

## La rapamicina: del laboratorio al tratamiento de las arterias en los pacientes

Valentín Fuster

Mount Sinai Medical Center. Nueva York. EE.UU.

La historia de la rapamicina se originó en 1965, cuando fue aislada a partir de un microorganismo del suelo y se comprobó que podía actuar como un antibiótico. En los años que siguieron a este descubrimiento aparecieron un gran número de publicaciones científicas que demostraban sus propiedades antifúngicas e inmunodepresoras. Nuestro grupo fue pionero en el estudio del mecanismo de acción de la rapamicina por su enorme potencial terapéutico en la enfermedad aterosclerótica. Así, describimos su capacidad para inhibir la proliferación y migración de las células musculares lisas después de una agresión mecánica, y demostramos que este efecto estaba mediado por la capacidad de la rapamicina para activar la p27. La participación de la p27 en la señalización molecular de la rapamicina, una ciclina clave en la modulación de la replicación celular, despertó asimismo grandes expectativas en el ámbito de la investigación oncológica, por constituir un sistema de regulación del ciclo celular de tipo no redundante, susceptible de las mutaciones. Las interesantes características de este principio activo nos animaron a investigar su posible efecto protector después de practicar una angioplastia en un modelo experimental porcino y, de esta forma, demostramos que la rapamicina es capaz de disminuir notablemente el engrosamiento de la pared vascular y de preservar la luz arterial tras una angioplastia. Poco después, la utilización de *stents* recubiertos con rapamicina diseñados para liberar el principio activo en la zona de la lesión aterosclerótica se acompañó de una preservación eficaz de la luz arterial en modelos experimentales, y de una reducción muy significativa de la tasa de reestenosis post-*stent* en diversos estudios clínicos en humanos. Sin embargo, el potencial de este tipo de *stents* en pacientes diabéticos todavía no se conoce, y estamos a punto de emprender un amplio ensayo clínico (el estudio FREEDOM) para investigar su impacto en el manejo de estos enfermos. Las evidencias experimentales y clínicas indican que el desarrollo de agentes orales, capaces de modificar la progresión de la enfermedad aterosclerótica actuando sobre dianas moleculares implicadas en el control del ciclo celular, es un reto que debemos afrontar en los próximos años.

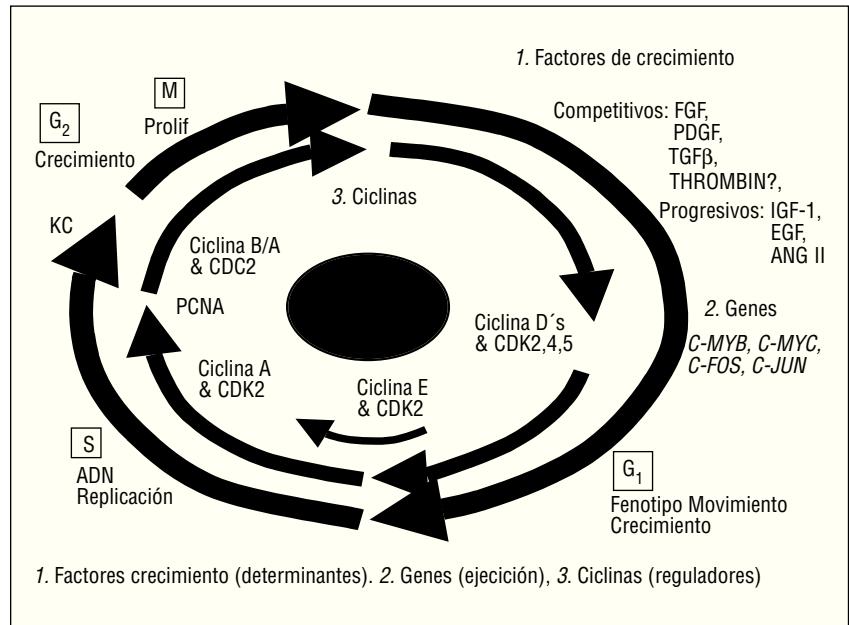
**Palabras clave:** *Atherosclerosis. Angioplastia. Stent. Restenosis. Diabetes.*

### **Rapamycin: from the Laboratory to the Treatment of Patients' Arteries**

The history of rapamycin dates from 1965, when it was isolated from a microorganism in soil and its antibiotic properties were confirmed. Since its discovery, many scientific papers have demonstrated its antifungal and immunosuppressive properties. Our team pioneered in the study of the mechanism of action of rapamycin, motivated by its enormous promise as a therapeutic agent in atherosclerotic disease. We reported how it can inhibit the proliferation and migration of smooth muscle cells after a mechanical aggression, and demonstrated that this effect is mediated by p27 activation by rapamycin. The participation of p27, a key cyclin in the modulation of cell replication, in rapamycin's molecular signaling also spurred expectations in the field of oncological research because it involves a non-redundant system of regulation of the cell cycle susceptible to mutation. The interesting characteristics of this active principle suggested that it would be worthwhile to investigate its protective effect in an experimental porcine model of angioplasty. Rapamycin showed that it can notably reduce vascular wall thickening, thus helping to preserve patency after angioplasty. Shortly after this study, the use of rapamycin-coated stents designed to release the active principle into the area of the atherosclerotic lesion was accompanied by an effective preservation of the arterial lumen in experimental models. It also produced a highly significant reduction in the rate of post-stent restenosis in various clinical studies in humans. However, the potential of this type of stent in diabetic patients is still unknown and we are on the point of beginning a large clinical trial (the FREEDOM study) to investigate its impact on the management of diabetic patients. Experimental and clinical evidence indicates that the development of oral agents capable of modifying the progression of atherosclerotic disease by acting on molecular targets involved in the control of the cell cycle will be a challenge in the coming years.

**Key words:** *Atherosclerosis. Angioplasty. Stent. Restenosis. Diabetes.*

Correspondencia: Dr. Valentín Fuster.  
Mount Sinai Medical Center.  
1 Gustave L. Levy Place-Box 1030. New York, NY 10029-6574. USA.



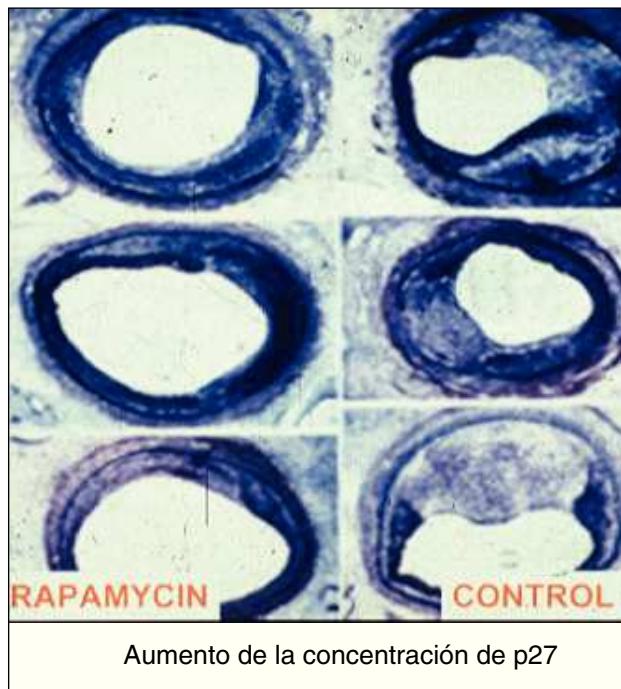
**Fig. 1.** Esquema representativo de las fases consecutivas del ciclo celular en una célula proliferativa y de los factores determinantes de su puesta en marcha (factores de crecimiento como el FGF, el TGF-beta, etc.), su ejecución (oncogenes del tipo C-Fos, C-Myc, etc.) y su regulación (ciclinas). Tomada de *Circulation* 1998;98:82-9; *Circulation* 1998;97:181-7 y *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:333-8.

El descubrimiento de la rapamicina (sirolimus) como agente terapéutico se remonta al año 1965, cuando una expedición médica canadiense aisló el principio activo en la arena de la Isla de Pascua, a partir del microorganismo *Streptomyces hygroscopicus*, y describió sus propiedades antibióticas<sup>1</sup>. Poco tiempo después se descubrió que este fármaco también podía actuar como un antifúngico y un inmunodepresor<sup>2</sup>, lo que limitaba su uso como antibiótico pero le confería otras ventajas. Al mismo tiempo, los primeros experimentos que se estaban llevando a cabo en trasplante cardíaco demostraron que el uso de diversos inmunodepresores, como la rapamicina o la ciclosporina, no sólo disminuía el rechazo inmunitario<sup>3</sup>, sino que reducía la capacidad reactiva de las células musculares lisas de los vasos después de una agresión mecánica<sup>4</sup>. El Dr. Andy Marks, que entonces estaba trabajando en nuestro grupo en el área de trasplante cardíaco, se interesó por el mecanismo de acción de esta sustancia y describió su capacidad para inhibir la proliferación en una línea celular miogénica<sup>5</sup>. Estas observaciones impulsaron la investigación de las bases moleculares implicadas en su acción farmacológica, y en 1995 se publicó un estudio que describe que la inhibición de la rapamicina sobre la proliferación celular se debe al bloqueo que este fármaco ejerce sobre la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular<sup>6</sup>.

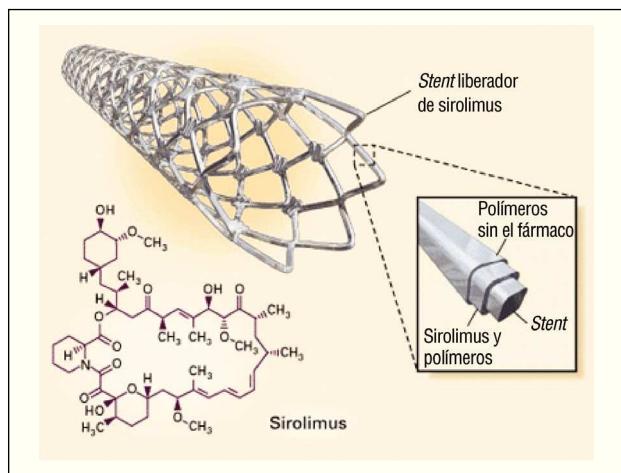
Todos estos hallazgos dieron lugar a numerosos trabajos de investigación en nuestro laboratorio sobre el efecto de la rapamicina en el ciclo celular y en la migración de las células musculares lisas utilizando diversos modelos *in vitro*<sup>7,8</sup>. Una de las observaciones más importantes que se derivaron de estos estudios fue la demostración de que la actividad de la rapamicina sobre la capacidad proliferativa de las células

musculares lisas estaba mediada por su acción sobre la p27<sup>9-11</sup>. La p27 es una ciclina moduladora del ciclo celular, de manera que su activación inhibe la proliferación de la célula. Nuestro grupo describió, en el año 1996, que el efecto bloqueador de la rapamicina sobre la proliferación de la célula muscular lisa y su posterior migración era debido a que aumentaba significativamente la concentración de p27. Pocos años después, la Dra. Roqué demostró en nuestro laboratorio que la inhibición que ejerce la rapamicina sobre la hiperplasia intimal estaba también mediada por mecanismos independientes de la p27<sup>12</sup>. De esta forma, aunque muchos de los aspectos moleculares involucrados en el mecanismo antiproliferativo de la rapamicina los habíamos observado en los años noventa, el conjunto de los resultados sobre el mecanismo de acción de este principio activo en la célula proliferativa, dependientes e independientes de p27, aparecieron unos años más tarde<sup>8,10-12</sup>.

El efecto modulador de la p27 sobre el ciclo celular ha resultado ser también muy importante para el desarrollo de determinados tipos de cánceres<sup>13-16</sup>, ya que constituye un sistema de regulación no redundante, lo que le hace ser particularmente sensible a las mutaciones. En la figura 1 se expone un esquema de las fases que constituyen el ciclo celular normal y los factores involucrados en su puesta en marcha (factores de crecimiento), su ejecución (genes) y su regulación (ciclinas). La enorme complejidad de la maquinaria que participa en la correcta ejecución del ciclo celular es la responsable de que el control farmacológico de la proliferación sea extremadamente difícil. Así, por ejemplo, nuestro enfoque previo basado en el bloqueo de determinados factores de crecimiento, como el TGF-beta, para prevenir la proliferación de la célula muscu-



**Fig. 2.** Efecto inhibitor de la rapamicina sobre el engrosamiento de la neointima en la coronaria descendente anterior tras practicar angioplastia en un modelo experimental porcino, según imágenes obtenidas por resonancia magnética nuclear. Tomada de Gallo R, et al<sup>17</sup>.



**Fig. 3.** Imagen de un stent diseñado para liberar rapamicina (sirolimus) de manera específica en el lugar de la lesión aterosclerótica, una vez que el dispositivo se coloca intravascularmente. Tomada de *N Engl J Med* 2002;346:1770-1.

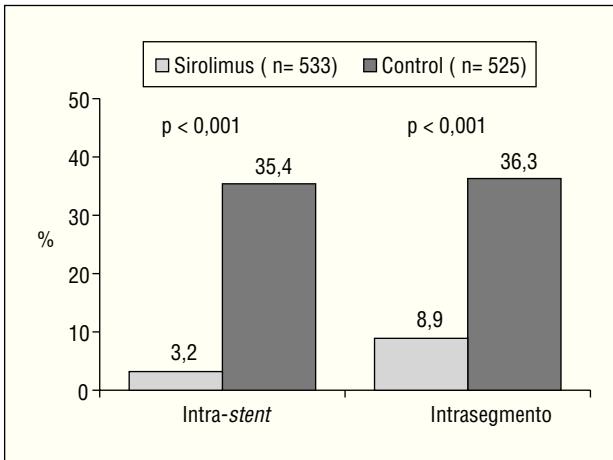
lar lisa, fracasó por la redundancia del sistema. También fracasaron las aproximaciones experimentales basadas en el uso de oligonucleótidos antisentido dirigidos a inhibir la expresión genética, porque el bloqueo de ciertos oncogenes se acompañaba de la sobreexpresión de otros. Sin embargo, la mutación de la p27 puede originar la transformación neoplásica de la célula, lo que demuestra que no se trata de un sistema redun-

dante y convierte a esta ciclina en una diana terapéutica de especial interés.

El hecho de que la rapamicina fuera capaz de actuar específicamente sobre la p27 despertó grandes expectativas sobre su potencial farmacológico. En este contexto, decidimos emprender un estudio *in vivo* utilizando un modelo porcino para abordar el problema de la proliferación celular tras angioplastia. Los primeros resultados fueron obtenidos en colaboración con el Dr. Gallo, que estaba trabajando en nuestro laboratorio, y demostraban que la rapamicina inhibía eficazmente el engrosamiento intimal en la coronaria descendente anterior porcina después de la angioplastia<sup>17</sup> (fig. 2). El efecto de la rapamicina sobre la preservación de la luz arterial en este modelo estaba asociado a un aumento de la concentración de p27 en la arteria, lo que constituía la primera evidencia *in vivo* de su acción molecular en esta localización. La utilización de la resonancia magnética nos permitió llevar a cabo un seguimiento detallado de los cambios morfológicos de la arteria tras practicar la angioplastia sin necesidad de sacrificar al animal<sup>18</sup>.

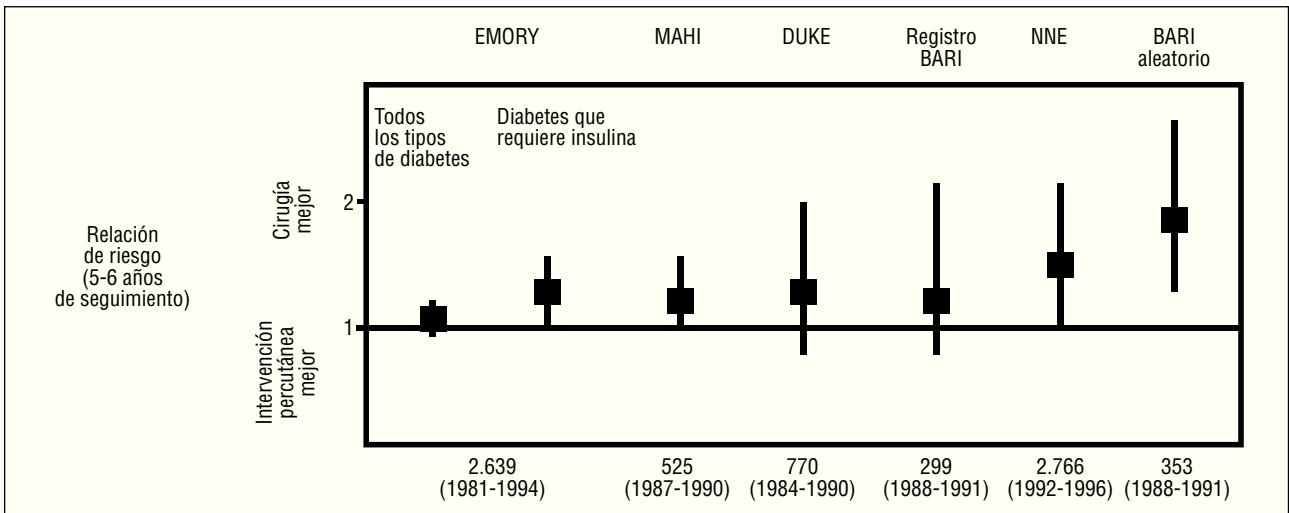
Los laboratorios farmacéuticos que hasta ese momento nos habían proporcionado la rapamicina para el desarrollo de este gran proyecto experimental, y debido a problemas económicos vendieron el producto a otra compañía farmacéutica. Nuestro proyecto incluía la utilización de stents recubiertos con rapamicina capaces de liberar el principio activo específicamente en el lugar de la lesión aterosclerótica en un modelo porcino *in vivo*. En la figura 3 se expone el diseño de este tipo de dispositivos recubiertos. La cesión de la rapamicina a otro laboratorio fue la causa de que no pudiéramos proseguir con el estudio y de que la idea fuera desarrollada por otros 2 grupos, que describieron el efecto protector de los stents recubiertos con rapamicina sobre la hiperplasia intimal en cerdos<sup>19</sup> y sobre la reestenosis post-stent en humanos<sup>20</sup>. En la figura 4 se expone, a partir de un corte histológico arterial, la gran reducción de la hiperplasia observada en la arteria tratada con el stent recubierto con rapamicina. El uso de los stents recubiertos con rapamicina en el estudio humano dirigido por el Dr. Souza en Brasil<sup>20</sup>, en un grupo de 30 pacientes con angina, se asoció a una tasa de reestenosis post-stent del 0%. En un estudio, que se publicó pocos meses después<sup>21</sup>, la tasa de reestenosis post-stent tras un año de seguimiento estuvo en torno al 5% cuando se utilizaron los dispositivos recubiertos con rapamicina, frente a un 30% de reestenosis en los stents convencionales. El efecto protector de la rapamicina sobre la tasa total de reestenosis post-stent obtenida en el estudio SIRIUS se observa en la figura 5. Es interesante señalar que en el subgrupo de pacientes diabéticos incluidos en el estudio SIRIUS también se produjo una reducción muy significativa de la tasa de reestenosis en los enfermos a los que se implantó un stent recubierto.

**Fig. 4.** Corte histológico de una arteria porcina después de haberse colocado un *stent* convencional (imagen de la izquierda) o un *stent* recubierto con rapamicina (imagen de la derecha). Obsérvese cómo la utilización del dispositivo intravascular liberador de rapamicina se asoció a una inhibición significativa de la proliferación celular post-*stent* y a una importante mejora de la preservación de la luz arterial. Tomada de *Circulation* 2001;104:1188-93.



**Fig. 5.** Efecto de la rapamicina (sirolimus) sobre la tasa total de reestenosis post-*stent* en humanos, según resultados del estudio clínico SIRIUS. El uso de *stents* recubiertos con rapamicina se acompañó de una drástica reducción de la tasa de reestenosis, tanto en la zona vascular intra-*stent* como en la zona intrasegmento.

Existen múltiples estudios clínicos que demuestran que la cirugía de revascularización en pacientes diabéticos con enfermedad multivaso se asocia a un pronóstico mejor que el tratamiento médico (fig. 6). Así, por ejemplo, en el estudio BARI<sup>22</sup> se demuestra que la supervivencia a largo plazo tras cirugía de revascularización en pacientes diabéticos es significativamente más alta que la que se observa en pacientes sometidos a angioplastia, una diferencia que no se produce en pacientes no diabéticos. Resultados similares se han obtenido en muchos otros ensayos clínicos, como los estudios EMORY, MAHI, DUKE y NNE<sup>23</sup>. En el estudio ARTS, el pronóstico de los pacientes diabéticos sometidos a cirugía de revascularización fue también significativamente mejor que el de los pacientes con *stent*. Estas características particulares en su respuesta al tratamiento convierten a los enfermos diabéticos con enfermedad aterosclerótica en un grupo interesante de pacientes para investigar alternativas terapéuticas basadas en el uso de *stents* recubiertos.



**Fig. 6.** Relación de riesgo entre la intervención coronaria percutánea y la cirugía sobre la supervivencia a largo plazo de pacientes diabéticos sometidos a revascularización, según resultados de los estudios clínicos EMORY, MAHI, DUKE, BARI y NNE. En todos estos estudios, la cirugía se ha asociado sistemáticamente a un mejor pronóstico que la intervención coronaria percutánea en los pacientes diabéticos. Tomada de Niles NW, et al<sup>23</sup>.

En este sentido, nuestro grupo ha sido propuesto para liderar uno de los proyectos clínicos más ambiciosos en el estudio de la revascularización. Se trata del estudio FREEDOM (Future REvascularization Evaluation in patients with Diabetes mellitus: Optimal management of Multivessel disease), del cual formó parte como Director del Comité Ejecutivo, y que ya ha sido presentado al Instituto Nacional de la Salud de los EE.UU. Este amplio ensayo clínico aleatorio y prospectivo tiene como principal objetivo determinar la estrategia de revascularización coronaria óptima en pacientes diabéticos con enfermedad coronaria arterial multivaso. Se espera que los resultados de este estudio tengan una gran repercusión sobre el manejo de la enfermedad aterosclerótica en este grupo de pacientes.

El estudio de agentes farmacológicos que, como la rapamicina, pueden actuar sobre el ciclo vital celular y modificar su tasa proliferativa, actuando en distintas dianas de la maquinaria molecular implicada en la división de la célula, está despertando un gran interés científico por su posible aplicabilidad clínica. En la búsqueda de estos agentes se han encontrado fármacos, como el paclitaxel, capaces de interferir en la fase M de la división celular, actuando sobre los microtúbulos y alterando, de esta manera, la multiplicación normal de la célula. Nuestro grupo ha sido pionero en el estudio de la rapamicina, desde que se iniciaron las primeras investigaciones *in vitro* hasta que se ha llevado a un contexto clínico, y ha aportado un gran número de publicaciones científicas que reflejan las distintas fases de la investigación con esta molécula. Más allá del estudio de los factores que intervienen en la formación y organización del trombo, que está siendo objeto de una investigación activa, el impacto terapéutico de estos fármacos puede ser muy importante cuando se actúa sobre estos procesos. La utilización de agentes orales capaces de modificar la historia natural de la enfermedad aterosclerótica es un reto que debemos afrontar los cardiólogos en los próximos 5 años.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot* 1975; 28:721-6.
2. Sehgal SN, Baker H, Vezina C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot* 1975;28:727-32.
3. Meiser BM, Billingham ME, Morris RE. Effects of cyclosporin, FK506, and rapamycin on graft-vessel disease. *Lancet* 1991; 338:1297-8.
4. Gregory CR, Huie P, Billingham ME, Morris RE. Rapamycin inhibits arterial intimal thickening caused by both alloimmune and mechanical injury. Its effect on cellular, growth factor, and cytokine response in injured. *Transplantation* 1993;55:1409-18.
5. Jayaraman T, Marks AR. Rapamycin-FKBP12 blocks proliferation, induces differentiation, and inhibits cdc2 kinase activity in a myogenic cell line. *J Biol Chem* 1993;268:25385-8.
6. Marx SO, Jayaraman T, Go LO, Marks AR. Rapamycin-FKBP inhibits cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1995;76:412-7.
7. Marx SO, Marks AR. Bench to bedside: the development of rapamycin and its application to stent restenosis. *Circulation* 2001; 104:852-5.
8. Poon M, Badimon JJ, Fuster V. Overcoming restenosis with sirolimus: from alphabet soup to clinical reality. *Lancet* 2002;359: 619-22.
9. Luo Y, Marx SO, Kiyokawa H, Koff A, Massague J, Marks AR. Rapamycin resistance tied to defective regulation of p27Kip1. *Mol Cell Biol* 1996;16:6744-51.
10. Sun J, Marx SO, Chen HJ, Poon M, Marks AR, Rabbani LE. Role for p27(Kip1) in vascular smooth muscle cell migration. *Circulation* 2001;103:2967-72.
11. Roque M, Cordon-Cardo C, Fuster V, Reis ED, Drobnjak M, Badimon JJ. Modulation of apoptosis, proliferation, and p27 expression in a porcine coronary angioplasty. *Atherosclerosis* 2000;153: 315-22.
12. Roque M, Reis ED, Cordon-Cardo C, Taubman MB, Fallon JT, Fuster V, et al. Effect of p27 deficiency and rapamycin on intimal hyperplasia: in vivo and in vitro studies using a p27 knockout mouse model. *Lab Invest* 2001;81:895-903.
13. Blain SW, Massague J. Breast cancer banishes p27 from nucleus. *Nat Med* 2002;8:1076-8.
14. Viglietto G, Motti ML, Bruni P, Melillo RM, D'Alessio A, Califano D, et al. Cytoplasmic relocation and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat Med* 2002;8:1136-44.
15. Shin I, Yakes FM, Rojo F, Shin NY, Bakin AV, Baselga J, et al. PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med* 2002;8:1145-52.
16. Liang J, Zubovitz J, Petrocilli T, Kotchetkov R, Connor MK, Han K, et al. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med* 2002; 8:1153-60.
17. Gallo R, Padurean A, Jayaraman T, Marx S, Roque M, Adelman S, et al. Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle. *Circulation* 1999;99:2164-70.
18. Worthley SG, Helft G, Fuster V, Fayad ZA, Rodríguez OJ, Zaman AG, et al. Noninvasive in vivo magnetic resonance imaging of experimental coronary artery lesions in a porcine. *Circulation* 2000;101:2956-61.
19. Suzuki T, Kopia G, Hayashi S, Bailey LR, Llanos G, Wilensky R, et al. Stent-based delivery of sirolimus reduces neointimal formation in a porcine coronary model. *Circulation* 2001;104:1188-93.
20. Sousa JE, Costa MA, Abizaid A, Abizaid AS, Feres F, Pinto IM, et al. Lack of neointimal proliferation after implantation of sirolimus-coated stents in human coronary arteries: a Quantitative Coronary Angiography and Three-Dimensional Intravascular Ultrasound Study. *Circulation* 2001;103:192-5.
21. Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, Fajadet J, Ban Hayashi E, Perin M, et al. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med* 2002;346:1773-80.
22. Comparison of coronary bypass surgery with angioplasty in patients with multivessel disease. The Bypass Revascularization Investigation (BARI) Investigators. *N Engl J Med* 1996;335: 217-25.
23. Niles NW, McGrath PD, Malenka D, Quinton H, Wennberg D, Shubrooks SJ, et al. Survival of patients with diabetes and multivessel coronary artery disease after surgical or percutaneous coronary revascularization: results of a large regional prospective study. Northern New England Cardiovascular Disease Study Group. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:1008-15.