**ARTÍCULO ORIGINAL DE INVESTIGACIÓN****Gamma glutamil transferasa, un marcador de la eficacia clínica del ozono médico y su rol patológico en la artritis reumatoide y la osteoartritis de rodilla**

Gamma glutamyl transferase: an indicator of medical ozone clinical efficacy and its pathological role in rheumatoid arthritis and knee osteoarthritis

Olga Sonia León Fernández<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0002-9468-9173>

Gabriel Takon Oru<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-0605-4838>

Gilberto López Cabreja<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-9466-8962>

Irainis Serrano Espinosa<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-4069-3855>

Elizabeth García Fernández<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-4922-5230>

<sup>1</sup> Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.

<sup>2</sup> Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana, La Habana. Cuba.

<sup>3</sup> Centro de Reumatología, Facultad de Ciencias Médicas 10 de Octubre. Universidad de Ciencias Médicas de La Habana. La Habana, Cuba.

<sup>4</sup> Centro de Reumatología, Facultad de Ciencias Médicas 10 de Octubre. Universidad de Ciencias Médicas de La Habana. La Habana, Cuba.

<sup>5</sup> Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.

\*Autor para la correspondencia: [olga@infomed.sld.cu](mailto:olga@infomed.sld.cu)

## RESUMEN

**Introducción:** El ozono médico tiene eficacia clínica e incrementa la relación beneficio/riesgo en pacientes con artritis reumatoide tratados con la terapia combinada metotrexate + ozono. Hoy, la gamma glutamil transferasa se considera como un marcador de riesgo de enfermedades de una alta morbilidad y mortalidad, y tiene particular valor en la artritis reumatoide por desempeñar un papel patológico asociado al estrés oxidativo y a la remodelación ósea, lo que causa daño al cartílago y al hueso.

**Objetivo:** Evaluar los efectos del ozono médico sobre los niveles de gamma glutamil transferasa.

**Métodos:** Se estudiaron pacientes portadores de dos enfermedades artríticas: artritis reumatoide (n = 100; grupo tratado con metotrexate [n = 50] y grupo con metotrexate + ozono [n = 50]) y osteoartritis de rodilla (n = 40; grupo precondicionado con ozono antes de la artroscopía [n = 20] y grupo sin pretratamiento con ozono antes de la artroscopía [n = 20]). Los pacientes con artritis reumatoide fueron valorados por indicadores clínicos específicos, incluidos los niveles de anticuerpos contra péptidos cíclicos citrulinados, así como las concentraciones de glutatión reducido, importante antioxidante endógeno.

**Resultados:** El ozono médico reguló la actividad sérica de gamma glutamil transferasa. Correlacionó de forma inversamente proporcional con los niveles de glutatión reducido que, a su vez, fue el único marcador redox que para los pacientes tratados con la terapia combinada metotrexate + ozono fue directamente proporcional con todas las variables clínicas evaluadas.

**Conclusión:** Se debe considerar a la gamma glutamil transferasa un indicador de la eficacia clínica del ozono médico en las enfermedades estudiadas, por su doble función: biomarcador de estrés oxidativo e indicador de la remodelación patológica del hueso.

**Palabras clave :** gamma glutamil transferasa; ozono; artritis reumatoide; osteoartritis de rodilla.

## ABSTRACT

**Introduction:** medical ozone has demonstrated its clinical efficacy as well as the increase of beneficial/risk relationship in rheumatoid arthritis patients treated with metotrexate+ozone combined therapy. At present, gamma-glutamyl transpeptidase is considered as risk indicator of high morbimortality diseases. It has a special value in arthritis diseases due to its pathologic role associated to oxidative stress and in the abnormal bone remodeling processes.

**Objective:** assess the ozone medical effects on gamma-glutamyl transpeptidase levels.

**Method:** patients who suffered of two arthritic diseases: rheumatoid arthritis (n=100; Group treated with Metotrexate (n=50) and metotrexate+ozone (n=50) and knee osteoarthritis (n=40); Group preconditioned with ozone before arthroscopy (n=20) and Group without previous treatment with ozone before arthroscopy (n=20). Rheumatoid arthritis patients were assessed through specific clinic indicators which included antibodies against cyclic citrullinate peptides as well as reduced glutathione concentrations which are an important endogenous antioxidant.

**Results:** medical ozone regulated serum gamma-glutamyl transpeptidase activity which correlated in inverse proportion to reduced glutathione levels which was the only one redox marker that correlated with all clinical variables (p < 0.05) when patients were treated with metotrexate+ozone.

**Conclusion:** gamma-glutamyl transpeptidase should be considered as biomarker of medical ozone clinical efficacy in rheumatoid arthritis and knee osteoarthritis due to GGT's both pathologic functions: indicator of oxidative stress and abnormal bone remodeling processes.

**Keywords:** gamma-glutamyl transpeptidase; ozone; rheumatoid arthritis; knee osteoarthritis.

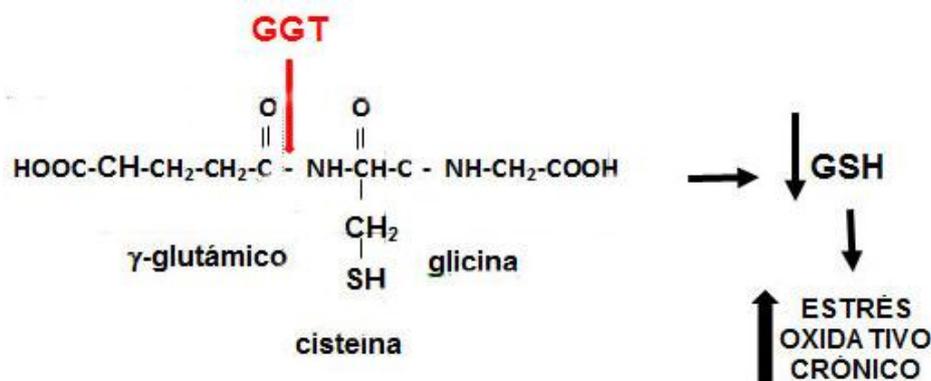
Recibido: 10/07/2019

Aprobado: 04/10/2019

## INTRODUCCIÓN

La gamma glutamil transferasa (GGT) es un reconocido marcador de enfermedades hepatobiliares y del consumo crónico de alcohol. <sup>(1)</sup> Sin embargo, su utilidad predictiva va más allá de las enfermedades del hígado. La elevación de los niveles de GGT está asociada a un incremento en el riesgo de diversas enfermedades como las cardiovasculares y metabólicas, entre ellas obesidad, síndrome metabólico, diabetes mellitus, enfermedades coronarias e isquemia cerebral, del sistema inmunitario como el cáncer, la artritis reumatoide y otras. <sup>(2-5)</sup> El mecanismo de las asociaciones entre la GGT y los trastornos mencionados no se ha esclarecido totalmente.

Una de las funciones más conocidas de la GGT es su papel en la homeostasis del glutatión, un importante antioxidante endógeno que permite la eliminación de xenobióticos y especies reactivas de oxígeno del organismo, y protege contra las enfermedades y el estrés oxidativo crónico, asociado a la generalidad de los trastornos mencionados. La GGT hidroliza al glutatión degradándolo, conjuntamente con una dipeptidasa, a sus aminoácidos constituyentes (glutámico, cisteína y glicina) (Fig. 1), que son retomados por las células para realizar la síntesis de novo del glutatión, el cual participa en funciones biológicas importantes. Cuando la GGT se encuentra sobreexpresada, la hidrólisis o degradación del glutatión ocurre de forma descontrolada, con lo cual pierde todas sus propiedades protectoras antioxidantes y se genera un estrés oxidativo crónico. <sup>(6)</sup>



**Fig. 1** Estructura química del glutatión (GSH) y su degradación por la GGT.

La GGT se localiza en la superficie externa de la membrana del plasma y en varios tipos de células y fluidos corporales. Aunque aún no se ha determinado cómo la GGT es liberada extracelularmente, estudios previos han demostrado que su producción por células linfocitarias y otras puede ser elevada en respuesta a un estrés oxidativo. <sup>(7)</sup> Se han encontrado altos niveles de GGT en el fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoide, aparentemente debido a que la GGT, procedente de linfocitos o células inflamatorias, se acumula en las lesiones artríticas. <sup>(7)</sup>

Al estrés oxidativo crónico, asociado a la inflamación en la artritis reumatoide avanzada, se adiciona la destrucción del hueso, proceso en el que la GGT va a desempeñar un papel patológico relevante. La destrucción ósea está mediada por una excesiva formación de osteoclastos, los que degradan patológicamente el hueso, antes de que ocurra la formación de nuevas estructuras óseas. <sup>(8)</sup>

Algunos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la GGT puede afectar el metabolismo óseo a través de mecanismos locales y sistémicos. Ratones transgénicos que sobreexpresaron GGT, sistémica o localmente, en el tejido esquelético manifestaron osteopenia y deterioro microestructural, el cual se atribuyó a un incremento en la reabsorción ósea y una disminución en la formación de hueso, como se evidenció por histomorfometría.<sup>(9)</sup> Un estudio clínico sugirió que la GGT podía ser un marcador de la reabsorción del hueso en humanos. Los autores demostraron que la excreción urinaria de GGT tuvo una alta correlación con la deoxipiridinolina, un marcador bioquímico de reabsorción ósea establecido, en un estudio de mujeres posmenopáusicas.<sup>(10)</sup>

Considerando los antecedentes expuestos, se evidencia que un marcador convencional, disponible en cualquier laboratorio clínico, permite evaluar dos importantes eventos muy relacionados durante el curso evolutivo de la artritis reumatoide: el estrés oxidativo crónico (erosivo e inductor de citoquinas proinflamatorias) y la reabsorción ósea causada por una osteoclastogénesis descontrolada.

Además, se había demostrado que la terapia combinada de metotrexate + ozono médico potenció la respuesta clínica, en pacientes con artritis reumatoide, comparado con pacientes que solo recibieron el metotrexate. Los marcadores clínicos convencionales (DAS<sub>28</sub>, HAQ-DI, dolor, proteína C reactiva y velocidad de sedimentación globular) correlacionaron significativamente con las concentraciones de glutatión reducido en los pacientes que recibieron la terapia combinada metotrexate + ozono,<sup>(11)</sup> y como ya se mostró en la figura 1, la GGT está estrechamente relacionada con la homeostasis o destrucción del glutatión.

Asociando estos antecedentes, el objetivo de este trabajo es investigar si el ozono médico es capaz de regular la GGT, considerando que uno de los mecanismos de acción del ozono es el mantenimiento del estado antioxidante/prooxidante de la célula, y si estos efectos se correlacionaban con el glutatión (antioxidante) y la respuesta clínica de pacientes con artritis reumatoide tratados con metotrexate + ozono. Basados en la evidencia, se propone el empleo de la GGT, marcador disponible en la generalidad de los laboratorios clínicos, como un indicador que permite dar seguimiento a la respuesta clínica del ozono en esta disfunción artrítica.

## MÉTODOS

### Diseño del estudio

Se realizó un estudio clínico controlado, y al azar, que fue aprobado por los Consejos Científicos y Comités de Ética de las instituciones involucradas (Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana y el Centro de Reumatología de Cuba) y en correspondencia con los principios de la Declaración de Helsinki de 2005.<sup>(12)</sup>

Todos los pacientes ofrecieron su consentimiento informado para su incorporación a la investigación, después de recibir una información adecuada, concerniente al estudio (sus características, beneficios y posibles efectos indeseables). Todos los profesionales que participaron en el estudio asistieron a un programa de entrenamiento para familiarizarlos con los objetivos y los planes de tratamiento. Se les recalcó a los médicos participantes, que cada paciente se trataría al azar con los esquemas de tratamiento previstos, mediante el empleo de una tabla de aleatorización.<sup>(13)</sup>

Para calcular el tamaño de la muestra se empleó el Sistema Medstat, Inc. (versión 2.1, 1989; Fridley, MN, USA). La diferencia estadística entre el comienzo y el fin de la terapia con ozono fue de 0,2, con un error tipo 1 de 0,05.<sup>(14)</sup> Se incluyó en el estudio un total de 50 pacientes.

**Criterios de inclusión:** fueron elegibles para participar en el estudio los pacientes adultos, mayores de 18 años, de uno y otro sexos y diferentes orígenes étnicos, con un diagnóstico de artritis reumatoide y que cumplieran con los criterios actualizados de la Asociación Americana de Reumatología.<sup>(15)</sup> Fueron escogidos los pacientes atendidos en el Centro Nacional de Reumatología de Cuba, quienes cumplieron, además, con los criterios siguientes: DAS 28  $>3,2 \leq 5,1$ , cuyo examen fue llevado a cabo, a ciegas, por un reumatólogo diferente al que seleccionaba, inicialmente y al azar, a los pacientes de acuerdo con el esquema de tratamiento y una preliminar y breve anamnesis. También se consideraron los resultados de los anticuerpos contra péptidos cíclicos citrulinados séricos (anti-PCC  $> 10$  U/mL), HAQ-DI, de acuerdo con la versión española validada,<sup>(16)</sup> proteína C reactiva y velocidad de sedimentación globular.

**Criterios de exclusión:** no se incluyeron en el estudio a los pacientes con antecedentes de enfermedades crónicas como alteraciones del hígado, diabetes mellitus, trastornos respiratorios, enfermedades cardiovasculares, abuso del alcohol y hábito de fumar, pacientes con síndromes que se superponen a la artritis reumatoide como cáncer y enfermedades autoinmunes y a las mujeres embarazadas. También se excluyó a los pacientes que hubieran recibido tratamiento con otros fármacos modificadores de la enfermedad, diferentes al metotrexate, anti-TNF u otros agentes biológicos, por al menos 3 meses antes del estudio.

1. Los pacientes fueron distribuidos, al azar, en dos grupos de tratamiento diferentes: Grupo Metotrexate (12,5 mg, intramuscular, una vez por semana, cada lunes de 9:00 a 10:00 a.m.) + ibuprofeno (400 mg, oral, una tableta cada 8 horas)+ácido fólico (5 mg, oral, una tableta al día de miércoles a sábado).
2. Grupo Metotrexate + ozono médico: igual que el grupo anterior, pero incorporando el ozono, como se describe a continuación. El ozono fue generado por un equipo OZOMED, CNIC, Cuba. Se administraron 20 tratamientos (1 ciclo) por insuflación rectal (5 veces por semana, de lunes a viernes), en un rango de concentración de 20-35 mg/L de forma escalonada y creciente:
  - a) Primera semana: 25 mg/L, 100 mL.
  - b) Segunda semana: 30 mg/L, 150 mL.
  - c) Tercera semana: 35 mg/L, 200 mL.
  - d) Cuarta semana: 35 mg/L, 200 mL.

**Determinaciones bioquímicas:** Las muestras de sangre para los ensayos bioquímicos se obtuvieron durante la noche después de un ayuno de 12 h. Las determinaciones bioquímicas se realizaron al comienzo y 24 h después del último tratamiento con ozono (día 21 después de iniciado el estudio).

Los anticuerpos contra péptidos cíclicos citrulinados se determinaron mediante un *kit* ELISA (DRG Diagnostics, GmbH, Alemania) (sensibilidad del 90 %, especificidad 98,3 % y eficacia diagnóstica 95,3 %). La proteína C reactiva se analizó con un ensayo de aglutinación (ensayo Latex CRO) (BioSistemas S:A. Reagent and Instruments Costa Brava 30, Barcelona, España) y la velocidad de sedimentación globular se obtuvo mediante el método cuantitativo de Westergreen.

La actividad de la GGT y el GSH se halló en suero. La GGT se estimó en un equipo HITACHI (Japón) con un *kit* compatible. El GSH se cuantificó en un lector de placas SUMA, Cuba, a 412 nm. Después de la precipitación de los tioles proteicos, con ácido tricloro acético al 10 %, se determinó el glutatión reducido (GSH) según el reactivo de Ellman (5 '5 dithiobis [ácido 2-nitrobenzoico]  $10^{-2}$  M [Sigma St Louis, MO,USA]),<sup>(17)</sup>

**Análisis estadístico:** Inicialmente se usó el ensayo de OUTLIERS para la eliminación de puntos aberrantes. Después se procesaron los datos con el análisis de varianza de una vía (ANOVA one way), seguido de un ensayo de homogeneidad de varianza (Bartlett-Box). Además, se utilizó un ensayo de comparación múltiple (Student-Newman-Keuls). Para los estudios de linealidad se empleó el coeficiente de correlación de Pearson. Los resultados se presentan como la Media  $\pm$  DE de la media. Como nivel de significación estadística se utilizó, al menos,  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### Características generales de los pacientes involucrados en el estudio

Ambos grupos fueron similares, en su distribución al azar, por tipo de tratamiento ( $p > 0,05$ ) ([Tabla 1](#)). No se observaron diferencias entre los grupos (MTX y MTX + ozono) con respecto a la edad, terapia previa y tiempo de evolución de la AR. Con respecto al sexo, los resultados fueron similares a otros informes en los que predominó el sexo femenino. Las mujeres son afectadas por esta enfermedad autoinmune alrededor de 3 veces más frecuentemente que los hombres, pero la causa de esta diferencia se desconoce. Se observó un incremento en pacientes de raza blanca.

**Tabla 1.** Cuadro clínico de los pacientes incluidos en el estudio.

Datos demográficos/Historia de los pacientes	Grupo MTX (n = 50)	Grupo MTX+ozono (n = 50)
Sexo		
Femenino (n/%)	47/94	48/96
Masculino (n/%)	3/6	2/4
Años	53 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	57 $\pm$ 7 <sup>a</sup>
Terapia previa		
Metotrexate (n/%)	50/100	50/100
Corticoesteroides	0	0
Tiempo de evolución de la enfermedad (años)	7 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	11 $\pm$ 3 <sup>a</sup>
Color de la piel		
Blanca (n/%)	37/74	41/82
Mestiza (n/%)	13/26	9/18

Grupo MTX: MTX + Ibuprofeno + Ácido Fólico.

Grupo MTX+ozono, igual que MTX pero incorporando el ozono médico.  
Los datos reflejando la edad y el tiempo de evolución de la enfermedad se expresan como la media  $\pm$  DE. Medias con letras diferentes indican diferencias significativas  $p < 0.05$ .

### Comportamiento de las variables clínicas principales al comienzo y al final del estudio

Al comienzo del estudio el grupo tratado con la terapia combinada MTX + ozono mostró una intensidad del dolor más alta que los pacientes que solo recibieron MTX.

Al final del experimento (21 días) se apreció una disminución significativa para los pacientes con la terapia combinada, no así para los tratados solo con MTX.

Las variables DAS 28, HAQ-DI, proteína C reactiva y la velocidad de sedimentación globular exhibieron un cuadro semejante al de la variable dolor. Los resultados con los anticuerpos contra los péptidos cíclicos citrulinados fueron los siguientes: mientras que los pacientes que recibieron MTX+ozono disminuyeron los títulos de estos autoanticuerpos, los tratados con MTX no modificaron los niveles de anti-PCC.

Al final del estudio, el análisis estadístico entre los dos grupos de tratamiento evidenció que todas las variables clínicas mejoraron significativamente para la terapia combinada MTX + ozono con respecto a los pacientes que recibieron la monoterapia (MTX) ([Tabla 2](#)).

**Tabla 2.** Características clínicas de los pacientes con artritis reumatoide al comienzo y al final del estudio.

Variables clínicas	Grupo MTX (n = 50)		Grupo MTX+ozono (n = 50)	
	Inicio	Final	Inicio	Final
Dolor	8.2 ± 0.4 <sup>a</sup>	7 ± 0.6 <sup>a</sup>	9.2 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.7 ± 0.3 <sup>b,c</sup>
DAS <sub>28</sub>	5.6 ± 0.3 <sup>a</sup>	5.2 ± 0.3 <sup>a</sup>	6.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	3.2 ± 0.3 <sup>b,c</sup>
HAQ-DI	1.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.0 <sup>b,c</sup>
PCR	21 ± 7 <sup>a</sup>	13 ± 4 <sup>a</sup>	16 ± 4 <sup>a</sup>	5 ± 1 <sup>b,c</sup>
VSG	40 ± 6 <sup>a</sup>	40 ± 6 <sup>a</sup>	36 ± 6 <sup>a</sup>	20 ± 4 <sup>b,c</sup>
Anti-PCC	102 ± 3 <sup>a</sup>	119 ± 3 <sup>a</sup>	107 ± 6 <sup>a</sup>	89 ± 3 <sup>b,c</sup>

Grupo MTX: MTX + Ibuprofeno + Ácido Fólico.

Grupo MTX+ozono: igual que MTX pero incorporando el ozono médico.

DAS<sub>28</sub>: Actividad de la enfermedad

(baja actividad ≤ 3.2; moderada actividad >3.2 y ≤ 5.1 y alta actividad > 5.1.

HAQ-DI: Índice de discapacidad (+ > 1.25), PCR: Proteína C Reactiva (+ > 6 mg/l en suero), VSG:(mas. 7-8 fem. 11-16 mm), Anti-PCC:(+>10 U/ml en suero).

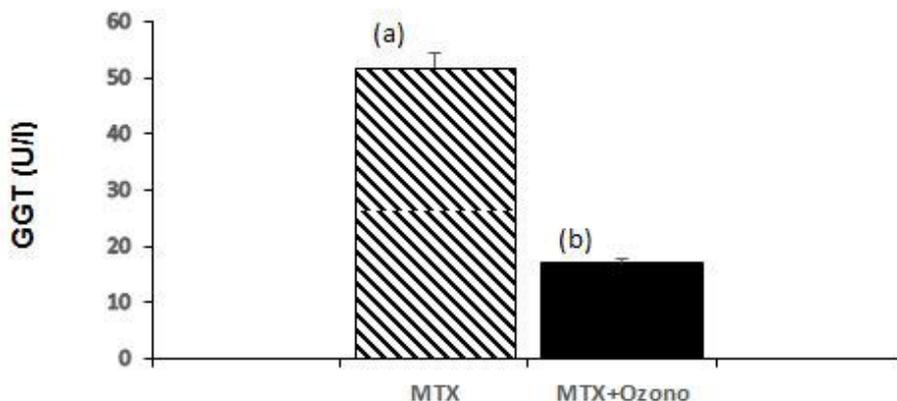
Inicio: significa, antes del comienzo del estudio y Final después del último tratamiento de ozono (21 días después de comenzado el estudio).

Los datos se presentan como la media ± DE. Valores de la media con diferentes letras indican diferencias significativas (p < 0.05)

(c) p < 0.05 al final del estudio (21 días): grupo MTX+ozono vs grupo MTX.

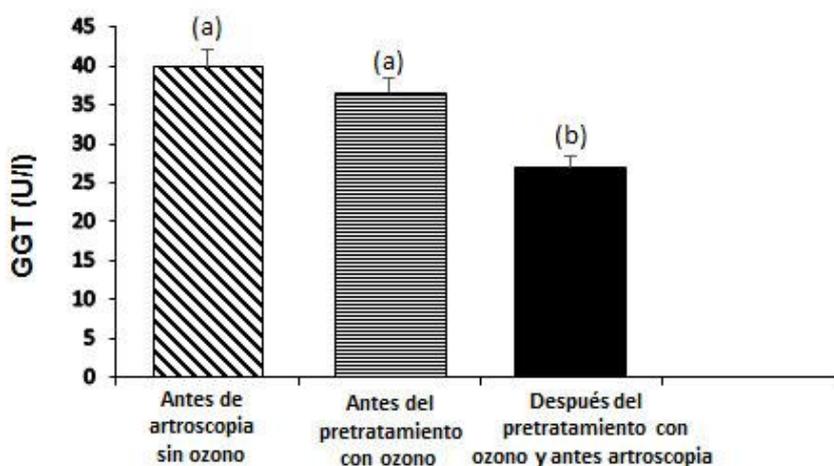
Al final del estudio clínico también se obtuvieron resultados diferentes en los niveles de GGT, glutatión reducido (GSH), y la relación GSH / variables clínicas, en pacientes con AR tratados con MTX y MTX + ozono.

Los efectos del ozono sobre la GGT se muestran en la [figura 2](#) donde se observó una disminución significativa (p < 0,05) de la actividad de la GGT que retornó al intervalo de referencia (0-36 U/L); mientras que el grupo de pacientes que recibió la monoterapia (MTX) mantuvo niveles elevados de GGT.



**Fig. 2** Niveles de GGT en pacientes con AR tratados con MTX y la terapia combinada MTX+ozono, al final del estudio (20 tratamientos) de ozono por insuflación rectal. Los datos se presentan como la media ± DE. Valores de la media con diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

En otro estudio que se encuentra en fase de desarrollo sobre osteoartritis de rodilla (grados III-IV) en pacientes que requieren una artroscopia terapéutica se encontró que el grupo de pacientes ( $n = 20$ ) que recibió un tratamiento prequirúrgico con ozono (20 tratamientos por insuflación rectal) redujo significativamente los niveles de GGT antes de la intervención quirúrgica, comparado con las concentraciones de GGT de pacientes ( $n = 20$ ) que solo iban a recibir la artroscopia (Fig. 3).



**Fig. 3** Niveles de GGT en pacientes con OA de rodilla tributando a una artroscopia terapéutica que reciben, como único tratamiento, fármacos antiinflamatorios no esteroideos.

**Antes de Artroscopia sin ozono:** pacientes solo con análisis pre-operatorio antes de la artroscopia

**Antes del pretratamiento con ozono:** pacientes que aún no habían recibido el ozono pre-quirúrgico.

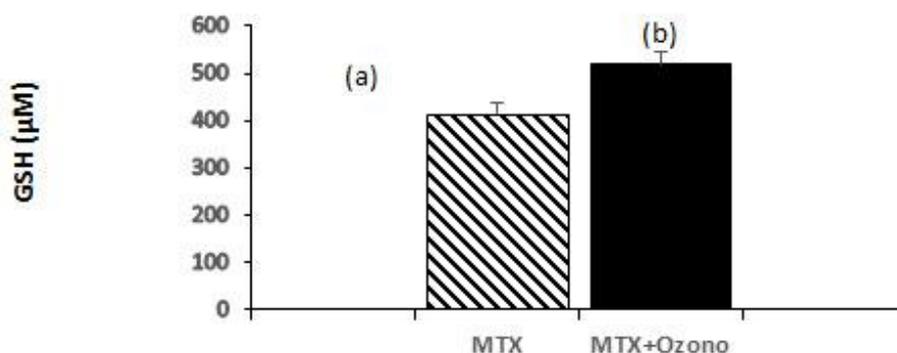
**Después del pretratamiento con ozono y antes de la artroscopia:** pacientes que recibieron 20 tratamientos de ozono, previos a la artroscopia.

Los datos se presentan como la media ± DE. Valores de la media con diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Estos resultados sugieren que los pacientes que fueron preconditionados con el ozono médico recibían la artroscopía en condiciones más favorables, en cuanto a estrés oxidativo y otros riesgos, comparados con los pacientes que no recibieron el tratamiento prequirúrgico.

Como ya habíamos mencionado, la GGT se encuentra estrechamente relacionada con los niveles de GSH, donde un incremento de la GGT va a conducir a una degradación del GSH, que acentúa el estrés oxidativo y el daño articular y al hueso en pacientes con AR (véase la [figura 1](#)).

Cuando se evaluaron los efectos del ozono sobre las concentraciones de GSH, se obtuvieron los resultados que se muestran en la [figura 4](#), donde se apreció un incremento significativo de este antioxidante endógeno para la terapia combinada MTX + ozono con respecto a los pacientes que solo recibieron la monoterapia (MTX).



**Fig. 4** Niveles de GSH en pacientes con AR tratados con MTX y la terapia combinada MTX+ozono, al final del estudio (20 tratamientos) de ozono por insuflación rectal. Los datos se presentan como la media ± DE. Valores de la media con diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Las correlaciones lineales entre los marcadores redox y las variables clínicas estudiadas evidenciaron que el único biomarcador que correlacionó con todas las variables clínicas fue el GSH en el grupo tratado con MTX + ozono ([Tabla 3](#)).

**Tabla 3.** Correlación entre el GSH y las Variables clínicas en pacientes con AR tratados con MTX+ozono al final del estudio.

Variables	Coefficiente correlación	Significación estadística
GSH vs PCR	0.68	$p = 0.007$
GSH vs VSG	0.63	$p = 0.016$
GSH vs DAS <sub>28</sub>	0.576	$p = 0.031$
GSH vs HAQ-DI	0.725	$p = 0.003$

GSH: glutatión reducido, PCR: Proteína C Reactiva, VSG: Velocidad de Sedimentación Globular, DAS<sub>28</sub>: Registro de la Actividad de la Enfermedad, HAQ-DI: Índice de Discapacidad.

Para comprobar si existía una relación entre los niveles de GGT y las concentraciones de GSH atendiendo a su relación funcional en la población de pacientes con AR tratada con la terapia combinada MTX + ozono, se evaluó el coeficiente de correlación de Pearson (GSH vs. GGT), con los resultados siguientes: en el 70 % de los pacientes se demostró una correlación lineal negativa, o sea, en la medida en que incrementaba la GGT disminuía el GSH (figura 1) con coeficiente de correlación de -0,61 y una significación estadística de 0,013 ( $p < 0,05$ ).

## DISCUSIÓN

Con el ozono médico se pudo regular las concentraciones de la GGT en dos enfermedades artríticas: AR y osteoartritis de rodilla.

La GGT se considera un indicador de estrés oxidativo.<sup>(18)</sup> Cuando el estrés oxidativo se instaura en la AR, activa el factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B y promueve la liberación de citoquinas proinflamatorias, metaloproteinasas y otras moléculas que dañan el cartílago y hueso. Además, el estrés oxidativo crónico, debido a una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, oxida a las proteínas que, una vez transformadas por oxidación, pueden conducir a una respuesta inmunitaria y activación de linfocitos artritogénicos.<sup>(19)</sup>

El hueso es un tejido metabólicamente activo y tanto su formación como la reabsorción ocurren durante toda la vida. Este proceso de remodelación es el origen de la masa ósea y está regulado por muchos factores: locales y sistémicos.<sup>(20)</sup>

Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la GGT afecta el metabolismo óseo. Tanto la deficiencia como el exceso de GGT están involucrados en la remodelación anormal del hueso, lo que causa una disminución de la masa ósea.<sup>(6)</sup> La deficiencia de GGT es una enfermedad recesiva autosómica muy poco frecuente, desde el punto de vista clínico, y solo se han notificado unos pocos casos en el mundo.<sup>(21,22)</sup> En cambio, se pueden encontrar muchos pacientes con un exceso de GGT. Por lo tanto, el exceso de GGT, más que su deficiencia, es clínicamente relevante para la salud.<sup>(6)</sup>

Otro importante papel patológico de la GGT, asociado al metabolismo óseo, es su capacidad de activar la osteoclastogénesis. Un estudio realizado en 462 sujetos humanos (289 hombres y 173 mujeres) a quienes se les evaluó la densidad mineral ósea demostró que los niveles séricos de GGT ( $\geq 39$  U/L en hombres y  $\geq 21$  U/L en mujeres) estuvieron asociados con un riesgo incrementado de una masa ósea baja, incluyendo osteopenia y osteoporosis.<sup>(21)</sup> Esto sugiere que la GGT puede afectar el metabolismo óseo. Otros estudios que emplearon ratones transgénicos con una GGT mutada y desprovista de actividad como enzima mostraron que esta fue también tan potente como la GGT enzimática para inducir formación de osteoclastos, lo que indica que esta GGT no actúa como una enzima, sino como una citoquina.<sup>(23)</sup> La osteopenia en estos ratones se atribuyó a un incremento en la reabsorción ósea y una disminución en la formación del hueso.<sup>(23)</sup> Es interesante que en estos ratones se restableció la deficiencia de cisteína mediante la suplementación con N-acetil cisteína, un precursor del GSH, y se atenuaron las anomalías esqueléticas.<sup>(21)</sup>

Se concluye que la GGT parece afectar la formación del hueso, fundamentalmente, a través de su actividad enzimática sobre el metabolismo del GSH (figura 1) y también incide sobre la reabsorción ósea como una citoquina, independientemente de la actividad enzimática. En esta dirección, otros autores demostraron que la GGT está involucrada en las enfermedades caracterizadas por una

osteoclastogénesis patológica y destrucción del hueso.<sup>(7)</sup> Los receptores Toll tipo 4 reconocen a la GGT y activan la osteoclastogénesis asociada con inflamación.<sup>(7)</sup>

La GGT es el punto de unión entre el estrés oxidativo y la reabsorción ósea, los que mutuamente se presuponen. La regulación de la GGT por el ozono posee también un interés particular, dado que la GGT se considera un marcador de riesgo de varias enfermedades que constituyen comorbilidades de los pacientes con AR, luego la regulación de esta enzima por el ozono médico, como valor adicional, atenúa los riesgos de estas complicaciones. Algunas de estas comorbilidades se muestran en la [tabla 4](#).

**Tabla 4.** Algunas enfermedades de riesgo, para pacientes con artritis reumatoide, y su relación con los niveles de GGT

Algunas enfermedades de riesgo	Niveles de GGT (UI/l)	Referencias
Valor Límite	14 UI/L (hombres) 9 UI/L (mujeres)	
100% de Riesgo para Cáncer, Insuficiencia Vascolar e Isquemias (miocardio y cerebral)	>56 UI/L (hombres) >36 UI/L (mujeres)	(24)
Insuficiencia renal en estado terminal Incremento de GGT en paralelo con severidad de la enfermedad (seguimiento durante 7 años)	10.5, 14.5, 18.6, 20.2, 21.4, 22.1, 26.6 y 29.2 UI/L	(25)
Diabetes con microalbuminuria	35 UI/L	(26)

## CONCLUSIONES

El ozono médico pudo regular la actividad de la enzima GGT en el suero humano en dos enfermedades artríticas: artritis reumatoide y osteoartritis de rodilla (grados III-IV). La GGT correlacionó linealmente con el GSH, un miembro importante del sistema de defensa antioxidante, el que a su vez correlacionó con todas las variables clínicas (DAS 28, HAQ-DI, PCR y VSG). Esto indica su participación en esta enfermedad autoinmune, así como el papel patológico de la GGT en la AR, debido a su relación funcional (figura 1) y la correlación demostrada entre ambos mediadores. La GGT se debe considerar como un indicador de la eficacia del ozono médico en las enfermedades estudiadas, por su doble función: biomarcador de estrés oxidativo e indicador de la remodelación patológica del hueso.

## REFERENCIAS

1. Zhang H, Forman HJ, Choi J. Gamma-glutamyl transpeptidase in glutathione biosynthesis. *Methods Enzymol.* 2005;401:468-83.
2. Fraser A, Harris R, Sattar N, Ebrahim S, Smith GD, Lawlor DA. Gamma-glutamyl transferase is associated with incident vascular events independently of alcohol intake: analysis of the British Women's Heart and Health Study and Meta-analysis. *Arterioscler Throm Vasc Biol.* 2007;27:2729-35.
3. Lee DH, Silventoinen K, Jacobs DR Jr, Jousilahti P, Tuomilehto J. gamma-Glutamyl transferase, obesity and the risk of type 2 diabetes: observational cohort study among 20,158 middle-aged men and women. *J. Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:5410-4.

4. Ruttman E, Brant LJ, Concin H, Diem G, Rapp K, Ulmer H. Gamma-glutamyl transferase as a risk factor for cardiovascular disease mortality: an epidemiological investigation in a cohort of 163 944 Austrian adults. *Circulation*. 2005;112:2130-7.
5. Gerald K, Stephanie S. Gamma-Glutamyl transferase: A predictive biomarker of cellular antioxidant inadequacy and disease risk. *Disease Markers*; 2015 [Internet]. [Acceso 01/07/2019] 2015. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1155/2015/818570>
6. Han SCh, Kwang JK, Yumie R, Sung-Kil L. Serum g-Glutamyl transferase is inversely associated with bone mineral density independently of alcohol consumption. *Endocrinol Metab*. 2016;31:64-71.
7. Sawako M, Takeshi I, Keiko S, Mutsumi M, Takashi T, Keigo S, *et al*.  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase is an endogenous activator of Toll-like receptor 4-mediated osteoclastogenesis. *Scientific Repo*. 2016;6:35930.
8. Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:292-304.
9. Hiramatsu K, Asaba Y, Takeshita S, Nimura Y, Tatsumi S, Katqagiri N. Overexpression of gamma glutamyl transferase in transgenic mice accelerates bone resorption and causes osteoporosis. *Endocrin*. 2007;148:2708-15.
10. Asaba Y, Hirmatsu K, Matsui Y, Harada A, Nimura Y, Katagiri N. Urinary gamma galutamyl transferase (GGT) as a potential marker of bone resorption. *Bone*. 2006;39:1276-82.
11. León Fernández OS, Viebahn-Haensler R, López Cabreja, Serrano Espinosa I, Hernández Matos Y, Delgado Roche L, *et al*. Medical ozone increases methotrexate clinical response and improves cellular redox balance in patients with rheumatoid arthritis. *Eur J of Pharmacol*. 2016;789:313-8.
12. World Medical Association Declaration of Henlsinki, 2005. Ethical Principles for Medical Research involving Human subjects. [Acceso 12/05/2019] 2005. Disponible en: [www.bioethics.nih.gov/international/declarat/helsinki.rtf](http://www.bioethics.nih.gov/international/declarat/helsinki.rtf)
13. Research Randomizer Form v 4.0 [Internet]. [Acceso 08/04/2019] 2019. Disponible en: [www.randomizer.org/form.htm](http://www.randomizer.org/form.htm)
14. Levy PS, Lemenshow S. *Sampling of Populations. Methods and Applications* John. New Jersey: Ed. Wiley & Sons; 1991.
15. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, Mc Shane DJ, Fries JF, Cooper NS, *et al*. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification or rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 1988;31:315-24.
16. Cardiel MH, Abello-Banfi M, Ruiz-Mercado R, Alarcón-Segovia D. How to measure health status in rheumatoid arthritis in non-English speakin patients: validation of a Spanish version of the Health Assessment Questionnaire Disability Index (Spanish HAQ-DI). *Clin Exp Rheumatol*. 1993;11:117-21.
17. Sedlak J, Lindsay RH, Estimation of total protein. Bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman´s reagent. *Anal Biochem*. 1968;25:192-205.

18. Meenakshi S, Adinath NS, Nitin HU. Is gamma-glutamyl transpeptidase a biomarker for oxidative stress in periodontitis? *J Indian Soc Periodontol*. 2015;19:150-4.
19. Toru I. Molecular hydrogen: New antioxidant and anti-inflammatory therapy for rheumatoid arthritis and related diseases. *Current Pharm Design*. 2013;19:6375-81.
20. Zaidi M. Skeletal remodeling in health and disease. *Nat Med*. 2007;13:791-801.
21. Iida M, Yasuhara T, Mochizuki H, Takakura H, Yanagisawa T, Kubo H. Two Japanese brothers with hereditary gamma glutamyl transpeptidase deficiency. *J Inherit Metab Dis*. 2005;28:49-55.
22. Ristoff E, Larsson A. Inborn errors in the metabolism of glutathione. *Orphanet J Rare Dis*. 2007;2:16-20.
23. Levasseur R, Barrios R, Elefteriou F, Glass DA, Lieberman MW, Karsenty G. Reversible skeletal abnormalities in gamma-glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Endocrinol*. 2003;144:2761-4.
24. Kazemi-Shirazi L, Endler G, Winkler S, Schickbatter T, Wagner O, Marsik C. Gamma glutamyltransferase and long term survival: is it just the liver? *Clin Chem*. 2007;5:940-6.
25. Lee DH, Ha MH, Kam S. A strong secular trend in serum gamma-glutamyl transferase from 1996-2003 among South Korean men. *Am J of Epidemiol*. 2006;163:57-65.
26. Aydın, Ilkcan C, Dogan E, Karaca Z, Koçyiğit I, Sipahioğlu MH, *et al*. Gamma-Glutamyl Transferase is related to microalbuminuria in diabetic patients. *Turkish Nephrology, Dialysis and Transplantation Journal*. 2014;23(3):217-22.

### **Conflicto de interés**

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.