

Conclusiones: Este trabajo integra evidencia bibliográfica reciente con resultados originales de nuestro grupo, destacando la modulación farmacológica de la vía PLC/PKC y su efecto sobre la miogénesis, como una estrategia terapéutica para el tratamiento del rhabdomiosarcoma.

Palabras Clave: Estaurosporina; Bisindolilmaleimida; Sulfato de Neomicina; Diferenciación Celular; C2C12; RD.

SUMMARY

Introduction: Cancer has high relevance among the causes of childhood mortality. Among pediatric cancers, soft tissue sarcomas account for 7% of diagnosed cases, of which approximately 50% correspond to rhabdomyosarcoma (RMS), with an estimated incidence of 4.71 cases per million in children and adolescents under 20 years of age (1). It has been extensively documented that cellular differentiation is a key process in the inhibition of tumor growth and in determining the effectiveness of available treatments. The PLC/PKC cellular signaling pathway has been shown to be involved in skeletal muscle differentiation by regulating transcription factors related to myogenesis,

Correspondencia: Dra. Andrea Vasconsuelo. Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, San Andrés 800 (8000) Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina.
E-mail: avascon@criba.edu.ar

Recibido: 20 de Noviembre de 2025.

Aceptado: 01 de Febrero de 2026.

such as nuclear factors of activated T cells C1, C2, and C3 (2,3). Recent studies from our laboratory demonstrate that inhibition of this pathway, through the use of staurosporine, bisindolylmaleimide, and neomycin sulfate, induces differentiation in both normal muscle cells and tumor cells (4). **Conclusions:** This work integrates recent bibliographic evidence with original results from our group, highlighting the pharmacological modulation of the PLC/PKC pathway and its effect on myogenesis, as a therapeutic strategy for the treatment of rhabdomyosarcoma.

Keywords: Staurosporine; Bisindolylmaleimide; Neomycin Sulfate; Cell Differentiation; C2C12; RD.

INTRODUCCIÓN

El cáncer tiene alta relevancia entre las causas de mortalidad infantil. Dentro de los cánceres pediátricos, los sarcomas de partes blandas constituyen el 7% de los casos diagnosticados, de los cuales el 50% aproximadamente corresponden a Rbdomiosarcoma (RMS), con una incidencia estimada de 4,71 casos por millón en niños y adolescentes menores de 20 años (1).

El RMS se origina a partir de células mesenquimales destinadas a diferenciarse a células de músculo esquelético, pudiendo presentarse en cualquier sitio del cuerpo (5). El enfoque terapéutico incluye resección quirúrgica, quimioterapia y radioterapia, aplicadas de manera combinada o no, según la ubicación y el tamaño del tumor. En casos metastásicos los resultados clínicos suelen ser desfavorables (6).

Publicaciones recientes de nuestro laboratorio, tomando como punto de partida que la diferenciación celular es un proceso clave para inhibir el crecimiento tumoral para aumentar la eficacia de los tratamientos, muestran el potencial de la modulación farmacológica de la vía PLC/PKC como estrategia terapéutica (4).

En la miogénesis esquelética, células precursoras mesodérmicas pluripotentes proliferan y se diferencian a células maduras de músculo esquelético. Estas células se caracterizan por la pérdida de la capacidad de división, la morfología alargada y multinucleada, y la posibilidad de contracción. Este proceso es regulado por diversos factores de transcripción (llamados factores reguladores miogénicos, MRF) como MyoD (proteína de diferenciación miogénica 1), Myf5 (factor miogénico 5), Myogenin y Myf6 (factor miogénico 6) (7). En células de RMS se expresan los marcadores de diferenciación muscular MyoD y Myogenin, pero al unirse de manera inadecuada a sus genes diana

impiden que estas células logren diferenciarse a músculo esquelético maduro.

Estudios recientes de nuestro grupo, centrados en el proceso de miogénesis, observamos la posibilidad de inducir la diferenciación de las células de RMS, logrando que presenten características de células normales utilizando tres moduladores de la vía PLC/PKC: estaurosporina, bisindolilmaleimida y sulfato de neomicina (4).

La estaurosporina, un alcaloide indol carbazol aislado originalmente de una bacteria llamada *Streptomyces staurosporeus* es un potente inhibidor de serina/treonina quinasas, particularmente afecta a la proteína quinasa C (PKC) (8). La bisindolilmaleimida, un compuesto orgánico, alcaloide, posee una estructura con un grupo maleimida central y dos grupos indol unidos. Junto con la estaurosporina forman parte de la familia de los indoles, y también es un inhibidor de la PKC. Ambos compuestos se relacionan con efectos antitumorales (9, 10).

El sulfato de neomicina, es uno de los antibióticos aminoglucósidos más comúnmente prescritos que inhibe la traducción al unirse a la subunidad 30S de los ribosomas bacterianos (11). Además, es un inhibidor de la enzima de membrana fosfolipasa C (PLC) que hidroliza al fosfolípido fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂), generando diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃); el DAG estimula a la PKC activándola. Por lo tanto, la inhibición de la PLC con neomicina indirectamente afecta la activación de la PKC.

Destacamos la vía de señalización celular PKC/PLC, implicada en la diferenciación hacia fibras musculares esqueléticas maduras, al regular factores clave en la miogénesis, como los factores nucleares de células T activadas C1, C2 y C3 (12).

RESULTADOS

En nuestra publicación (4), demostramos que compuestos de la familia indol (estaurosporina y bisindolilmaleimida) junto con el sulfato de neomicina, promueven la diferenciación miogénica de las líneas celulares RD (línea tumoral establecida de células humanas provenientes de un RMS) y C2C12 (línea no tumoral de mioblastos) ambas de origen mesenquimal. Estos hallazgos destacan la participación de las vías de señalización PLC / PKC en este proceso.

Se ha observado que al modificar las condiciones del cultivo celular, específicamente bajando la concentración de suero del medio (del 10% al 1%) o utilizando un medio sin suero, es decir no proliferativo, las células C2C12 consiguen

diferenciarse hacia un fenotipo maduro de célula muscular (células alineadas, elongadas y multinucleadas).

En nuestro laboratorio, bajo esas condiciones de cultivo, repetimos dicho efecto en la línea RD. Una posible explicación es que las células al enfrentarse a una situación de estrés provocada por la ausencia de ciertos factores de crecimiento esenciales presentes en el suero, y con la consecuente detención de la proliferación celular, siguen una ruta de desarrollo distinta a la programada inicialmente.

Este estado de estrés celular activa dos posibles vías de respuesta: por un lado, puede conducir a la apoptosis y por otro, puede promover la supervivencia mediante la adopción de un fenotipo diferenciado, transitando hacia un estado metabólicamente menos demandante.

Este cambio implica una reducción en el consumo energético y un enfoque funcional hacia la especialización celular, lo que permite a la célula adaptarse a condiciones adversas mientras conserva su integridad.

Por lo tanto, destacamos que lo novedoso de nuestros resultados previos reside en que en condiciones proliferativas (utilizando 10% de suero fetal bovino o de caballo) y bajo tratamiento con inhibidores directos de PKC (bisindolilmaleimida 0,05 mM y estaurosporina 1 nM) o indirectos, inhibiendo PLC (sulfato de neomicina 6 mM), logramos inducir la diferenciación de las células de las líneas RD y C2C12 (4).

Observamos que esos tratamientos inducen la activación de genes de diferenciación como MHC1 (cadena pesada de miosina 1), sugiriendo que la vía PLC /PKC estaría implicada en la diferenciación de ambas líneas celulares, inhibiendo la expresión de genes de diferenciación. Como consecuencia de esta inhibición se impediría la adquisición celular de características de fibra muscular esquelética madura.

Asimismo, mediante técnicas avanzadas de microscopía, pudimos observar en ambas líneas celulares (tratadas con cada una de las tres drogas), elongación y fusión celular, pasando de mononucleadas a multinucleadas, con una mayor alineación y uniformidad direccional.

Es decir, las células adquieren características morfológicas de una fibra muscular esquelética madura. Dicho efecto fue más notable con bisindolilmaleimida.

Mediante ensayos de PCR en Tiempo Real se determinaron los niveles de MHC1, MyoD e Integrina- α 9, en las células tratadas con los inhibidores. Los resultados mostraron que las drogas afectan la expresión de génica de MHC1 marcador específico de diferenciación de músculo esquelético, MyoD molécula de expresión temprana en la diferenciación de mioblastos a miotubos e integrina- α 9,

glicoproteína transmembrana heterodimérica, regulada positivamente por la vía Notch y expresada en células de RMS, que se la relaciona con la agresividad del tumor.

Específicamente se observó que el ARNm de MHC1 aumentó significativamente tanto en RD como en C2C12, especialmente con sulfato de neomicina. En el mismo sentido la expresión del gen MyoD aumentó, viéndose mayor nivel para ambas líneas celulares estudiadas con bisindolilmaleimida y sulfato de neomicina.

Al analizar la expresión del gen Integrina- α 9 en ambas líneas tratadas con estaurosporina, se obtuvo una disminución en la expresión en las C2C12, mientras que en las RD los resultados mostraron una mayor variabilidad respecto su control.

Dadas las variaciones mencionadas se decidió evaluar el nivel de expresión de la proteína integrina- α 9 a través de un ensayo de inmunocitoquímica. En este caso los resultados obtenidos demostraron una disminución en el nivel de la integrina- α 9 en las células RD tratadas con estaurosporina, bisindolilmaleimida o sulfato de neomicina, especialmente con las dos últimas.

Estrategias terapéuticas contra el cáncer, denominadas “terapias de diferenciación”, se enfocan en la inducción de las vías de señalización de diferenciación de las células tumorales, de tal manera que adquieran características morfológicas y funcionales específicas de las células maduras y el consiguiente efecto de la inhibición del crecimiento tumoral descontrolado y los mecanismos de invasión y metástasis.

En el caso de las células de RMS esta diferenciación deriva en una célula muscular esquelética, miotubos multinucleados alargados con estructuras sarcoméricas. La miogénesis normal no ocurre en las células de RMS, debido a un defecto en la diferenciación terminal (13). Las células RMS no expresan genes que codifican el aparato contráctil (miosina, troponinas, tropomiosinas, miomesinas y actininas) (14).

En el marco de nuestra investigación, identificamos que las drogas bisindolilmaleimida, estaurosporina y sulfato de neomicina actúan como moduladores efectivos en la promoción de la diferenciación celular en las líneas C2C12 y RD.

La vía PLC/PKC desempeña un papel fundamental en la regulación de la diferenciación celular mediante la modulación precisa de la expresión génica y la interacción con múltiples cascadas de señalización intracelular (15).

Estas cascadas son esenciales para procesos como la reorganización del citoesqueleto, las adhesiones intercelulares y la remodelación del microambiente extracelular.

La actividad de PKC actúa como un nodo integrador, coordinando señales bioquímicas y mecánicas para adaptar la maquinaria transcripcional y las redes de señalización a las necesidades específicas de las células diferenciadas.

Por otro lado, la vía de la PLC funciona como un mediador clave en la transducción de señales intracelulares, regulando múltiples procesos biológicos. A través la hidrólisis del PIP₂, genera dos segundos mensajeros críticos: DAG e IP₃. Estos mensajeros participan en la liberación de calcio intracelular y en la activación de la PKC mediante el DAG. Además, la actividad de la PLC influye en la regulación de la expresión génica, la formación de conexiones célula-célula y la interacción con el entorno extracelular. Su papel como integrador de señales permite que actúe como un regulador esencial en procesos fisiológicos como proliferación, diferenciación y migración celular (15).

CONCLUSIÓN

Nuestros estudios sobre vías de señalización PLC/PKC y su papel inhibitorio en la miogénesis ofrecen un marco prometedor para explorar estrategias terapéuticas para el tratamiento del rdbomiosarcoma enfocado en la diferenciación celular. Estos resultados resaltan la importancia de comprender los mecanismos moleculares involucrados en la diferenciación celular y su modulación farmacológica como estrategia para revertir un fenotipo maligno.

BIBLIOGRAFÍA

1. Martin-Giacalone BA, Weinstein PA, Plon SE, Lupo PJ. Pediatric rhabdomyosarcoma: epidemiology and genetic susceptibility. *J Clin Med*. 2021;10(9):2028.
2. Witwicka H, Nogami J, Syed SA, Maehara K, Padilla-Benavides T, Ohkawa Y, et al. Calcineurin Broadly Regulates the Initiation of Skeletal Muscle-Specific Gene Expression by Binding Target Promoters and Facilitating the Interaction of the SWI/SNF Chromatin Remodeling Enzyme. *Mol Cell Biol*. 2019; 39(19):e00063-19.
3. Gobbi G, Galli D, Carubbi C, Neri LM, Masselli E, Pozzi G, et al. PKC proteins and muscular dystrophy. *Journal of Functional Morphology and Kinesiology*. 2018;3(1):12.
4. Milanese L, Vasconsuelo A, Pronsato L, Frattini N, Blanco N. Indole family and neomycin sulfate: inductors of differentiation in C2C12 and RD cell lines. *J Cell Signal*. 2024; 5(4):195-207.
5. Chen J, Liu X, Lan J, Li T, She C, Zhang Q et al. Rhabdomyosarcoma in adults: case series and literature review. *Int J Womens Health*. 2022; 14:405-14.
6. Miwa S, Hayashi K, Taniguchi Y, Asano Y, Demura S. What are the optimal systemic treatment options for rhabdomyosarcoma? *Curr Treat Options Oncol*. 2024; 25(6):784-797.
7. Klimczak A, Kozłowska U, Kurpisz M. Muscle stem/progenitor cells and mesenchymal stem cells of bone marrow origin for skeletal muscle regeneration in muscular dystrophies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2018; 66(5):341-354.
8. Omura S, Asami Y, Crump A. Staurosporine: new lease of life for parent compound of today's novel and highly successful anti-cancer drugs. *J Antibiot*. 2018; 71: 688-701.
9. Cooney LN, O'Shea KD, Winfield HJ, Cahill MM, Pierce LT, McCarthy FO. Bisindolyl Maleimides and Indolylmaleimide Derivatives-A Review of Their Synthesis and Bioactivity. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023;16(9):1191.
10. Cai Y, Yue T, Ma Y, Liu G, Zhang J, Rong L. Molecular Subtyping and Prognostic Prediction in Pancreatic Cancer Based on Mitophagy-Related Genes. *Int J Med Sci*. 2026; 23(2):620-635.
11. Catal T, Yavaser S, Enisoglu-Atalay V, Bermek H, Ozilhan S. Monitoring of neomycin sulfate antibiotic in microbial fuel cells. *Bioresour Technol*. 2018; 268:116-120.
12. Witwicka H, Nogami J, Syed SA, Maehara K, Padilla-Benavides T, Ohkawa Y, et al. Calcineurin broadly regulates the initiation of skeletal muscle-specific gene expression by binding target promoters and facilitating the interaction of the SWI/SNF chromatin remodeling enzyme. *Mol Cell Biol*. 2019; 39(19):e00063-19.
13. Yu PY, Guttridge DC. Dysregulated myogenesis in rhabdomyosarcoma. *Curr Top Dev Biol*. 2018; 126: 285-297.
14. Pomella S, Danielli S, Alaggio R, Breunis W, Hamed E, Selfe J, Wachtel M, Walters Z, Schäfer B, Rota R, Shipley M, Hettmer S. Genomic and epigenetic changes drive aberrant skeletal muscle differentiation in rhabdomyosarcoma. *Cancers* 2023; 15(10), 2823.
15. Kanemaru K, Nakamura Y. Activation mechanisms and diverse functions of mammalian phospholipase C. *Biomolecules*. 2023; 13(6):915.