



Niveles de interleucina 23 (IL-23) en saliva de niños con dentición mixta temprana: estudio piloto

Paulina Noyola Sánchez,* Celia Guerrero Velázquez,† Rita Stephanie Hernández Troncoso,* Karla Elizabeth Malespin García,* José María Chávez Maciel,* Ruth Rodríguez Montañón†

* Especialidad en Odontopediatría.
† Instituto de Investigación en Odontología.

Departamento de Clínicas Odontológicas Integrales. Centro Universitario de Ciencias de la Salud. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jal. México.

RESUMEN

Introducción: En la fase de dentición mixta existe un control entre la erupción y reabsorción dental mediante la osteoclastogénesis y la osteogénesis. Estos procesos están regulados por el eje IL-23/IL-17 y el sistema RANK/RANKL/OPG. Se conoce que la IL-23 tiene un papel crucial en la producción de IL-17 y RANKL entre otras citocinas. La IL-17 activa diferentes células inmunes y no inmunes como los fibroblastos y éstos a su vez pueden secretar RANKL. Esto indica que la IL-23 de forma directa e indirecta estimula la producción de RANK, el cual da paso a la activación de los osteoclastos. **Objetivo:** Evaluar los niveles de IL-23 en saliva de niños en fase de dentición mixta con clase molar I y II. **Material y métodos:** Se obtuvo muestra de saliva y se almacenó a -80 °C hasta la determinación de IL-23 mediante ELISA. **Resultados:** Las concentraciones de IL-23 en saliva no mostraron diferencia significativa entre los niños con dentición clase molar I y II. **Conclusión:** Hasta el momento estos hallazgos indican que la regulación de la IL-23 en este proceso fisiológico no difiere de acuerdo al tipo de oclusión molar.

Palabras clave: Interleucina 23, dentición mixta temprana, saliva.

INTRODUCCIÓN

La erupción dental es el proceso mediante el cual los dientes en desarrollo emergen a la cavidad oral. Este proceso se inicia tan pronto como concluye la formación de la corona y raíz de los dientes deciduos,

seguido del proceso de recambio dental, donde los dientes deciduos se caen mientras emergen los dientes permanentes. Esta fase de transición se conoce como dentición, en la cual están presentes dientes deciduos y permanentes y se clasifica en dentición mixta temprana y dentición mixta tardía.¹

Una vez que los dientes erupcionan se establece la oclusión dental (relación de cúspides entre los primeros molares superiores e inferiores y se clasifica en tres tipos: clase molar I, clase molar II y clase molar III, siendo las más prevalentes la clase molar I y II.²

En la fase de dentición mixta existe un control entre la erupción y reabsorción dental mediante la osteoclastogénesis y la osteogénesis. Estos dos procesos fisiológicos dependen de la regulación de diversas citocinas, principalmente del eje IL-23/IL-17 y el sistema RANK/RANKL/OPG que promueve la diferenciación de los osteoclastos, mientras que el IFN- α , IFN- β , IL-3, IL-4, IL-10 desregulan la diferenciación de los osteoclastos.³

El receptor activador del factor nuclear kappa B (RANK) es una proteína transmembrana tipo I expresada ubicuamente en musculo-esquelético, timo, hígado, colon, intestino delgado, glándula suprarrenal, osteoclastos, células epiteliales de la glándula mamaria, próstata y páncreas.⁴ Por otra parte, el gen del ligando para RANK (RANKL) da lugar a variantes de empalme que codifican dos formas de proteínas transmembranas tipo II y una forma de proteína secretada.⁵ Aunque la expresión RANKL alta se puede encontrar en ganglios linfáticos, timo y pulmón, sólo se pueden detectar niveles bajos de RANKL en bazo, médula ósea, sangre periférica, leucocitos, corazón, placenta, musculo-esquelético, estómago o tiroides. La unión de RANKL a su receptor RANK proporciona la señal

Recibido: Diciembre 2020. Aceptado: Abril 2021.

Citar como: Noyola SP, Guerrero VC, Hernández TRS, Malespin GKE, Chávez MJM, Rodríguez MR. Niveles de interleucina 23 (IL-23) en saliva de niños con dentición mixta temprana: estudio piloto. Rev Mex Ortodon. 2020; 8 (3): 169-177.

© 2020 Universidad Nacional Autónoma de México, [Facultad de Odontología]. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

crucial para impulsar el desarrollo de los osteoclastos a partir de células progenitoras hematopoyéticas así como para activar osteoclastos maduros. OPG regula negativamente la unión de RANKL a RANK y por lo tanto, inhibe la rotación ósea por osteoclastos. A medida que se observa un aumento de la actividad osteoclástica en pacientes con osteoporosis, metástasis o artritis reumatoide, el eje RANK-RANKL-OPG parece ser la diana terapéutica para distintas enfermedades óseas,⁴ contrariamente la osteoprotegerina (OPG), que es un receptor de señal para RANKL, puede regular la osteoclastogénesis al inhibir a RANKL.^{6,7}

La IL-23 es una citocina heterodimérica compuesta por dos subunidades enlazadas por un puente de disulfuro: Una subunidad soluble p40 y una subunidad de haz tetra-helical p19.^{8,9} El receptor a IL-23 está formado por una subunidad llamada IL-23R que forma un complejo con la subunidad beta 1 del receptor a IL-12 (IL-12R β 1). La señalización mediante IL-23R induce la fosforilación de janus cinasa 2 (JAK2) y tirosina cinasa 2 (tyk2), la cual activa STAT3, permitiendo la sobrerregulación de ROR γ T y subsecuentemente incrementa la expresión de citocinas proinflamatorias. La IL-23 tiene un papel crucial en la inducción y función de células Th17.¹⁰⁻¹² Además, la unión de IL-23 a su receptor en células Th17 activa a ROR γ T+, que induce la sobreexpresión del IL-23R, de esta manera provee una retroalimentación positiva para el mantenimiento y propagación de estas células.¹²

Asimismo, la IL-23 induce la producción de IL-17 y RANKL, entre otras citosinas.^{5,12} La IL-17 forma parte de una familia de seis isoformas nombradas de la «A» a la «F», de las cuales la isoforma A y la F pueden formar dímeros. La IL-17 puede activar diferentes células inmunes y no inmunes como los fibroblastos y éstos a su vez pueden secretar RANKL.^{5,13} Esto indica que la IL-23 de forma directa e indirecta estimula la producción de RANKL.

Por otra parte, se conoce que la fuerza de oclusión varía de acuerdo a la relación dental entre el maxilar y la mandíbula.¹⁴ En este sentido, se ha observado en ratas un aumento en la expresión de RANKL en dientes con trauma oclusal que sin trauma oclusal.¹⁵ Asimismo, anteriormente evaluamos las concentraciones de RANKL en dientes permanentes y deciduos en niños con dentición mixta sin detectar diferencias significativas entre los dos grupos de denticiones, por lo cual se considera que el RANKL se mantiene constante durante el proceso de recambio dental.¹⁶

Debido a que la IL-23 y la IL-17 estimulan la producción de RANKL y esta molécula participa en la remodelación ósea y el proceso de erupción dental, el objetivo de este estudio fue evaluar inicialmente los

niveles de IL-23 en saliva de niños en la fase de dentición mixta y a su vez conocer si existe variación cuando se presenta clase molar I o II.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio transversal realizado en la Clínica de Odontopediatría de la Universidad de Guadalajara. A todos los padres o tutores de los niños atendidos en esta clínica se les invitó a participar. El objetivo del estudio y el procedimiento para la obtención de la muestra se explicó a los padres o tutores. A todos los padres o tutores que aceptaron que los niños participaran en el estudio, se les proporcionó consentimiento informado por escrito de acuerdo al tratado de Helsinki 2013.

Se incluyeron del estudio niños y niñas con rango de edad de cinco a ocho años con dentición mixta temprana, primeros molares inferiores y superiores erupcionados. El tipo de oclusión se evaluó de acuerdo a la clasificación de Angle² y se dividieron en dos grupos: clase molar I o II. No se incluyeron pacientes que presentaran caries, traumatismo dental, enfermedad periodontal, amelogénesis o dentinogénesis imperfecta, enfermedades sistémicas, presencia de síndromes, hábitos orales o haber recibido tratamiento ortopédico u ortodóncico o que hayan tomado medicamentos antiinflamatorios.

Obtención de saliva

Se solicitó al paciente salivar dentro de un contenedor estéril de 100 mL por aproximadamente uno a dos minutos. Después se agregaron 20 μ L de Buffer fosfato salino (PBS) con inhibidor de proteasas (Complete, Roche Diagnostic GmbH). Posteriormente los tubos se agitaron en el vórtex durante cinco segundos. Se centrifugaron a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Se tomó 1 mL de sobrenadante de saliva en microtubos de 1.5 mL y se almacenó a -80 °C hasta la realización del ELISA para IL-23.

Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Se añadieron 100 μ L de saliva por triplicado a los pozos de las placas de 96 pozos del kit para IL-23R DuoSet[®] ELISA Kit (R&D Systems Minneapolis MN, EUA) y se realizó ELISA de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La densidad óptica de cada pocillo se determinó usando el lector de microplacas WHY101 (Poweam Medical Systems Co., Nanjing, Jiangsu, China) ajustado a 450 nm con una corrección de longitud de onda a 540 nm. Las concentraciones

de la IL-23 de cada muestra se calcularon a partir de la curva estándar según el kit de ensayo y las concentraciones se expresaron como pg/mL.

Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico con el programa SPSS v.25. Se evaluó la normalidad de los datos con la prueba de Shapiro-Wilk debido al tamaño de la muestra, ya que los datos mostraron un comportamiento no normal, se realizó la prueba de *U* de Mann-Whitney para identificar diferencias entre las concentraciones de IL-23 y las variables de edad, peso, talla e índice de masa corporal (IMC) entre la clase molar I y II. Para evaluar diferencias entre el sexo femenino y masculino se realizó una prueba de χ^2 . Por último, para las correlaciones entre los niveles de IL-23 y las variables evaluadas se realizó una correlación de Spearman. Una $p \leq 0.05$ se consideró como significativa.

RESULTADOS

Datos sociodemográficos

Se incluyeron 19 pacientes con clase molar I y 10 pacientes con clase molar II con dentición mixta temprana y rango de edad de siete a ocho años. Se observó una tendencia en presentar sobrepeso en los pacientes con clase molar II; sin embargo, ninguno niño presentó enfermedades sistémicas o enfermedades en la cavidad oral (Tabla 1).

Niveles de IL-23 en saliva de niños con dentición mixta clase molar I y II

No se observó diferencia significativa en los niveles de IL-23 en saliva del grupo con clase molar I (59.76

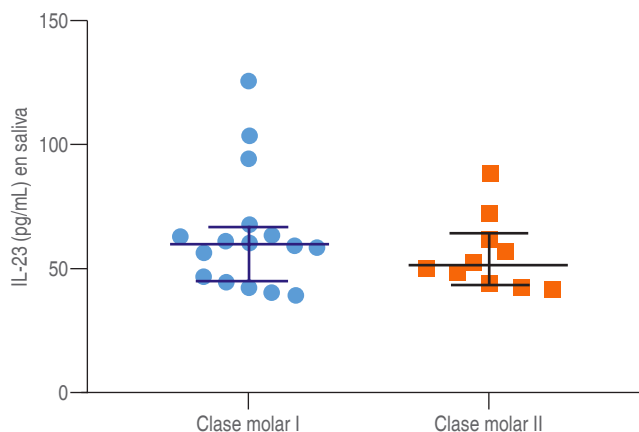


Figura 1: Niveles de IL-23 en clase molar I y II. Los datos están presentados como mediana y rango intercuartil. Se tomó un valor de $p \geq 0.05$ como significativa.

IL-23 levels in class I and II molar occlusion. Data are presented as median and interquartile range. A value of $p \geq 0.05$ was taken as significant.

± 21.66) pg/mL y clase molar II (51.03 \pm 20.91) pg/mL (Figura 1). Sin embargo, los pacientes con clase molar I mostraron una tendencia a tener niveles más elevados de IL-23 en saliva que los pacientes con clase molar II.

Correlaciones

Se realizó un análisis de correlación de Spearman y no se encontró ningún tipo de correlación de la IL-23 con las variables de edad, peso, talla e IMC. Sin embargo, se observó una correlación significativamente positiva entre la edad y el peso, la edad y la talla, así como entre el peso y la talla. Por otra parte, apreciamos una correlación significativamente negativa entre la talla y el IMC (Tabla 2).

DISCUSIÓN

Durante la fase de erupción dental mixta se puede conocer el tipo de oclusión que se establece una vez que el primer molar inferior contacta con el primer molar superior. El sistema estomatognático de los individuos con clase I presenta características de bases esqueléticas equilibradas y sus funciones se realizan con normalidad. Sin embargo, en los individuos con clase molar II y III existe un desequilibrio estructural que predispone a que algunas funciones se presenten modificadas.¹⁷ Además, se ha observado una relación de malnutrición en sujetos que presentan maloclusiones.¹⁸

Tabla 1: Datos sociodemográficos y parámetros clínicos. *Sociodemographic data and clinical parameters.*

| | Clase molar I (N =19) | Clase molar II (N = 10) | p |
|--|--------------------------|----------------------------|-------|
| Edad (años) | 7.2 \pm 0.6 | 7.7 \pm 1.3 | 0.363 |
| Sexo (femenino/masculino) | 10/9 | 6/4 | 0.899 |
| Peso (kg) | 26.2 \pm 4.1 | 28 \pm 3.7 | 0.087 |
| Talla (m) | 1.2 \pm 0.1 | 1.2 \pm 1.1 | 0.484 |
| Índice de masa corporal (kg/m ²) | 19.2 \pm 1.9 | 28 \pm 3.7 | 0.391 |

Los datos están mostrados en medias y desviación estándar. La variable sexo se muestra en el tamaño de la población por grupo. Se tomó un valor de $p \geq 0.05$ como significativa.

Tabla 2: Correlaciones.
Correlations.

| | | IL-23 | Edad | Peso (kg) | Talla (m) | Índice de masa corporal |
|-------------------------|---|-------|--------|--------------------|--------------------|-------------------------|
| IL-23 | r | 1.000 | -0.320 | -0.174 | -0.170 | -0.099 |
| | p | | 0.111 | 0.395 | 0.406 | 0.655 |
| Edad | r | | 1.000 | 0.589 [‡] | 0.682 [‡] | -0.179 |
| | p | | | 0.002 | 0.000 | 0.383 |
| Peso (kg) | r | | | 1.000 | 0.732 [‡] | 0.193 |
| | p | | | | 0.000 | 0.346 |
| Talla (m) | r | | | | 1.000 | -0.466 [*] |
| | p | | | | | 0.016 |
| Índice de masa corporal | r | | | | | 1.000 |
| | p | | | | | |

Correlación de Spearman, * $p \geq 0.05$, [‡] $p \geq 0.01$.

Por otra parte, se conoce que cuando hay movimientos de masticación se ejerce una fuerza que varía de acuerdo al tipo de oclusión y relación dental.¹⁴ En este sentido, se ha observado en ratas un aumento en la expresión de RANKL en dientes con trauma oclusal que sin trauma oclusal,¹⁵ aunque en dientes permanentes y deciduos en niños con dentición mixta no se detectaron diferencias significativas entre los dos grupos de dientes, por lo cual se considera que el RANKL se mantiene constante durante el proceso de recambio dental.¹⁶

También se conoce que la fuerza que ejerce la oclusión dental es distinta a la que se ejerce por tratamiento ortodóncico. En este sentido, se ha evaluado la IL-23 e IL-17 en el líquido crevicular gingival de pacientes con tratamiento ortodóncico y se observó un aumento de estas citocinas a las 24 horas de haberse aplicado la fuerza ortodóncica en comparación con los niveles basales.¹⁹

Cabe señalar que la IL-23 es una citocina proinflamatoria que participa en la activación y maduración de las células Th17. Esta citocina ha sido estudiada en distintas patologías, principalmente en las que involucran alguna afección ósea como la periodontitis, artritis reumatoide, síndrome de Sjogren, entre otras.²⁰⁻²³ Sin embargo, no se ha evaluado la IL-23 en procesos fisiológicos de desarrollo como el proceso de la erupción dental.

Partiendo de este estudio, se decidió evaluar la IL-23 en saliva en la fase de dentición mixta de niños que presentan clase molar I o II, debido a que en la fase de dentición mixta ésta activa la osteoclastogénesis y

la osteogénesis, y además estos procesos están regulados principalmente por RANKL, que es estimulado por la IL-23 y su receptor (IL-23R).²⁴

Los resultados de este estudio mostraron concentraciones similares de IL-23 entre la clase molar I y II con una tendencia a elevarse en los pacientes con clase molar I. Hasta el momento, los hallazgos de este estudio piloto indican que la regulación molecular de IL-23 a nivel sistémico en este proceso fisiológico no difiere de la disposición dental que se presenta en cada fase de la erupción dental. Por otra parte, la muestra biológica de saliva proporciona información sólo de forma sistémica; sin embargo, el líquido crevicular gingival (LCG) podría brindar mayor información de este comportamiento a nivel localizado y sistémico. Por lo que consideramos evaluar posteriormente la IL-23 en muestras de líquido (LCG), ya que es una muestra biológica que se ha utilizado para la evaluación de distintas citocinas como IL-23, IL-17, TNF- α , IL-8, IL-6, IL-2, IL-4, IL-10, RANTES, IL-1, IL-5, RANKL, entre otras. Además, la evaluación de citocinas en LCG proporciona información de la zona donde se lleva a cabo el proceso de erupción dental. Cabe mencionar que la IL-23 se ha evaluado en LCG de pacientes con periodontitis, diabetes mellitus, artritis reumatoide, entre otras patologías, así como en prueba de materiales dentales como los implantes;²⁵⁻²⁹ sin embargo, no se ha evaluado esta citocina durante el proceso fisiológico de la erupción dental. Cabe señalar que se considera aumentar el tamaño de la muestra para obtener resultados contundentes de la IL-23 en el proceso de dentición mixta.

Respecto a las correlaciones, esperábamos encontrar algún tipo de correlación de la IL-23 con los grupos de clase molar I y II. Sin embargo, no se detectó ningún tipo de correlación, lo que indica que este comportamiento puede deberse a que no se detectaron diferencias significativas entre los dos grupos de estudio. Nuevamente consideramos que se debe primero aumentar el tamaño de la muestra del estudio en muestras de saliva y además realizar también la evaluación de la IL-23 en el LCG y después analizar las correlaciones de esta citocina con respecto a la clase molar.

Sin embargo, el estudio permitió observar correlaciones positivas entre la edad y el peso, la edad con la talla así como del peso con la talla, lo que indica que estas variables aumentan de forma directamente proporcional. Debido a que es indispensable medir la talla, el peso y la edad para obtener el IMC, se esperaba obtener correlaciones positivas entre la talla y el peso con el IMC. Sin embargo, se encontró una correlación negativa entre la talla y el IMC, la cual indica que cuando una variable aumenta la otra disminuye.

Cabe la posibilidad de que la falta de correlaciones positivas con el IMC se deba a la tendencia de sobrepeso observada principalmente en el grupo de niños con clase molar II. Esto es interesante de estudiar, si el normopeso, sobrepeso u obesidad de los niños influye en la maloclusión dental.

Asimismo, se pretende evaluar las concentraciones de IL-23, IL-17 y RANKL en la fase de erupción decidua, mixta temprana, mixta tardía y en dentición permanente. De esta forma podremos conocer cómo fluctúan estas moléculas durante todo el proceso de erupción dental.

CONCLUSIÓN

Se observó una tendencia de niveles elevados de IL-23 en los pacientes con clase molar I sin diferencia significativa. Hasta el momento, este estudio piloto indica que la regulación molecular de IL-23 en este proceso fisiológico no difiere de la disposición dental que se presenta en cada fase de la erupción dental.

Original research

Interleukin 23 (IL-23) levels in saliva of children with early mixed dentition: a pilot study

Paulina Noyola Sánchez,*
Celia Guerrero Velázquez,‡
Rita Stephanie Hernández Troncoso,*
Karla Elizabeth Malespin García,*
José María Chávez Maciel,* Ruth Rodríguez Montaña‡

* Especialidad en Odontopediatría.

‡ Instituto de Investigación en Odontología.

Departamento de Clínicas Odontológicas Integrales.
Centro Universitario de Ciencias de la Salud. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jal. México.

ABSTRACT

Introduction: In the mixed dentition phase, there is a control between the rash and dental reabsorption, using osteoclastogenesis and osteogenesis. These processes are regulated by the IL-23/IL-17 axis and the RANK/RANKL/OPG system. IL-23 is known to play a crucial role in the production of IL-17 and RANKL among other cytokines. IL-17 activates different immune and non-immune cells such as fibroblasts and these can secrete RANKL. This indicates that IL-23, directly and indirectly, stimulates the production of RANKL which gives way to the activation of osteoclasts.

Objective: To evaluate IL-23 saliva levels in children in the mixed dentition phase with molar class I and II. **Material and methods:** Saliva sample was obtained and stored at -80 °C until IL-23 was determined by ELISA. **Results:** IL-23 concentrations in saliva

showed no significant difference between children with molar class I and II dentition. **Conclusion:** So far, these findings indicate that the regulation of IL-23 in this physiological process does not differ according to the type of molar occlusion.

Keywords: Interleukin 23, early mixed dentition, saliva.

INTRODUCTION

Tooth eruption is the process by which developing teeth emerge into the oral cavity. This process begins as soon as the formation of the crown and root of the deciduous teeth is completed, followed by the process of tooth replacement, where the deciduous teeth fall out while the permanent teeth emerge. This transitional phase is known as dentition, in which deciduous and permanent teeth are present and is classified into early mixed dentition and late mixed dentition.¹

Once the teeth erupt, dental occlusion (cusp relationship between the upper and lower first molars) is established and is classified into three types: molar class I, molar class II, and molar class III, with molar class I and II being the most prevalent.²

In the mixed dentition phase, there is a control between dental eruption and resorption, through osteoclastogenesis and osteogenesis. These two physiological processes depend on the regulation of various cytokines, mainly the IL-23/IL-17 axis and the RANK/RANKL/OPG system that promote osteoclast differentiation while IFN- α , IFN- β , IL-3, IL-4, IL-10 deregulate osteoclast differentiation.³

Receptor activating receptor nuclear factor kappa B (RANK) is a type I transmembrane protein ubiquitously expressed in skeletal muscle, thymus, liver, colon, small intestine, adrenal gland, osteoclasts, mammary gland epithelial cells, prostate, and pancreas.⁴ Moreover, the ligand gene for RANK (RANKL) gives rise to splice variants encoding two forms of type II transmembrane proteins and one form of the secreted protein.⁵ Although high RANKL expression can be found in lymph nodes, thymus, and lungs, only low levels of RANKL can be detected in the spleen, bone marrow, peripheral blood, leukocytes, heart, placenta, skeletal muscle, stomach, or thyroid. The binding of RANKL to its receptor RANK provides the crucial signal to drive osteoclast development from hematopoietic progenitor cells, as well as to activate mature osteoclasts. OPG negatively regulates RANKL binding to RANK and thereby inhibits bone turnover by osteoclasts. As increased osteoclastic activity is observed in patients with osteoporosis, metastasis, or rheumatoid arthritis, the RANK-RANKL-OPG axis appears to be the therapeutic target for various bone

diseases,⁴ conversely, osteoprotegerin (OPG), which is a signaling receptor for RANKL, can regulate osteoclastogenesis by inhibiting RANKL.^{6,7}

IL-23 is a heterodimeric cytokine composed of two subunits linked by a disulfide bridge: a soluble p40 subunit and a tetra-helical bundle subunit p19.^{8,9} The receptor to IL-23 consists of a subunit called IL-23R that forms a complex with the beta 1 subunit of the receptor to IL-12 (IL-12R β 1). Signaling by IL-23R induces phosphorylation of Janus Kinase 2 (JAK2) and tyrosine kinase 2 (tyk2), which activates STAT3, allowing upregulation of ROR γ T and subsequently increases the expression of proinflammatory cytokines. IL-23 plays a crucial role in the induction and function of Th17 cells.¹⁰⁻¹² Moreover, the binding of IL-23 to its receptor on Th17 cells activates ROR γ T+ which induces overexpression of IL-23R, thus providing positive feedback for the maintenance and propagation of these cells.¹²

Likewise, IL-23 induces the production of IL-17 and RANKL among other cytokines.^{5,12} IL-17 is part of a family of 6 isoforms named «A» to «F» of which isoform A and F can form dimers. IL-17 can activate different immune and non-immune cells such as fibroblasts and these, in turn, can secrete RANKL.^{5,13} This indicates that IL-23, directly and indirectly, stimulates RANKL production.

On the other hand, it is known that occlusal force varies according to the dental relationship between the maxilla and mandible.¹⁴ In this sense, an increase in RANKL expression has been observed in rats in teeth with occlusal trauma than without occlusal trauma.¹⁵ Likewise, we have previously evaluated RANKL concentrations in permanent and deciduous teeth in children with mixed dentition, and no significant differences were observed between the two groups of dentitions, which is why it is considered that RANKL remains constant during the process of tooth replacement.¹⁶

Since IL-23 and IL-17 stimulate the production of RANKL and this molecule participates in bone remodeling and the dental eruption process, the objective of this study was to initially evaluate the levels of IL-23 in the saliva of children in the mixed dentition phase and to determine if there is variation when molar class I or II is present.

MATERIAL AND METHODS

A cross-sectional study was carried out in the Pediatric Dentistry Clinic of the University of Guadalajara. All the parents or guardians of the children seen at the Pediatric Dentistry Clinic were

invited to participate. The objective of the study and the procedure for obtaining the sample was explained to the parents or guardians. All parents or guardians who agreed to have the children participate in the study were given written informed consent following the Helsinki 2013 treaty.

Children with an age range of five to eight years with early mixed dentition, erupted lower and upper first molars were included in the study. The type of occlusion was evaluated according to Angle's classification² and they were divided into two groups: class I molar and class II molar. Patients with caries, dental trauma, periodontal disease, amelogenesis or dentinogenesis imperfecta, systemic diseases, presence of syndromes, oral habits or having received orthopedic or orthodontic treatment, or having taken anti-inflammatory drugs were not included.

Saliva collection

The patient was asked to salivate into a sterile 100 mL container for approximately 1 to 2 minutes. Then 20 μ L of phosphate buffered saline (PBS) with protease inhibitor (Complete, Roche Diagnostic GmbH) was added. The tubes were then vortexed for 5 seconds. They were centrifuged at 12,000 rpm for 15 minutes at 4 °C. 1mL of saliva supernatant was collected in 1.5 mL microtubes and stored at -80 °C until ELISA for IL-23.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

100 μ L of saliva was added in triplicate to the wells of 96-well plates of the IL-23R DuoSet[®] ELISA Kit (R&D Systems Minneapolis MN, USA) and the ELISA was performed according to the manufacturer's specifications. The optical density of each well was determined using the WHY101 microplate reader (Poweam Medical Systems Co., Nanjing, Jiangsu, China) set at 450 nm with wavelength correction at 540 nm. The IL-23 concentrations of each sample were calculated from the standard curve according to the assay kit and the concentrations were expressed as pg/mL.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with the SPSS v.25 program. The normality of the data was evaluated with the Shapiro-Wilk test due to the sample size since the data showed non-normal behavior, the Mann-Whitney U test was performed to identify differences

between IL-23 concentrations and the variables of age, weight, height, and BMI between molar class I and II. To evaluate differences between female and male sex, a χ^2 test was performed. Finally, correlations between IL-23 levels and the variables evaluated a Spearman correlation was performed. A $p \leq 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Sociodemographic data

Nineteen patients with class I molar and 10 patients with class II molar with early mixed dentition and age range 7 to 8 years were included. There was a tendency to be overweight in patients with class II molar dentition, however, none of the children had systemic diseases or diseases in the oral cavity (*Table 1*).

Levels of IL-23 in the saliva of children with mixed molar class I and II dentition

No significant difference was observed in the saliva IL-23 levels in the group with molar class I (59.76 ± 21.66) pg/mL and molar class II (51.03 ± 20.91) pg/mL (*Figure 1*). However, class I molar patients showed a tendency to have higher levels of IL-23 in saliva than class II molar patients.

Correlations

A Spearman correlation analysis was performed and no correlation of IL-23 with the variables of age, weight, height, and BMI was found. However, a significantly positive correlation was observed between age and weight, age and height, as well as between weight and height. On the other hand, we observed a significant negative correlation between height and BMI (*Table 2*).

DISCUSSION

During the mixed dental eruption phase, the type of occlusion that is established once the lower first molar contacts the upper first molar can be known. The stomatognathic system of class I individuals presents characteristics of balanced skeletal bases and its functions are performed normally. However, in class II and III molar individuals, there is a structural imbalance that predisposes some functions to be modified.¹⁷ In addition, a malnutrition relationship has been observed in subjects with malocclusions.¹⁸

On the other hand, it is known that when there are chewing movements a force is exerted that varies according to the type of occlusion and dental relationship.¹⁴ In this sense, an increase in the expression of RANKL has been observed in rats in teeth with occlusal trauma than without occlusal trauma¹⁵ although in permanent and deciduous teeth in children with mixed dentition no significant differences were observed between the two groups of teeth, which is why it is considered that RANKL remains constant during the process of tooth replacement.¹⁶

It is also known that the force exerted by dental occlusion is different from that exerted by orthodontic treatment, in this sense, IL-23 and IL-17 have been evaluated in the gingival crevicular fluid of patients with orthodontic treatment and an increase in these cytokines was observed 24 hours after the orthodontic force was applied, compared to baseline levels.¹⁹

It should be noted that IL-23 is a proinflammatory cytokine that participates in the activation and maturation of Th17 cells. This cytokine has been studied in different pathologies, mainly in those involving bone diseases such as periodontitis, rheumatoid arthritis, Sjogren's syndrome, among others.²⁰⁻²³ However, IL-23 has not been evaluated in physiological developmental processes, such as the dental eruption process.

Based on this study, it was decided to evaluate IL-23 in saliva, in the mixed dentition phase of children with molar class I or molar class II, because in the mixed dentition phase osteoclastogenesis and osteogenesis are active and these processes are mainly regulated by RANKL which is stimulated by IL-23 and its receptor (IL-23R).²⁴

So the results of this study showed similar concentrations of IL-23 between molar class I and II with a tendency to be elevated in molar class I patients. So far, the findings of this pilot study indicate that the molecular regulation of IL-23 at the systemic level, in this physiological process does not differ from the dental arrangement presented in each phase of tooth eruption. On the other hand, the biological saliva sample provides information only at a systemic level; however, the LCG could provide more information on this behavior at a localized and systemic level. Therefore, we considered further evaluation of IL-23 in liquid samples (LCG), since it is a biological sample that has been used for the evaluation of different cytokines such as IL-23, IL-17, TNF- α , IL-8, IL-6, IL-2, IL-4, IL-10, RANTES, IL-1, IL-5, RANKL among others. In addition, the evaluation of cytokines in LCG provides information on the area where the dental eruption process takes place. It is worth mentioning

that IL-23 has been evaluated in LCG of patients with periodontitis, diabetes mellitus, rheumatoid arthritis among other pathologies, as well as in testing dental materials such as implants²⁵⁻²⁹ however, this cytokine has not been evaluated during the physiological process of dental eruption. It is worth mentioning that it is considered to increase the sample size to obtain conclusive results of IL-23 in the mixed dentition process.

Regarding correlations, we expected to find some kind of correlation of IL-23 with class I and II molar groups. However, no correlation of any kind was observed, indicating that this behavior may be because no significant differences were observed between the two study groups. Again, we consider that we should first increase the sample size of the study in saliva samples and also perform the evaluation of IL-23 in the LCG and then analyze the correlations of this cytokine for molar class.

However, the study allowed us to observe positive correlations between age and weight, age and height, as well as weight and height, indicating that these variables increase in a directly proportional manner. Since it is indispensable to measure height, weight, and age mainly to obtain BMI, it was expected to obtain positive correlations between height and weight with BMI. However, a negative correlation was observed between height and BMI, which indicates that when one variable increases, the other decreases. It is possible that the lack of positive correlations with BMI is due to the overweight tendency observed mainly in the group of children with molar class II. It is interesting to study whether the normal weight, overweight, or obesity of the children influences dental malocclusion.

We also intend to evaluate the concentrations of IL-23, IL-17, and RANKL in the deciduous, early mixed, late mixed, and permanent dentition. In this way, we will be able to know how these molecules fluctuate during the whole process of dental eruption.

CONCLUSION

A trend of elevated IL-23 levels was observed in patients with class I molar teeth with no significant difference. So far, this pilot study indicates that the molecular regulation of IL-23 in this physiological process does not differ from the dental disposition presented in each phase of tooth eruption.

REFERENCIAS/REFERENCES

1. Wise GE, Frazier-Bowers S, D'Souza RN. Cellular, molecular, and genetic determinants of tooth eruption. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002; 13 (4): 323-334.

2. Angle E. Classification of the malocclusion. *Dental Cosmos.* 1899; 41 (3): 248-264.
3. Amarasekara DS, Yun H, Kim S, Lee N, Kim H, Rho J. Regulation of osteoclast differentiation by cytokine networks. *Immune Netw.* 2018; 18 (1): e8.
4. Franchi A, Taverna C, Simoni A, Pepi M, Mannelli G, Fasolati M et al. RANK and RANK ligand expression in parotid gland carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2018; 26 (7): 478-482.
5. Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol.* 2007; 19 (6): 652-657.
6. Harokopakis-Hajishengallis E. Physiologic root resorption in primary teeth: molecular and histological events. *J Oral Sci.* 2007; 49 (1): 1-12.
7. Cordeiro MMR, Santos BZ, Reyes-Carmona JF, Figueiredo CP. Primary teeth show less protecting factors against root resorption. *Int J Paediatr Dent.* 2011; 21 (5): 361-368.
8. 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 (11): 1123-1132.
9. Abdi K, Singh NJ, Spooner E, Kessler BM, Radaev S, Lantz L et al. Free IL-12p40 monomer is a polyfunctional adaptor for generating novel IL-12-like heterodimers extracellularly. *J Immunol.* 2014; 192 (12): 6028-6036.
10. McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM, Laurence A, Joyce-Shaikh B, Blumenschein WM et al. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells *in vivo*. *Nat Immunol.* 2009; 10 (3): 314-324.
11. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science.* 1993; 260 (5107): 547-549.
12. Ghoreschi K, Laurence A, Yang X-P, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE et al. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature.* 2010; 467 (7318): 967-971.
13. Romagnani S. Human Th17 cells. *Arthritis Res Ther.* 2008; 10 (2): 206.
14. Yoon H-R, Choi Y-J, Kim K-H, Chung C. Comparisons of occlusal force according to occlusal relationship, skeletal pattern, age and gender in Koreans. *Korean J Orthod.* 2010; 40 (5): 304-313.
15. Yoshinaga Y, Ukai T, Abe Y, Hara Y. Expression of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand relates to inflammatory bone resorption, with or without occlusal trauma, in rats. *J Periodontal Res.* 2007; 42 (5): 402-409.
16. Vizcaino-Martínez LM, Guerrero VC. Niveles de RANKL solubles en el líquido crevicular gingival de dientes anteroinferiores y primeros molares inferiores de niños con dentición mixta temprana. *Impacto Odontológico.* 2018; 6 (3): 17-21.
17. Talley MM, Katagiri KM, Pérez THE. Casuística de maloclusiones clase I, clase II y clase III según Angle en el Departamento de Ortodoncia de la UNAM. *Rev Odont Mex.* 2007; 11 (4): 175-180.
18. Kikutani T, Yoshida M, Enoki H, Yamashita Y, Akifusa S, Shimazaki Y et al. Relationship between nutrition status and dental occlusion in community-dwelling frail elderly people. *Geriatr Gerontol Int.* 2013; 13 (1): 50-54.
19. Allgayer S, Macedo de Menezes L, Batista EL Jr. Interleukin 17 (IL-17) and interleukin 23 (IL-23) levels are modulated by compressive orthodontic forces in humans. *J World Fed Orthod.* 2019; 8 (4): 148-152.
20. Sadeghi R, Sattari M, Dehghan F, Akbari S. Interleukin-17 and interleukin-23 levels in gingival crevicular fluid of patients

- with chronic and aggressive periodontitis. *Cent Eur J Immunol*. 2018; 43 (1): 76-80.
21. Liukkonen J, Gürsoy UK, Pussinen PJ, Suominen AL, Konoen E. Salivary concentrations of interleukin (IL)-1beta, IL-17A, and IL-23 vary in relation to periodontal status. *J Periodontol*. 2016; 87 (12): 1484-1491.
 22. Przepiera-Bedzak H, Fischer K, Brzosko M. Serum IL-6 and IL-23 levels and their correlation with angiogenic cytokines and disease activity in ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, and SAPHO syndrome. *Mediators Inflamm*. 2015; 2015: 785705.
 23. Deveci H, Turk AC, Ozmen ZC, Deveci K. Serum interleukin-23/17 levels in ankylosing spondylitis patients treated with nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a prospective cohort study. *J Interferon Cytokine Res*. 2019; 39 (9): 572-576.
 24. Fukushima H, Kajiya H, Takada K, Okamoto F, Okabe K. Expression and role of RANKL in periodontal ligament cells during physiological root-resorption in human deciduous teeth. *Eur J Oral Sci*. 2003; 111 (4): 346-52.
 25. Szeremeske MT, De Freitas FN, Figueiredo LC, Pereira da Silva HD, Godoy RF, Mendes DP. Cytokine profiles of healthy and diseased sites in individuals with periodontitis. *Arch Oral Biol*. 2020; 120: 104957.
 26. Javed F, Al-Askar M, Al-Hezaimi K. Cytokine profile in the gingival crevicular fluid of periodontitis patients with and without type 2 diabetes: a literature review. *J Periodontol*. 2012; 83 (2): 156-161.
 27. Arvikar SL, Hasturk H, Strle K, Stephens D, Bolster MB, Collier DS et al. Periodontal inflammation and distinct inflammatory profiles in saliva and gingival crevicular fluid (GCF) compared with serum and joints in rheumatoid arthritis patients. *J Periodontol*. 2021; 92(10): 1379-1391.
 28. Hu Z, Wu D, Zhao Y, Chen S, Li Y. Inflammatory cytokine profiles in the crevicular fluid around clinically healthy dental implants compared to the healthy contralateral side during the early stages of implant function. *Arch Oral Biol*. 2019; 108: 104509.
 29. Kapoor P, Kharbanda OP, Monga N, Miglani R, Kapila S. Effect of orthodontic forces on cytokine and receptor levels in gingival crevicular fluid: a systematic review. *Prog Orthod*. 2014; 15 (1): 65.

Correspondencia / Correspondence:

Ruth Rodríguez Montaña

E-mail: ruth_rodriguez21@outlook.com