

Inmunopatogénesis de la enfermedad periodontal y células Th17: ¿Continúa la controversia?

Immunopathogenesis of periodontal disease and Th17 cells: Controversy does it persist?

ISAZA-GUZMÁN DM*
TOBÓN-ARROYAVE SI*
MARTÍNEZ-PABÓN MC*

Isaza-Guzmán DM, Tobón-Arroyave SI, Martínez-Pabón MC. *Inmunopatogénesis de la enfermedad periodontal y células Th17: ¿Continúa la controversia?* Av Periodon Implantol. 2016; 28, 3: 115-124.

RESUMEN

Ha sido ampliamente reconocido que la enfermedad periodontal (EP) es una entidad inflamatoria de origen infeccioso, en la cual, la activación inmunológica del hospedero lleva a la destrucción de los tejidos de soporte de los dientes. En la inmunopatogénesis participan tanto los mecanismos de la respuesta inmune innata como de la respuesta inmune adaptativa, específicamente la activación de linfocitos T CD4+ y sus subpoblaciones, lo que ha generado controversias en cuanto al perfil de citoquinas presentes en relación con la severidad de la enfermedad.

En esta revisión, se recoge la evidencia disponible acerca de la participación de las células Th17 y sus citoquinas, especialmente IL-17, en la progresión de la enfermedad tomando en cuenta el tipo de muestra biológica y el método utilizado para su detección. Tomada en conjunto, ésta señala una participación importante de la IL-17 en la EP, pero no está claro su papel dominante como una citoquina protectora o destructora. Además, se ha demostrado una enorme plasticidad en la activación de las células Th17 adquiriendo funciones inmunomoduladoras dependiendo del entorno inmunológico en el cual se lleve a cabo su activación. Por ahora es claro que IL-17 hace parte del conjunto de moléculas que se activan en respuesta a la colonización por periodontopatógenos, pero no es todavía posible restringir la inmunopatogénesis de la EP a un perfil de moléculas determinado cuando confluyen múltiples factores en la presentación clínica de la enfermedad.

PALABRAS CLAVE: Enfermedad periodontal, inmunopatogénesis, células Th17, IL-17, IL-21, IL-22.

SUMMARY

It is widely recognized that periodontal disease (PD) is an inflammatory condition of infectious origin, in which the host immune activation leads to destruction of the teeth-supporting tissues. In the immunopathogenesis of PD are involved both the innate and the adaptive mechanisms of the immune response, specifically the activation of CD4+ T lymphocytes and their subpopulations, which has generated controversy regarding the profile of cytokines present in relation to the severity of the disease.

This review will address the available evidence for the involvement of Th17 cells and their cytokines, especially IL-17, in the progression of the disease taking into account the type of biological sample and the method used for its detection. Taken together, the evidence indicates an important role of IL-17 in PD, but it is unclear its dominant role as a protective or destructive cytokine. Furthermore, it has been demonstrated a great functional plasticity in Th17 cells activation depending of the environmental conditions in which takes place its activation. By now it is clear that IL-17 belongs to an assembly of molecules that are activated in response to colonization by periodontopathogens,

* Grupo de Investigación en Patología Oral, Periodoncia y Cirugía Alveolo-Dentaria (POPCAD). Laboratorio de Inmuno-detección y Bioanálisis. Facultad de Odontología. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia..

but it is not yet possible to restrict the immunopathogenesis of PD to a particular molecules profile when multiple factors converge in the clinical presentation of the disease.

KEY WORDS: Periodontal disease, immunopathogenesis, Th17 cells, IL-17, IL-21, IL-22.

Fecha de recepción: 13 de febrero de 2015.

Fecha de aceptación: 5 de mayo de 2015.

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad Periodontal (EP) es la entidad inflamatoria crónica de origen infeccioso más común en el hombre y la forma más prevalente de patología ósea en humanos, en la cual, la activación inmunológica del hospedero lleva a la destrucción de los tejidos de soporte de los dientes (1). Desde el punto de vista clínico puede considerarse como una entidad *espectral o polar*, comparable con otras enfermedades inflamatorias crónicas infecciosas como tuberculosis, lepra o leishmaniasis (2), las cuales presentan formas benignas que bien se autolimitan o que pueden hacer el tránsito hacia formas más severas y en las cuales concurren, además de los microorganismos, una serie de factores que modifican las condiciones del hospedero, lo que Armitage denomina la “constelación de las enfermedades periodontales” (3).

Desde el punto de vista microbiológico, la enfermedad periodontal se diferencia de otras enfermedades infecciosas en que:

1. No es causada por un solo microorganismo sino por un grupo de microorganismos (polimicrobiana) (4).
2. Los microorganismos periodontopatógenos no tienen su hábitat principal por fuera del hospedero, y la enfermedad se asocia a la pérdida del equilibrio de la relación hospedero-microflora residente
3. Los microorganismos se encuentran organizados formando biopelículas (“biofilms”). Biológicamente, éstas se consideran estructuras funcionalmente organizadas para controlar la interacción de especies bacterianas, sus tasas de crecimiento, expresión génica, producción de toxinas e invasividad (5).
4. La biopelícula está adherida al esmalte de los dientes, por fuera de los tejidos pero en yuxtaposición con las estructuras periodontales (6).

En estas condiciones, la periodontitis se convierte en un reto para el sistema inmune en términos de diversidad, cantidad y virulencia de los periodontopatógenos; además, su organización como una biopelícula compleja, le confiere a los patógenos una protección

eficiente contra los mecanismos de defensa del hospedero, haciendo más difícil su control (1).

INMUNOPATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

La colonización bacteriana del surco gingival marca el inicio de la respuesta del hospedero a los microorganismos orales, evento que se da en forma natural desde el momento mismo de la erupción dental. Sin embargo, el surco cuenta con mecanismos de protección que ayudan a mantener la salud de los tejidos periodontales. Uno de ellos es la barrera anatómica de la mucosa intacta, que mediante la descamación fisiológica, remueve aquellos microorganismos adheridos al epitelio evitando así su colonización; otro mecanismo es la presencia del fluido crevicular gingival (FCG), que actúa como una barrera mecánica mediante la remoción de bacterias y otros componentes, y como barrera química porque contiene proteínas antimicrobianas sintetizadas localmente o por extravasación plasmática (7).

Inmunidad innata

El establecimiento de una respuesta de tipo inmunológico a la acumulación de microorganismos alrededor del diente, se inicia con el reclutamiento de leucocitos a éstas áreas, especialmente Polimorfonucleares Neutrófilos (PMNs). La interacción de las bacterias, a través de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), con las células del hospedero que las rodean, marca el inicio de la respuesta inmune innata, que lleva finalmente a la activación de las vías de señalización intracelular que activan la transcripción de genes específicos (8). El Lipopolisacárido (LPS) presente en la pared celular de las bacterias gram negativas se constituye en la mayor forma de comunicación entre la placa subgingival y el hospedero, siendo un potente estimulador de las células de la respuesta inflamatoria. De esta manera, las células estimuladas

secretan una serie de mediadores químicos y citoquinas, los cuales están involucrados en la amplificación del proceso inflamatorio y en los procesos de destrucción tisular. Este proceso se lleva a cabo a través de la vía LPS-LBP-CD14/TLR4 (LPS-Proteína de unión al LPS-CD14/Receptor tipo Toll-4). El CD14 es una molécula clave responsable del reconocimiento innato de bacterias por células del hospedero; funciona como un receptor importante de LPS en macrófagos y PMNs (9) así como en fibroblastos gingivales y del ligamento periodontal (10, 11). Se ha demostrado que el CD14 es uno de los mayores receptores para LPS de *P. gingivalis*, el cual estimula la liberación de una serie de citoquinas proinflamatorias y moléculas relacionadas tales como Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF- α), Interleucina-8 (IL-8), IL-6 y la Molécula de Adhesión Intercelular-1 (ICAM-1), e induce la reabsorción ósea a través de la acción de IL-1 β e IL-6 endógena por una vía dependiente de CD14 (9).

La activación de la vía alterna del sistema del complemento en el surco gingival lleva a la producción de anafilotoxinas como C3a y C5a, las cuales a su vez, inducen la liberación de histamina y posteriormente de metabolitos del ácido araquidónico por parte de los mastocitos presentes en el tejido gingival. Estos mediadores producen un aumento de la permeabilidad vascular activando posteriormente el tránsito leucocitario, especialmente de PMNs en este lugar, e incrementando así el proceso inflamatorio local. Sin embargo, dichas células son incapaces de fagocitar las bacterias, las cuales se encuentran formando biopelículas y como tal, están adheridas firmemente a la superficie del diente. En esta situación, los PMNs liberan el contenido lisosomal al surco gingival, contribuyendo a la destrucción local del tejido conectivo (12).

En un período de 4 a 7 días de acumulación de placa, se incrementa el número de linfocitos y macrófagos en el surco gingival. Se inicia entonces el proceso de presentación antigénica por parte de las células de Langerhans, las cuales se desplazan hasta los ganglios linfáticos regionales para presentar antígenos a los linfocitos T CD4+, lo cual lleva al reclutamiento y posterior diferenciación en células efectoras y de memoria. Puesto que la mayoría de los periodontopatógenos reside en las bolsas periodontales y no invade los tejidos, el sistema inmune no puede eliminar eficientemente los microorganismos. Esta persistencia del estímulo bacteriano conduce a la inflamación crónica y a una respuesta continua del hospedero, lo cual lleva finalmente a la destrucción tisular (13).

Inmunidad adaptativa

La naturaleza de la inmunidad adaptativa es clave en este proceso inflamatorio, y el balance entre las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ es crucial, siendo aquí donde se ha generado mayor controversia para explicar la inmunopatogénesis de la EP.

Desde 1986, cuando Mosmann et al (14) hicieron la primera descripción de la división de las células T CD4+ en un patrón dicotómico de subpoblaciones funcionales, denominadas Th1 y Th2 basados en la producción de citoquinas en un modelo murino de leishmaniasis cutánea, se estableció un paradigma y se abrió una especie de “caja de Pandora” de complejidad y controversia. Cuando un linfocito T CD4+ virgen está expuesto a un antígeno en presencia de IL-12 derivada de macrófagos o células dendríticas, se diferencia hacia el fenotipo Th1, el cual se caracteriza por la secreción de interferón-gamma (IFN- γ), IL-2 y TNF- β , favoreciendo una fuerte respuesta de macrófagos y producción de anticuerpos IgG. Por el contrario, cuando la célula T CD4+ recientemente activada se expone a IL-4 en el microambiente tisular, se diferencia hacia el fenotipo Th2, el cual se caracteriza por la secreción de IL-4, IL-5 e IL-13, las cuales están correguladas transcripcionalmente. Esta respuesta se caracteriza por un infiltrado abundante de plasmocitos, activación policlonal de linfocitos B lo cual lleva a la síntesis de niveles elevados de anticuerpos de baja afinidad no protectores, y a la supresión de macrófagos (15).

Durante casi 20 años, el paradigma Th1/Th2 explicó gran parte de la inmunidad mediada por células, y surgió una tendencia a catalogar las enfermedades (incluida la enfermedad periodontal) en una u otra subpoblación con el fin de explicar sus mecanismos inmunopatogénicos. Una cantidad importante de estudios acerca de estos perfiles de citoquinas en humanos, ha llevado a la formulación de varias hipótesis con las cuales se asocian las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ a las formas clínicas de la EP (16). Seymour et al (17) sustentaron el concepto de que las células Th1 y sus citoquinas predominan en las lesiones periodontales tempranas/estables, mientras que las células Th2 se asocian con progresión de la enfermedad, consistente con el predominio de células B de la lesión progresiva. Ebersole & Taubman (18) formularon su hipótesis basados en experimentos de transferencia adoptiva de células T, planteando que las células Th2 controlan los síntomas de la EP mediante el estímulo para la síntesis de anticuerpos los cuales protegen

contra la destrucción periodontal, mientras que las células Th1 aumentan la enfermedad a través de la estimulación de macrófagos para la síntesis de IL-1, lo cual lleva a la destrucción del hueso alveolar. Muchos otros investigadores han aportado evidencias tratando de explicar la EP como resultado del predominio de una u otra subpoblación, pero en conclusión, es probable que diferentes patrones de citoquinas predominen en diferentes fases de la enfermedad (16). Sin embargo, también se ha planteado que la complejidad de la EP no puede ajustarse exclusivamente a la dicotomía Th1/Th2 (15).

Recientemente se han descrito nuevas subpoblaciones de linfocitos T CD4+ tales como las células T reguladoras (Tregs), las células T ayudadoras foliculares y las subpoblaciones Th17, Th22 y Th9 (19). Estas subpoblaciones, a su vez, se definen con base en la producción de citoquinas características y la expresión de factores de transcripción específicos, los cuales dirigen y mantienen su diferenciación (20).

CÉLULAS Th17

En el 2005, se encontró que las células T CD4+ producían otras citoquinas como IL-17 que no podían clasificarse de acuerdo al esquema Th1/Th2; aquellas células T CD4+ que producían preferencialmente IL-17 pero no IFN- γ o IL-4, fueron llamadas células Th17 (21). La diferenciación de células Th0 hacia el linaje Th17 se realiza a través de un efecto regulador positivo del factor transformante del crecimiento-beta (TGF- β) en interacción con IL-21, IL-6, IL-23 o a través del eje IL-6/IL-23, y el efecto regulador negativo de las citoquinas Th1/Th2; éstos inducen la expresión del factor de transcripción ROR-c (Retinoid-related Orphan Receptor-c), el cual activa la transcripción del gen *IL-17* en linfocitos T CD4+ vírgenes y se requiere para el desarrollo de células productoras de IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 en presencia de IL-6 y TGF- β (22-24). Estas citoquinas ejercen un efecto proinflamatorio a nivel de las mucosas en respuesta a patógenos extracelulares incluyendo bacterias gram positivas, especies de bacteroides y *Borrelia*, *Candida albicans* y muy especialmente bacterias gram negativas como *Klebsiella pneumoniae* (25) y *Porphyromonas gingivalis* (26); también se han asociado con autoinmunidad (15). Como ocurre con las células Th1/Th2, no hay un marcador de superficie que sea específico para células Th17. Sin embargo, la co-expresión de los receptores de quimioquinas CCR4 y CCR6 o la expresión de CCR2 en ausencia de CCR5 parece definir las células Th17 humanas (23).

IL-17

La IL-17 constituye una familia de citoquinas a la cual pertenecen 5 isoformas estructurales: IL-17A, IL-17F, IL-17B, IL-17C e IL-17D. De éstas, IL-17A e IL-17F son las más relacionadas con un 55% de homología y son las únicas producidas por células Th17; las otras isoformas no. Ambas son activas como homodímeros, pero recientemente se han identificado heterodímeros IL-17A/IL-17F cuya función está en estudio (22). Estas citoquinas se unen a receptores específicos denominados IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC e IL-17RD. En particular, IL-17RA es una proteína transmembrana tipo I con capacidad para unirse a IL-17A e IL-17F, y se expresa ubicuamente en varios órganos, como pulmón, riñón y bazo. Dentro de las células que expresan este receptor se encuentran leucocitos, células epiteliales, mesoteliales y endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, osteoblastos, macrófagos y células dendríticas, las cuales responden a la señalización mediada por IL-17R produciendo factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), IL-6, IL-8, β -defensinas, prostaglandina E₂ (PGE₂), quimioquinas, Ligando del Receptor Activador del Factor Nuclear kappa-B (RANKL), y metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs), llevando a la granulocitopoyesis, reclutamiento de PMNs y a respuestas inflamatorias (23,24,26). A través de la producción de MMPs, la IL-17 puede destruir la matriz extracelular y causar reabsorción ósea. En el hueso, estimula a los osteoblastos a expresar RANKL, los cuales pueden activar a los osteoclastos, que expresan en su membrana la proteína RANK (Receptor Activador del Factor Nuclear kappa-B). A través de este sistema RANK/RANKL y su receptor señuelo osteoprotegerina (OPG), la IL-17 tiene un papel fundamental en artritis reumatoidea y EP (23,27).

IL-21

Esta citoquina pertenece a la familia de la IL-2, la cual incluye IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15. La proteína IL-21 humana es un polipéptido de 131 aminoácidos con una homología del 57% con la IL-21 murina. Es producida en grandes cantidades por las células Th17 y por células T asesinas naturales (NKT). Como consecuencia de su capacidad para actuar sobre múltiples células del sistema inmune, la IL-21 tiene el potencial de impactar tanto la inmunidad innata como la adaptativa. Se ha demostrado en estudios en ratones infectados con el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), que IL-21 promueve y sostiene la inmunidad a infecciones crónicas (28). Tiene un papel autocrino prepon-

derante junto con el TGF- β , en la diferenciación de esta población activando la expresión de IL-23R, el cual es crítico en este proceso, y se ha demostrado que en ausencia de IL-21 la expansión de las células Th17 es defectuosa (23). La IL-21 también inhibe el desarrollo de células T reguladoras (Tregs); además puede aumentar la producción de MMP-1, MMP-2, MMP-3 y MMP-9 por parte de los fibroblastos y de MMP-2 y MMP-9 por células epiteliales gástricas (28). En EP, se han encontrado altos niveles de IL-21 en pacientes con periodontitis crónica (PC), especialmente en biopsias gingivales comparado con FCG (29), y se encontró que los niveles en FCG disminuyen después de la terapia periodontal no quirúrgica, lo cual sugiere un papel destructor en el balance inmune de la periodontitis (30).

IL-22

Es un miembro de la familia de la IL-10, de la cual hacen parte también IL-10, IL-19, IL-20, IL-24, IL-26, IL-28 $\alpha\beta$ e IL-29 (31). La IL-22 humana secretada es una proteína de 146 aminoácidos y tiene una homología del 80,8% con la IL-22 murina. Aunque las células Th17 son la principal fuente de IL-22, también es producida por células asesinas naturales (NK), células T CD8+, células T $\gamma\delta$, monocitos y células dendríticas CD11c+ (22). El receptor para IL-22 (IL-22R) forma parte de la familia de receptores de citoquinas tipo 2, y está formado por dos subunidades denominadas IL-22R1 e IL-10R2. Esta última se expresa ampliamente en células inmunes (linfocitos T, B y NK) a diferencia de IL-22R1, el cual está presente en una variedad de tejidos, como piel, pulmón, intestino delgado, hígado, colon, riñón y páncreas. La expresión de IL-22R1 es activada por mediadores proinflamatorios como LPS, IL-1 β y TNF- α en células epiteliales intestinales, por lo que se ha considerado un mediador crítico de la defensa mucosa del hospedero a patógenos extracelulares (31). Existe un receptor soluble denominado proteína de unión a IL-22 (IL-22BP), la cual es codificada por un gen diferente y se ha demostrado que contrarresta la unión de IL-22 *in vitro*. La afinidad de IL-22 por IL-22BP es cuatro veces mayor que la de IL-22 por IL-22R1.

Se ha demostrado que IL-22 actúa sinérgicamente y en forma aditiva, con IL-17A o IL-17F para aumentar la expresión de péptidos antimicrobianos, activa la expresión de proteínas de la fase aguda en hígado y páncreas y aumenta la síntesis de MMP-1 y MMP-3, las cuales regulan la migración celular en queratinocitos. Así mismo, participa en la respuesta mucosa a la infección por bacterias gram negativas en modelos muri-

nos de infección con *K. pneumoniae*, y la expresión de IL-22R en células epiteliales (25).

CÉLULAS Th17 EN ENFERMEDAD PERIODONTAL

La determinación de la presencia de células Th17 y sus citoquinas asociadas se ha realizado en diversas muestras provenientes de los pacientes, tales como biopsias gingivales (29,32-48), biopsias de ligamento periodontal (49), células mononucleares de sangre periférica (30,42,45,49-51), FCG (29,30,34,52-60), suero/plasma (61-64) y saliva (63-65). De igual manera, se han utilizado técnicas de laboratorio con distintos niveles de sensibilidad, que incluyen ensayos inmunoenzimáticos de captura (ELISA), reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR), PCR en tiempo real (qPCR), citometría de flujo, inmunohistoquímica para microscopía óptica y confocal, inmunoblotting y cultivos celulares estimulados con diversos antígenos, haciendo que la interpretación de los resultados se haga un poco más compleja, por lo que el análisis de los resultados publicados se hará teniendo en cuenta el método de detección, con especial énfasis en la presencia de IL-17.

Análisis de muestras *ex vivo*

Johnson et al. (32) fueron los primeros en demostrar la presencia de IL-17 en homogeneizados de tejido gingival de pacientes sanos y con PC, encontrando que los niveles por ELISA de esta citoquina eran más elevados a medida que aumentaba la profundidad sondeable, lo que sugería una participación importante de IL-17 en la progresión de la enfermedad. Posteriormente este mismo grupo, en un abordaje metodológico similar, describieron una correlación positiva entre los niveles de IL-17, IL-23, IL-6, IL-1 β y TNF- α con la pérdida de inserción clínica (CAL), y una correlación negativa con las concentraciones tisulares de IL-12 e IFN- γ , postulando que el eje IL-23/IL-17 podría ser otro tipo de respuesta inmunológica a patógenos periodontales además de la respuesta Th1/Th2, y que IL-17 podría estar involucrada en la activación de la síntesis de citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 β y TNF- α (35). También fue reportado, en homogeneizados de tejido gingival, que los niveles de IL-4 e IFN- γ eran significativamente menores en pacientes con PC moderada a severa que en individuos sanos, mientras que los niveles de IL-17 eran más altos en los pacientes con PC, implicando a la subpoblación Th17, más que a Th1/

Th2, en el efecto destructivo en dicha enfermedad (41). Estos hallazgos fueron confirmados en otros estudios (36,38,39,42,45) al evaluar, por inmunohistoquímica en muestras de tejido gingival de pacientes con PC, la presencia de IL-17 e IL-23, y su relación directa con la expresión de IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β , MMP-1, MMP-3 y RANKL y una menor expresión de IL-4 e IFN- γ . La densidad de células Th17 fue relativamente baja en los pacientes con PC (36,38,39) o con gingivitis (48), cuando se compararon con células que expresaban otras citoquinas.

Mediante la extracción de mRNA de tejido gingival, otros estudios han mostrado, en conjunto, resultados consistentes entre ellos, encontrando una mayor expresión de IL-17 e IL-21 en pacientes con periodontitis que en individuos sanos (37-40,43-47,60). Honda et al (37) reportaron una expresión diferencial entre IL-17A e IL-17F, siendo más baja esta última y estudiaron además, la expresión de los receptores de quimioquinas CCR4 y CCR6, sin encontrar diferencias significativas entre pacientes con PC y gingivitis, lo cual indicaría que no se comportan como marcadores específicos de células Th17 pues pueden estar presentes en otras poblaciones celulares como linfocitos Th2, linfocitos B y células dendríticas. Así mismo mostraron resultados contradictorios con respecto a los niveles de IL-12 e IL-23 reportados por otros (35,38,39), argumentando que IL-23 no es un factor diferenciador de Th17, sino que probablemente actúa sobre células Th17 previamente diferenciadas para inducir su expansión o estabilización. Un estudio de seguimiento de la progresión de la enfermedad en pacientes con PC, ha mostrado que las lesiones activas presentan niveles significativamente mayores de IL-17, RANKL, IL-1 β e IFN- γ comparado con lesiones inactivas o estables, siendo mayor la expresión de IFN- γ sobre la expresión de IL-17 (40). Además se demostró, en muestras de hueso alveolar, una expresión abundante de IL-17 y RANKL comparado con una baja detección de los mismos en los controles sanos (38). También se ha reportado una sobreexpresión significativa de mRNA de IL-21 en asociación con mayor expresión de IL-17, IL-1 β , IL-6 e IL-23p19 en pacientes con PC sin tratamiento, y una menor expresión de citoquinas relacionadas con células Tregs (IL-10 y TGF- β) (43); además, se encontró una correlación positiva entre IL-21 y los parámetros clínicos de profundidad sondeable y pérdida de inserción, lo cual le atribuye un papel importante a IL-21 como citoquina con función autocrina del perfil Th17 en la patogénesis de la periodontitis crónica, concepto que ya había sido postulado por el mismo grupo en homogeneizados de tejido gingival (29). De otro lado,

Takahashi et al (33) encontraron que sólo el 39% de las muestras analizadas de pacientes con PC expresaban mRNA de IL-17 en tejido gingival; además, el análisis molecular de dichas biopsias mediante RT-PCR mostró una expresión simultánea de mRNAs correspondientes a IFN- γ , IL-2, IL-10, RANKL y RANK con una baja expresión de IL-4, hallazgo que plantearon como una participación de IL-17 en la modulación de las células T hacia el fenotipo Th1, pero también postularon la posibilidad de que la vida media de los transcritos de mRNA correspondientes a IL-17 e IL-4 sea más corta por la presencia de regiones ricas en AU, lo cual podría significar que los resultados encontrados pueden no reflejar la producción real de estas citoquinas.

Estudios más recientes han considerado que la detección de IL-17A en lesiones periodontales no es un indicador preciso y específico para la presencia de células Th17 (44), por lo que se ha recurrido a la detección del factor de transcripción RORC2. Los resultados han mostrado sobreexpresión de RORC2 en conjunto con IL-17, tanto en pacientes con PC sin enfermedad sistémica asociada (44,47), como en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (46), aunque también se ha reportado que no hay diferencias en la expresión de RORC2 entre lesiones periodontales activas e inactivas (40).

Análisis de muestras mediante estimulación *in vitro*

Los análisis de expresión de citoquinas Th17 y otras relacionadas con el daño periodontal (IL-6, IL-8, RANKL y MMPs), se han realizado en sobrenadantes de cultivo de tejido gingival total (33), de linfocitos T aislados de biopsias gingivales (34), de fibroblastos gingivales provenientes de individuos sanos y con EP (33,36), de células mononucleares de sangre periférica (36,42,45) y de células madre obtenidas de ligamento periodontal (49). Estos cultivos fueron analizados en ausencia de estímulo (33) o estimulados con citoquinas (IL-17, IL-1 β , TNF- α), antígenos de bacterias periodontopatógenas, especialmente la proteína de membrana externa (OMP) y LPS de *Porphyromonas gingivalis* (42,45,66), y otros inductores como ionomicina y fitohemaglutinina (PHA) (34,49). En general, estos estudios demostraron una producción mayor de IL-17 en los cultivos celulares provenientes de pacientes con PC cuando se compararon con pacientes sanos, siendo mayor en pacientes con gingivitis que en pacientes con PC (66). El efecto estimulador de OMP sobre la producción de RANKL no fue evidente en los pacientes con EP. La es-

timulación con IL-17 recombinante aumentó la secreción de IL-6 de manera dosis y tiempo dependiente (33) y el estímulo con IL-1 β y TNF- α incrementó la síntesis de Pro-MMP-1 y MMP-3 sin ningún efecto sobre la síntesis de MMP-8 y -9. La IL-17 en este estudio mostró un efecto más discreto sobre las concentraciones de MMPs, pero indujo la producción de IL-1 β y TNF- α por macrófagos e IL-6 e IL-8 por fibroblastos gingivales (36). El estímulo de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) con LPS de *P. gingivalis* produjo una polarización de la diferenciación celular hacia la subpoblación Th17 (45), lo cual también se demostró cuando se hacía cocultivo de PBMCs con células madre aisladas de ligamento periodontal de individuos con inflamación periodontal (49).

Análisis en fluidos corporales

La detección de citoquinas Th17 en fluidos corporales incluyendo FCG, suero/plasma y saliva de pacientes con EP, ha mostrado más discrepancias con respecto a la detección en biopsias o cultivos de tejido.

La mayoría de los análisis se han realizado en FCG, mostrando diferencias importantes en los valores de la concentración de IL-17, la cual tuvo rangos entre 1,57 \pm 1,23 pg/ μ L (52) hasta 200 pg/ μ L (34,54,56,58-60), a pesar de utilizar el mismo estuche comercial de detección por ELISA en muchos de ellos; más aún, algunos autores han reportado ausencia de IL-17 (33,53) y otros no encontraron diferencias entre individuos sanos y con EP (34). Considerando el carácter multifactorial de la EP, varios grupos se ocuparon de estudiar las variaciones en la concentración de IL-17 en pacientes con EP en función del estado de fumador (52), sin encontrar diferencias entre fumadores y no fumadores, en respuesta a la terapia periodontal (30,52,53,58,59), en diferentes estadios de severidad de la enfermedad (55) con diferencias significativas entre PC moderada y severa, y en presencia o ausencia de diabetes mellitus tipo 2 (56) o con diabetes mellitus tipo 2 controlada y no controlada (54), e incluso en pacientes con síndrome de Down (57). La respuesta de IL-17 al tratamiento periodontal fue variable, pues algunos reportan disminución de los niveles de IL-17 post-tratamiento (30), aumento con el desbridamiento quirúrgico en pacientes diabéticos (59) o no hubo diferencias con el tratamiento (52,53,58).

Los estudios en suero y saliva son más escasos; los primeros han explorado las variaciones en la concentración de IL-17 en pacientes con Periodontitis Agresiva

(PA) localizada y generalizada, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con PA e individuos sanos, y entre las formas clínicas de PA (61) e incluso entre PA y periodontitis crónica (62). Sin embargo, los niveles séricos de IL-17 no mostraron diferencias en pacientes con PC en comparación con individuos sin EP (63). En saliva, tres estudios publicados reportan resultados contradictorios, pues uno de ellos reporta que la concentración salivar de IL-17 fue significativamente más baja ($p=0,009$) en pacientes con PC que en sanos (63) mientras que el otro estudio reporta ausencia de IL-17 en saliva, pero encuentra niveles importantes de IL-22 que también pertenece al perfil Th17 (65). Otro estudio adicional en mujeres con síndrome de ovario poliquístico que presentaban inflamación gingival mostró concentraciones más elevadas de IL-17A en las pacientes con inflamación gingival cuando se compararon con pacientes sanas o con el síndrome de ovario poliquístico en ausencia de inflamación gingival, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas cuando se ajustaron por edad e índice de placa; en este mismo estudio los niveles de IL-17A en FCG fueron menos claros debido a que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, lo cual se atribuyó a la carencia de sensibilidad de la prueba utilizada (64).

La detección de biomarcadores en fluidos corporales es, sin lugar a dudas, la manera más sencilla para hacer su detección y seguimiento. En EP la utilización de biomarcadores diagnósticos y pronósticos de la enfermedad todavía no se hace realidad en la práctica clínica por la complejidad que reside en la patología misma. Específicamente para IL-17, es posible postular una serie de factores que podrían explicar las discrepancias entre los diferentes trabajos, como son:

1. Sitios de muestreo de FCG con procesos inflamatorios inactivos.
2. Bajo número de pacientes (52).
3. IL-17 unida a su receptor sobre la membrana celular (IL-17R).
4. Degradación de IL-17 en el surco gingival por proteasas derivadas de las bacterias y de las células del hospedero.
5. Posible existencia de IL-17R soluble, que haga un secuestro de la citoquina (33).
6. Diferencias en los niveles de sensibilidad de detección de los estuches comerciales utilizados (53).
7. Respuesta heterogénea por variación racial entre las poblaciones estudiadas.
8. Diferencias en los volúmenes de elución del FCG que afecten la concentración de la citoquina.

Tomadas en conjunto, estas evidencias demuestran una participación importante de la IL-17 en la EP, pero no está claro su papel dominante como una citoquina protectora o destructora. Actualmente existe una tendencia a asociar entidades clínicas a alguno de estos perfiles inmunológicos, pero esto no siempre es posible debido a la complejidad desde el punto de vista bacteriano, a la naturaleza de la progresión de la enfermedad, a las variaciones inherentes a las características individuales de los pacientes afectados y al tipo de muestra utilizada para el análisis (37). Por lo tanto, la inmunopatogénesis de la EP debe ser entendida como un proceso donde confluyen varias respuestas que en conjunto dan origen a la expresión clínica de la misma. Además, se ha demostrado una enorme plasticidad en las células Th17, pues bajo el influjo de IL-12 o IL-4 pueden convertirse en células Th1 o Th2 (19), e IL-17 en particular, tiene un amplio rango de funciones inmunomoduladoras que dificulta limitar su papel como una citoquina protectora o destructora (67). Por lo tanto, es necesario realizar estudios con mayor número de pacientes que permita definir la función del perfil Th17 con respecto a la evolución clínica de la enfermedad. Por ahora es claro que IL-17 hace parte del conjunto de moléculas que se activan en respuesta a la colonización por periodontopatógenos, y sería muy simplista restringir la inmunopatogénesis a un perfil de moléculas determinado cuando confluyen múltiples factores en la presentación clínica de la enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI) de la Universidad de Antioquia (Código 8700-1039).

BIBLIOGRAFÍA

1. Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res* 2010;89:1349-63.
2. Silveira FT, Lainson R, Corbett CE. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004;99:239-51.
3. Armitage GC. Classifying periodontal diseases - a long-standing dilemma. *Periodontol* 2000. 2002;30:9-23.
4. Tietze K, Dalpke A, Morath S, Mutters R, Heeg K, Nonnenmacher C. Differences in innate immune responses upon stimulation with gram-positive and gram-negative bacteria. *J Periodont Res* 2006;41:447-54.
5. Costerton W, Veeh R, Shirliff M, Pasmore M, Post C, Ehrlich G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* 2003;112:1466-77.
6. Belibasakis GM, Guggenheim B, Bostanci N. Down-regulation of NLRP3 inflammasome in gingival fibroblasts by subgingival biofilms: involvement of *Porphyromonas gingivalis*. *Innate Immun* 2013; 19:3-9.
7. Botero JE. Respuesta inmune en las enfermedades del periodonto: desde salud hasta enfermedad y sus implicaciones terapéuticas. *Rev Fac Odontol Univ Antioq* 2009;21:122-8.
8. Janeway Jr. CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216.
9. Jin L, Darveau RP. Soluble CD14 levels in gingival crevicular fluid of subjects with untreated adult periodontitis. *J Periodontol* 2001;72:634-40.
10. Wang PL, Ohura K. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide signaling in gingival fibroblasts-CD14 and Toll-like receptors. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13:132-42.
11. Hatakeyama J, Tamai R, Sugiyama A, Akashi S, Sugawara S, Takada S. Contrasting responses of human and periodontal ligament fibroblasts to bacterial cell-surface components through the CD14/Toll-like receptor system. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:14-23.
12. Ohlrich EJ, Cullinan MP, Seymour GJ. The immunopathogenesis of periodontal disease. *Aust Dent J* 2009; 54:S2-S10.
13. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998; 9:248-66.
14. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348-57.
15. Gaffen SL, Hajishengallis G. A new inflammatory cytokine on the block: re-thinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17. *J Dent Res* 2008;87:817-28.
16. Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ. Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13: 17-34.
17. Seymour GJ, Gemmell E, Reinhardt RA, Eastcott J, Taubman MA. Immunopathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: cellular and molecular mechanisms. *J Periodont Res* 1993;28:478-86.
18. Ebersole JL, Taubman MA. The protective nature of host responses in periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1994;5:112-41.

19. Bluestone JA, Mackay CR, O'Shea JJ, Stockinger B. The functional plasticity of T cell subsets. *Nat Rev Immunol* 2009;9:811-6.
20. Rutz S, Ouyang W. Regulation of interleukin-10 and interleukin-22 expression in T helper cells. *Curr Opin Immunol* 2011;23:605-12.
21. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005;6:1123-32.
22. Dubin PJ, Kolls JK. Th17 cytokines and mucosal immunity. *Immunol Rev* 2008;226:160-71.
23. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 2009;361:888-98.
24. Kolls JK, Khader SA. The role of Th17 cytokines in primary mucosal immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010;21:443-8.
25. Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA, et al. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* 2008;14:275-81.
26. Yu JJ, Ruddy MJ, Conti HR, Boonananantanasarn K, Gaffen SL. The interleukin-17 receptor plays a gender-dependent role in host protection against *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontal bone loss. *Infect Immun* 2008;76:4206-13.
27. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* 2006;203:2673-82.
28. Yi JS, Cox MA, Zajac AJ. Interleukin-21: a multifunctional regulator of immunity to infections. *Microbes and infection* 2010;12:1111-9.
29. Dutzan N, Rivas C, García-Sesnich J, Henríquez L, Rivera O, Dezerega A, et al. Levels of interleukin-21 in untreated chronic periodontitis patients. *J Periodontol* 2011;82:1483-9.
30. Zhao L, Zhou Y, Xu Y, Sun Y, Li L, Chen W. Effect of non-surgical periodontal therapy on the levels of Th17/Th1/Th2 cytokines and their transcription factors in Chinese chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2011;38:50-16.
31. Aujla SJ, Kolls JK. IL-22: a critical mediator in mucosal host defense. *J Mol Med* 2009;87:451-4.
32. Johnson RB, Wood N, Serio FG. Interleukin-11 and IL-17 and the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol* 2004;75:37-43.
33. Takahashi K, Azuma T, Motohira H, Kinane DF, Kitetsu S. The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2005;32:369-74.
34. Vernal R, Dutzan N, Chaparro A, Puente J, Valenzuela MA, Gamonal J. Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005;32:383-9.
35. Lester SR, Bain JL, Johnson RB, Serio FG. Gingival concentrations of interleukin-23 and -17 at healthy sites and at sites of clinical attachment loss. *J Periodontol* 2007;78:1545-50.
36. Beklen A, Ainola M, Hukkanen M, Gürkan C, Sorsa T, Kontinen YT. MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. *J Dent Res* 2007;86:347-51.
37. Honda T, Aoki Y, Takahashi N, Maekawa T, Nakajima T, Ito H, et al. Elevated expression of IL-17 and IL-12 genes in chronic inflammatory periodontal disease. *Clin Chim Acta* 2008;395:137-41.
38. Cardoso CR, Garlet GP, Crippa GE, Rosa AL, Júnior WM, Rossi MA, et al. Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 2009;24:1-6.
39. Ohshima H, Kato-Kogoe N, Kuhara A, Nishimura F, Nakasho K, Yamanegi K, et al. The involvement of IL-23 and the Th17 pathway in periodontitis. *J Dent Res* 2009;88:633-8.
40. Dutzan N, Gamonal J, Silva A, Sanz M, Vernal R. Overexpression of forkhead box P3 and its association with receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, interleukin (IL)-17, IL-10 and transforming growth factor- β during the progression of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2009;36:396-403.
41. Behfarnia P, Birang R, Andalib AR, Asadi S. Comparative evaluation of IFN- γ , IL4 and IL17 cytokines in healthy gingiva and moderate to advanced chronic periodontitis. *Dent Res J* 2010; 7:45-50.
42. Allam JP, Duan Y, Heinemann F, Winter J, Götz W, Deschner J, et al. IL-23 producing CD68+ macrophage-like cells predominate within a IL-17 polarized infiltrate in chronic periodontitis lesions. *J Clin Periodontol* 2011;38:879-86.
43. Dutzan N, Vernal R, Vaque JP, García-Sesnich J, Hernández M, Abusleme L, et al. Interleukin-21 expression and its association with proinflammatory cytokines in untreated chronic periodontitis patients. *J Periodontol* 2012;83:948-54.
44. Adibrad M, Deyhimi P, Ganjalikhani Hakemi M, Behfarnia P, Shahabuei M, Rafiee L. Signs of the presence of Th17 cells in chronic periodontal disease. *J Periodont Res* 2012;47:525-31.
45. Moutsopoulos N, Kling HM, Angelov N, Jin W, Palmer RJ, Nares S, et al. *Porphyromonas gingivalis* promotes Th17 inducing pathways in chronic periodontitis. *J Autoimmun* 2012;39:294-303.
46. Duarte PM, Miranda TS, Lima JA, Dias Gonçalves TE, Santos VR, Bastos MF, et al. Expression of immune-inflammatory markers in sites of chronic periodontitis

- in patients with Type 2 diabetes. *J Periodontol* 2012;83:426-34.
47. Behfarnia P, Birang R, Pishva SS, Hakemi MG, Khorasani MM. Expression levels of Th-2 and Th-17 characteristic genes in healthy tissue versus periodontitis. *J Dent (Tehran)* 2013;10:23-31.
 48. Parachuru VPB, Coates DE, Milne TJ, Hussaini HM, Rich AM, Seymour GJ. Forkhead box P3-positive regulatory T-cells and interleukin 17-positive T-helper 17 cells in chronic inflammatory periodontal disease. *J Periodont Res* 2014;49:817-26.
 49. Liu D, Xu J, Liu O, Fan Z, Liu Y, Wang F, et al. Mesenchymal stem cells derived from inflamed periodontal ligaments exhibit impaired immunomodulation. *J Clin Periodontol* 2012;39:1174-82.
 50. Borch TS, Lobner M, Bendtzen K, Holmstrup P, Nielsen CH. Decreased interleukin-2 responses to *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis* in generalized aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2009;80:800-7.
 51. Saraiva AM, Alves e Silva MR, Correia Silva J de F, da Costa JE, Gollob KJ, Dutra WO, et al. Evaluation of IL17A expression and of IL17A, IL17F and IL23R gene polymorphisms in Brazilian individuals with periodontitis. *Hum Immunol* 2013;74:207-14.
 52. Buduneli N, Buduneli E, Kütükçüler N. Interleukin-17, RANKL, and osteoprotegerin levels in gingival crevicular fluid from smoking and non-smoking patients with chronic periodontitis during initial periodontal treatment. *J Periodontol* 2009;80:1274-80.
 53. Pradeep AR, Hadge P, Chowdhry S, Patel S, Happy D. Exploring the role of Th1 cytokines: interleukin-17 and interleukin-18 in periodontal health and disease. *J Oral Sci* 2009;51:261-6.
 54. Santos VR, Ribeiro FV, Lima JA, Napimoga MH, Bastos MF, Duarte PM. Cytokine levels in sites of chronic periodontitis of poorly controlled and well-controlled type 2 diabetic subjects. *J Clin Periodontol* 2010;37:1049-58.
 55. Szkaradkiewicz AK, Karpinski TM, Zeidler A, Wyganowska-Swiatkowska M, Szkaradkiewicz A. Protective effect of oral Lactobacilli in pathogenesis of chronic periodontitis. *J PhysiolPharmacol* 2011;62:685-9.
 56. Ribeiro FV, Cutrim de Mendonça A, Santos VR, Bastos MF, Figueiredo LC, Duarte PM. Cytokines and bone-related factors in systemically healthy patients with chronic periodontitis and patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis. *J Periodontol* 2011;82:1187-96.
 57. Tsilingaridis G, Yucel-Lindberg T, Modéer T. T-helper related cytokines in gingival crevicular fluid from adolescents with Down syndrome. *Clin Oral Investig* 2012;16:267-73.
 58. Santos VR, Ribeiro FV, Lima JA, Miranda TS, Feres M, Bastos MF, et al. Partial-and full-mouth scaling and root planing in type 2 diabetic subjects: a 12-mo follow-up of clinical parameters and levels of cytokines and osteoclastogenesis-related factors. *J Periodont Res* 2012;47:45-54.
 59. Mendonça AC, Santos VR, Ribeiro FV, Lima JA, Miranda TS, Feres M, et al. Surgical and non-surgical therapy with systemic antimicrobials for residual pockets in type 2 diabetics with chronic periodontitis: a pilot study. *J Clin Periodontol* 2012; 39:368-76.
 60. Mitani A, Niedbala W, Fujimura T, Mogi M, Miyamae S, Higuchi N, et al. Increased expression of interleukin-35 and -17, but not -27, in gingival tissues with chronic periodontitis. *J Periodontol* 2015;86:301-9.
 61. Schenkein HA, Koertge TE, Brooks CN, Sabatini R, Purkall DE, Tew JG. IL-17 in sera from patients with aggressive periodontitis. *J Dent Res* 2010;89:943-7.
 62. Duarte PM, da Rocha M, Sampaio E, Mestnik MJ, Feres M, Figueiredo LC, et al. Serum levels of cytokines in subjects with generalized chronic and aggressive periodontitis before and after non-surgical periodontal therapy: a pilot study. *J Periodontol* 2010;81:1056-63.
 63. Özçaka Ö, Nalbantsoy A, Buduneli N. Interleukin-17 and interleukin-18 levels insalivaand plasma of patients with chronic periodontitis. *J Periodont Res* 2011;46:592-8.
 64. Özçaka O, Buduneli N, Ceyhan BO, Akcali A, Hannah V, Nile C, et al. Is interleukin-17 involved in the interaction between polycystic ovary syndrome and gingival inflammation? *J Periodontol* 2013;84:1827-37.
 65. Isaza-Guzmán DM, Cardona-Vélez N, Gaviria-Correa DE, Martínez-Pabón MC, Castaño-Granada MC, Tobón-Arroyave SI. Association study between salivary levels of interferon (IFN)-gamma, interleukin (IL)-17, IL-21, and IL-22 with chronic periodontitis. *Arch Oral Biol* 2015;60:91-9.
 66. Oda T, Yoshie H, Yamazaki K. *Porphyromonas gingivalis* antigen preferentially stimulates T cells to express IL-17 but not receptor activator of NF-kappa-B ligand in vitro. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:30-6.
 67. Cheng WC, Hughes FJ, Taams LS. The presence, function and regulation of IL-17 and Th17 cells in periodontitis. *J Clin Periodontol* 2014;41:541-9.

CORRESPONDENCIA

Diana María Isaza-Guzmán
 Laboratorio de Inmunodetección y Bioanálisis
 Facultad de Odontología. Universidad de Antioquia
 Calle 70 No. 52-21, Medellín
 Colombia
 Correo electrónico: dianamariaisaza@yahoo.com