

Analysis Effects Of Caffeine On Improvement Osteoclastogenesis And Orihodontic Tooth Movement

Herniyati*, Leliana Sandra Devi*, Happy Harmono**

*Bagian Ortodonsi, ** Bagian Biomedik Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Jember Jember- Indonesia

Correspondence: +081358681200; e-mail : herny_is@yahoo.com

Address : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember - Jl. Kalimantan 37, Jember-
68121, Jawa Timur- Indonesia

Abstract

Objective: To analyze the effects of caffeine on improvement osteoclastogenesis and orthodontic tooth movement. **Material and methods:** The research method was experimental laboratories, 16 rats were divided into 2 groups. Group C: the rats were applied with Orthodontic Mechanical Force (OMF) and 2 ml of distilled water, group T: OMF and caffeine of 1,37mg/100g BW in 2 ml of distilled water. OMF was conducted by applying ligature wires in diameter of 0.20 mm on the molar-1 (M-1) of right maxilla and both incisivus of maxilla. Subsequently, the M-1 of right maxilla was moved to mesial using Tension Gauge to generate power of 10g/cm² with Ni-Ti orthodontic closed coil spring. Histological examination was conducted to calculate the number of osteoclasts. Increased tooth movement in the rats was measured by measuring from the tip of the distal of M-2 to the end of M-1 mesial of right maxilla lessened by mesiodistal width of right upper M-1 and M-2 using digital caliper. **Results:** the administration of caffeine steeping proved to effectively increased the number of osteoclast in both compression area and tension area more than those which were not administered with caffeine ($p < 0.05$). The number of osteoclast in compression area more than the tension area ($p < 0.05$). The administration of caffeine improved the movement of M1 of right maxilla compared to those not administered with caffeine ($p < 0.05$). **Conclusion:** the administration of caffeine increased osteoclastogenesis and improved the movement of the teeth, therefore it may be an alternative to accelerate orthodontic treatment

Key words : OMF, Osteoclastogenesis, Caffeine, Osteoclast

Pendahuluan

Perawatan ortodonti bertujuan untuk merapikan letak susunan gigi ke dalam lengkung geligi yang benar, mendapatkan efisiensi fungsi kunyah, keserasian muka, kesehatan mulut, estetik dentofasial serta stabilitas kedudukan gigi membutuhkan waktu 2-3 tahun¹. Hal ini membuat pemeliharaan kebersihan mulut lebih sulit dan memakan waktu. Ketidakbersihan gigi dan mulut akan menyebabkan keadaan gigi dan mulut penderita lebih rentan terhadap penyakit periodontal dan karies².

Keberhasilan perawatan ortodonti dipengaruhi oleh sejumlah faktor, termasuk kesehatan periodontal, kebersihan mulut, dan kekuatan ortodonti³. Pergerakan gigi yang disebabkan oleh aplikasi gaya ortodonti ditandai dengan perubahan perbaikan dalam jaringan gigi dan periodontal⁴. Dua proses yang saling terkait yang terlibat dalam pergerakan gigi ortodonti adalah (1) defleksi pada tulang alveolar dan (2) perbaikan dari jaringan periodontal, termasuk pulpa gigi, ligamen periodontal, tulang alveolar, dan gingiva. Gaya yang diterapkan menyebabkan kompresi tulang alveolar dan ligamen periodontal di satu sisi, sementara di sisi berlawanan PDL meregang⁵.

Pada daerah terkompresi atau tertekan, gaya mekanis akan merangsang osteoklas untuk melakukan resorpsi tulang alveolar. Setelah proses resorpsi selesai maka osteoklas akan mengalami apoptosis sehingga proses resorpsi berhenti. Di lain pihak, pada daerah tarikan atau teregang, osteoblas teraktivasi untuk melakukan aktivitas pembentukan tulang baru (aposisi). Jika GMO memadai maka proses resorpsi dan aposisi tulang alveolar ini dalam keadaan seimbang⁶.

Osteoklas adalah sel yang mendegradasi tulang⁷. Osteoklas aktif dipenuhi oleh mitokondria di dalam sitoplasma untuk menyediakan energi yang diperlukan dalam penyerapan tulang. Osteoklas merusak matrik tulang dengan cepat, melekat pada permukaan tulang, memisahkan sel dengan matrik, sehingga dapat menurunkan pH dari 7 menjadi 4. Keasaman ini akan melarutkan mineral dan mengeluarkan protease untuk merusak matrik, setelah osteoklas selesai menyerap tulang akan membelah menjadi sel mononuklear⁸. Diferensiasi osteoklas diatur oleh dua sitokin penting yaitu *Macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) dan RANKL. M-CSF adalah faktor penting yang bertanggung jawab atas kelangsungan hidup dan proliferasi sel prekursor osteoklas. Hal ini juga menyebabkan ekspresi RANK dalam sel prekursor osteoklas untuk membangkitkan respon efisien terhadap jalur sinyal RANKL-RANK^{7,9}.

RANKL adalah anggota dari keluarga TNF ligand membran terkait, diekspresikan oleh sel mesenchymal dari sel keturunan osteoblas dan sel T yang aktif (RANKL yang larut) dalam keadaan inflamasi skeletal¹⁰. Ekspresi RANKL dirangsang dalam sel-sel osteoblas oleh banyak faktor yang merangsang dan mengatur pembentukan dan aktifitas osteoklas¹¹. RANKL memiliki peran penting dalam osteoklastogenesis ketika berikatan

dengan reseptor RANK dalam sel keturunan osteoklas, merangsang mereka untuk menanggapi fenotip osteoklas melalui interaksi dengan beberapa hormon dan sitokin¹². RANKL telah dikaitkan dengan fibroblas, osteoblas, dan osteosit pada ligamen periodontal selama pergerakan gigi ortodonti¹³. *In vitro*, sel ligamen periodontal yang terkena kekuatan tekan mengekspresikan RANKL¹⁴. Nishijima *et al.* menunjukkan peningkatan konsentrasi RANKL dalam cairan sulkus gingiva selama pergerakan gigi ortodonti, dan sel pada ligamen periodontal manusia yang terkena kekuatan tekan, secara tergantung waktu dan besar kekuatan¹⁵. Selain itu, telah menunjukkan bahwa transfer gen RANKL lokal untuk jaringan periodontal mempercepat pergerakan gigi ortodonti¹⁴ dan diekspresikan di awal pada daerah tekanan pada gigi yang digerakkan secara orhodonti¹⁶.

Pengembangan metode baru untuk mempercepat pergerakan gigi ortodonti (OTM) telah dicari oleh dokter sebagai cara untuk mempersingkat waktu pengobatan, mengurangi efek samping seperti sakit, ketidaknyamanan, karies gigi, dan penyakit periodontal, dan meminimalkan kerusakan iatrogenik seperti resorpsi akar dan perkembangan selanjutnya dari gigi nonvital. Berbagai upaya telah dilakukan untuk mempercepat pergerakan gigi ortodonti yaitu dengan obat-obatan, metode bedah dan metode-metode rangsangan fisik dan mekanik. Sampai sekarang belum ada obat yang aman dapat mempercepat pergerakan gigi ortodonti¹⁷.

Kafein (1,3,7-*methylxanthine*), anggota keluarga *methylxanthine*, merupakan zat psikoaktif yang paling umum dikonsumsi dengan kehadirannya dalam kopi, teh, dan minuman berkarbonasi seperti cola¹⁸. Hasil penelitian pada tikus yang diberikan gaya mekanis ortodonti menunjukkan bahwa pemberian kafein dosis rendah, 2,5 mg/100 g BB meningkatkan jumlah osteoklas dan resorpsi tulang pada sisi tekanan pada hari ke 14¹⁹.

Tujuan penelitian adalah untuk menganalisis efek kafein terhadap peningkatan osteoklastogenesis dan pergerakan gigi ortodonti, dengan menggunakan dosis kafein setara dengan yang terkandung dalam satu cangkir kopi robusta.

Bahan Dan Metode

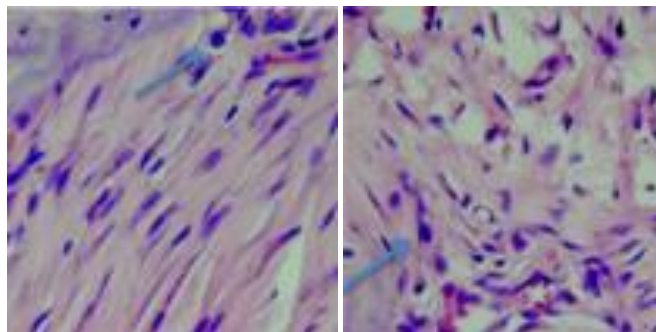
Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratories. 16 ekor tikus (*Sprague Dawley*) jantan usia 3-4 bulan berat badan 250-300 gram dan dinyatakan sehat. Tikus dipilih yang memiliki susunan gigi lengkap, kondisi rongga mulut

dan jaringan periodontal. Tikus dibagi secara random ke dalam 2 kelompok: kelompok kontrol (K): tikus diberikan gaya mekanis ortodonti (GMO) dan 2ml aquades dan kelompok perlakuan (P): diberikan GMO dan kafein sebesar 1,37mg/100 g BB (setara dengan yang terkandung dalam 1 cangkir kopi orang dewasa) yang dilarutkan dalam 2ml aquades. GMO pada tikus dilakukan dengan cara tikus di anestesi menggunakan ketamin, Pada gigi molar-1 (M-1) rahang atas (RA) kanan dan pada kedua gigi insivus RA diberi kawat ligatur dengan diameter 0,20 mm. Kemudian M-1 RA kanan digerakkan ke mesial menggunakan *Tension Gauge* untuk menghasilkan kekuatan 10 g/cm² dengan *Nickel Titanium Orthodontic closed coil spring* panjang 6 mm²⁰. Pengamatan dilakukan dengan cara tikus dikorbankan pada hari ke 15 dan diambil kedua gigi M1-1 dan M-2 RA kanan beserta jaringan periodontalnya. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan histologi untuk menghitung jumlah osteoklas. Peningkatan pergerakan gigi pada tikus diukur dengan cara mengukur dari ujung distal M-2 ke ujung mesial M-1 kanan RA dikurangi lebar mesiodistal M-1 dan M-2 kanan atas menggunakan kaliper digital

Hasil

Hasil Penghitungan Jumlah Osteoklas

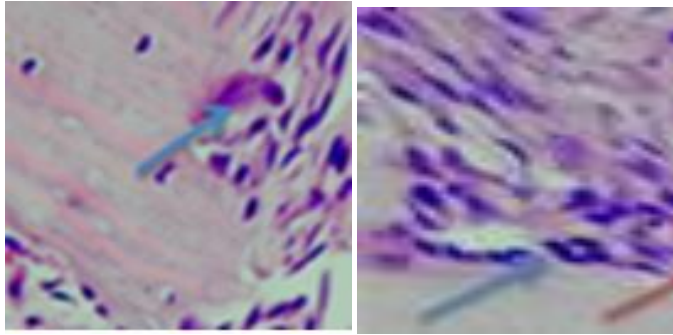
Gambar histologi osteoklas pada daerah tekanan dan daerah tarikan pada kelompok K dan kelompok P dapat dilihat pada Gambar 1 dan Gambar 2.



Kelompok kontrol

Kelompok Perlakuan

Gambar 1. Osteoklas pada Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan daerah tekanan tulang alveolar tikus. Osteoklas ditandai dengan tanda panah warna biru (Pengecatan HE, pembesaran 400x).



Kelompok kontrol

Kelompok Perlakuan

Gambar 2. Osteoklas pada Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan daerah tarikan tulang alveolar tikus. Osteoklas ditandai dengan tanda panah warna biru (Pengecatan HE, pembesaran 400x).

Data rerata dan simpang baku jumlah osteoklas serta hasil uji beda antara daerah tekanan dengan daerah tarikan dan antar kelompok penelitian ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Rerata dan Simpang Baku Jumlah Osteoklas dan Hasil Uji Beda Jumlah Osteoklas Antar Kelompok Penelitian dan Antara Daerah Tekanan Dengan Daerah Tarikan

Kelompok	N	Osteoklas (Rerata ± Simpang baku)		P
		Daerah Tekanan	Daerah Tarikan	
Kontrol (K)	8	3,00 ± 1,20	3,38 ± 0,92	0,442**
Perlakuan (P)	8	11,75 ± 1,67	4,88 ± 1,36	0,000**
P		0,000*	0,021*	

Keterangan :
 * berdasarkan *t-test*
 ** berdasarkan *paired t-test*

Tabel 1 menggambarkan deskripsi data dalam bentuk rerata dan simpang baku jumlah osteoklas pada daerah tekanan dan tarikan. Jumlah osteoklas pada daerah tekanan pada kelompok K dan kelompok P berturut-turut adalah 3,00 ± 1,20 dan 11,75 ± 1,67, sedangkan pada daerah tarikan berturut-turut adalah 3,38 ± 0,92 dan 4,88 ± 1,36.

Pengujian berdasarkan berdasarkan *paired t-test* menunjukkan bahwa jumlah osteoklas pada kelompok K pada daerah tarikan lebih besar daripada daerah tekanan tetapi tidak signifikan ($p > 0,05$), sedangkan berdasarkan *paired t-test* pada kelompok P jumlah osteoklas pada daerah tekanan lebih besar secara signifikan daripada daerah tarikan ($p < 0,05$). Hasil uji beda dengan berdasarkan *t-test* jumlah osteoklas antar kelompok penelitian pada daerah tekanan dan daerah tarikan menunjukkan terdapat perbedaan yang

bermakna ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian kafein meningkatkan jumlah osteoklas pada daerah tekanan dan daerah tarikan dibandingkan yang tidak diberikan kafein. Kafein meningkatkan jumlah osteoklas pada daerah tekanan lebih banyak daripada daerah tarikan

Hasil Pengukuran Peningkatan Pergerakan M1 RA

Hasil pengukuran peningkatan pergerakan M1 RA diperoleh dengan melakukan pengukuran pada gigi menggunakan kaliper digital pada semua kelompok penelitian. Peningkatan pergerakan gigi pada tikus diukur dengan cara mengukur dari ujung distal M-2 ke ujung mesial M-1 kanan RA dikurangi lebar mesiodistal M-1 dan M-2 kanan atas dapat dilihat pada Gambar 3. Data rerata dan simpang baku pergerakan gigi M1 RA ditunjukkan pada Tabel 2.



Gambar 3. Pengukuran peningkatan pergerakan M1 RA dengan kaliper digital.

Tabel 2. Rerata dan Simpang Baku Peningkatan Pergerakan M1 RA (mm), Serta Hasil Uji Beda Antar Kelompok Penelitian.

Kelompok	N	Pergerakan Gigi (mm) (Mean \pm SD)
Kontrol	8	0,62 \pm 0,10
Perlakuan	8	0,85 \pm 0,11
P		0,000*
Keterangan :		* berdasarkan <i>t test</i>

Tabel 2 menggambarkan hasil pengukuran peningkatan pergerakan M1 RA pada kelompok K dan kelompok P. Jumlah peningkatan pergerakan M1 RA berturut-turut adalah 0,62 \pm 0,10 mm dan 0,85 \pm 0,11 mm.

Pengujian peningkatan pergerakan M1 RA berdasarkan *t-test* antar kelompok penelitian menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian kafein meningkatkan pergerakan M1 RA dibandingkan dengan yang tidak diberikan kafein.

Pembahasan

Ketika gaya mekanis ortodonti (GMO) diaplikasikan, perubahan yang terjadi pada tulang diterima oleh mekanoreseptor yang dimainkan oleh peran osteosit. Hal ini akan merangsang proliferasi dan diferensiasi osteoklas. Diferensiasi osteoklas diatur oleh dua sitokin penting yaitu *Macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) dan RANKL. M-CSF adalah faktor penting yang bertanggung jawab atas kelangsungan hidup dan proliferasi sel prekursor osteoklas. Hal ini juga menyebabkan ekspresi RANK dalam sel prekursor osteoklas untuk membangkitkan respon efisien terhadap jalur sinyal RANKL-RANK. Pengikatan RANKL dengan reseptor RANK mengakibatkan perekrutan *tumor necrosis factor* (TNF), *receptor-associated factor 6* (TRAF6), yang terlibat dalam aktivasi jalur sinyal seperti NF-Kb, *c-jun kinase N-terminal* (JNK), p38, dan jalur *extracellular signal-regulated kinase* (ERK). Selain itu, RANKL mengaktifkan berbagai faktor transkripsi seperti NF-Kb, *microphthalmia transcription factor* (MITF), *c-Fos*, dan *nuclear factor-activated T cells c1* (NFATc1), yang bertanggung jawab untuk diferensiasi osteoklas⁷.

Osteoklas merupakan sel berinti yang dibentuk melalui fusi prekursor mononuklear dari garis keturunan hematopoetik. Diferensiasi osteoklas awalnya tergantung pada sinyal melalui *c-fms*, reseptor untuk *makrofag Colony stimulating factor* (M-CSF), di sel prekursor mononuklear, yang mengatur ekspresi RANK²¹. RANKL, diekspresikan dalam osteoblas dan sel stroma dalam menanggapi PTH dan stimulasi oleh dihidroksi aktif vitamin D3 (1,25 Vit D3)²². Sinyal melalui RANK dan *c-fms* di prekursor mononuklear adalah pendorong utama dari pembentukan osteoklas. Bersama dengan stimulasi oleh *immunoreceptor tyrosin-based activation motif* (ITAM) yang mengandung protein adaptor *DNA-activating protein of 12 kDa* (DAP12) dan *Fc epsilon receptor 1 gamma chain* (FcR γ), ini menyebabkan aktivasi faktor transkripsi *nuclear factor kB* (NF-kB), *aktivator protein 1* (AP-1) dan *nuclear factor of activated T-cell cytoplasmic 1* (NFATc1). Ini pada gilirannya mengatur ekspresi gen osteoklas penting,

seperti *transmembrane protein-specific dendritic cells* (DC-STAMP), *tartrate-resistant acid phosphatase* (TRAcP), cathepsin K, *matrix metalloproteinase 9* (MMP 9) dan $\beta 3$ integrin, yang memungkinkan diferensiasi dan fusi prekursor dan fungsi osteoklas multinuklear yang dihasilkan²³.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian kafein meningkatkan jumlah osteoklas pada daerah tekanan maupun daerah tarikan dibandingkan dengan yang tidak diberikan kafein, dan pada daerah tekanan lebih banyak daripada daerah tarikan. Hal ini disebabkan karena kafein mengikat reseptor adenosin, dan memodulasi beberapa reseptor lain termasuk reseptor glukokortikoid, insulin, estrogen, androgen, vitamin D, cannabinoid, glutamat, dan reseptor adrenergik, yang semuanya diekspresikan pada osteoblas atau sel osteoprogenitor dan memiliki fungsi penting selama diferensiasi osteoblas²⁴. Selanjutnya reseptor Vitamin D akan mempromosikan transkripsi RANKL dan membatasi produksi OPG²⁵. Menurut Leibbrandt dan Penninger RANKL diekspresikan dalam osteoblas dan sel stroma dalam merespon PTH dan stimulasi oleh dihidroksi aktif vitamin D3 (1,25 Vit D3)²². RANKL yang merupakan regulator pada remodeling tulang selama proses pergerakan gigi²⁶, selanjutnya akan berikatan dengan RANK pada prekursor osteoklas, yang memicu diferensiasi dan proliferasi osteoklas sehingga osteoklas menjadi aktif. Hasil penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa kafein meningkatkan osteoklastogenesis melalui peningkatan RANKL²⁷.

Osteoklas aktif akan mengakibatkan peningkatan resorpsi tulang^{28,9}. Resorpsi tulang selanjutnya akan menyebabkan pergerakan gigi ortodonti, yang kemudian diikuti oleh remodeling tulang alveolar dan ligamen periodontal⁴. Hasil penelitian terdahulu menunjukkan bahwa pada ligamen periodontal normal tikus tidak terdapat prekursor osteoklas mononuklear. Osteoklas aktif yang terdapat pada ligamen periodontal disebabkan karena tekanan alat ortodonti. Prekursor mononuklear dalam sumsum tulang berdiferensiasi menjadi prekursor osteoklas mononuklear, kemudian bermigrasi ke ligamen periodontal di daerah tekanan di mana mereka berdiferensiasi menjadi osteoklas multinuklear yang aktif. Osteoklas multinuklear kemudian melakukan resorpsi tulang²⁹.

Peningkatan osteoklastogenesis pada daerah tekanan ligamen periodontal ini yang mengakibatkan terjadinya peningkatan pergerakan gigi. Hal ini terbukti dengan hasil penelitian

ini yang menunjukkan bahwa pada kelompok yang diberikan kafein, peningkatan pergerakan MI RA kanan lebih besar dibandingkan dengan kelompok yang tidak diberikan kafein.

Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah bahwa pemberian kafein meningkatkan osteoklastogenesis dan pergerakan gigi ortodonti, sehingga dapat dijadikan alternatif untuk mempercepat *perawatan ortodonti*.

Ucapan Terimakasih

Para penulis mengucapkan terimakasih pada pengelola laboratorium biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember atas pelayanan yang diberikan pada proses pemberian perlakuan pada hewan coba dan laboratorium biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dalam proses histologi untuk memeriksa dan menghitung jumlah osteoklas.

Pustaka

1. Profitt WR, Field HW, Safer DM. *Contemporary Orthodontics*, 4th Ed, Toronto, CV Mosby Co, 2007: 331-341.
2. Jianru Yi, Zhang L, Yan B, Yang L, Li Y, and Zhao Z. Drinking coffee may help accelerate orthodontic tooth movement, Department of Dental Implants, State Key Laboratory of Oral Diseases, West China Stomatology Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan, China, 2012. Vol. 3(2):72-75.
3. Cardaropoli D, Gaveglio L. The influence of orthodontic movement on periodontal tissues level. *Seminars in Orthodontics*, 2007. Vol.13(4): 234–245.
4. Krishnan V, Davidovitch Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 2006. Vol. 129(4): 469–e1.
5. Dolce C, Scott Malone J, Wheeler TT. Current concepts in the biology of orthodontic tooth movement. *Seminars in Orthodontics*, 2002. Vol. 8(1): 6–12.
6. Nimeri G, Kau CH, Aboe-kheir NS, and Corona R. Acceleration of tooth movement during orthodontic treatment – a frontier in Orthodontic. *Progress in Orthodontic*, 2013: 14-42
7. Kim JH and Kim N. Regulation of NFATc1 in Osteoclast Differentiation, *J Bone Metab*, 2014, Vol.21(4): 233-241.
8. Roodman GD. Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr Rev*, 1996. Vol.14(4): 308-332.

9. Yamaguchi M. RANK/ RANKL/OPG During Orthodontic Tooth Movement. *Orthod Craniofac Res* , 2009. Vol.12: 113-119.
10. Teitelbaum SL, Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *Am J Pathol*, 2007. Vol.170(2): 427–35.
11. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med*, 2006. Vol. 12(1): 17–25.
12. Tsurukai T, Udagawa N, Matsuzaki K, Takahashi N, Suda T. Roles of macrophage-colony stimulating factor and osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *J Bone Miner Metab*, 2000. Vol. 18(4):177–84.
13. Ogasawara T, Yoshimine Y, Kiyoshima T, Kobayashi I, Matsuo K, Akamine A, *et al.*. In situ expression of RANKL, RANK, osteoprotegerin and cytokines in osteoclasts of rat periodontal tissue. *J Periodontal Res*, 2004. Vol. 39(1): 42–9.
14. Kanzaki H, Chiba M, Takahashi I, Haruyama N, Nishimura M, Mitani H. Local OPG gene transfer to periodontal tissue inhibits orthodontic tooth movement. *J Dent Res*, 2004. Vol.83(12): 920–5.
15. Nishijima Y, Yamaguchi M, Kojima T, Aihara N, Nakajima R, Kasai K. Levels of RANKL and OPG in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement and effect of compression force on releases from periodontal ligament cells in vitro. *Orthod Craniofac Res.*, 2006. Vol. 9(2): 63–70.
16. Brooks PJ, Nilforoushan D, Manolson MF, Simmons CA, Gong SG. Molecular markers of early orthodontic tooth movement. *The Angle orthodontist.*, 2009. Vol.79(6): 1108–3.
17. Shenava S, Nayak KUS., Bhaskar V, Nayak A. Accelerated Orthodontics-A Review. *International Journal of Scientific Study* , 2014. Vol.1(5): 35-39.
18. Sukendro S. Keajaiban Dalam Secangkir Kopi. Yogyakarta: Penerbit Media Pressindo. 2013:17.
19. Peng S, and Chun HY. Effect of caffeine on alveolar bone remodeling during orthodontic tooth movement in rats. *Journal of Tongji University (Medical Science)* 2011:03.
20. Sella R.C, de Mendonça MR, Osmar AC OA, Li AT. Histomorphologic Evaluation of Periodontal Compression and Tension sides During Orthodontic Tooth Movement in Rats, *J Orthod*, 2012. Vol.17(3): 108-17.
21. Crockett, JC., Mellis, DJ., Scott DI. and Helfrich MH. New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: focus on the RANK/RANKL axis. *Osteoporos. Int.* 2011. Vol. 1: 1-20.
22. Leibbrandt, A. and Penninger JM. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008. Vol. 1143: 123-150.
23. Humphrey MB, Lanier LL, and Nakamura MC. Role of ITAM-containing adapter proteins and their receptors in the immune system and bone. *Immunol. Rev.* 2005. 208: 50-65.
24. Reis AS, Riberio LGR, Ocarino NM, Goes ALM, and Serakides R. Osteogenic potential of osteoblasts from neonatal rats born to mothers treated with caffeine throughout pregnancy. *BMD Musculoskeletal Disorder.* 2015; Vol.16: 10.

25. Purroy J and Spurr NK. Molecular genetics of calcium sensing in bone cells, *Hum. Mol. Genet.* 2002. Vol. 11, no. 20, pp 2377-2384.
26. Oshiro T, Shiotani A, Shibasaki YT. Osteoclast Induction in Periodontal Tissue During Experimental Movement of Incisors in Osteoprotegerin Deficient Mice, *The Anatomist*, 2002. 266; pp 218-255.
27. [Jianru Y](#), [Boxi Y](#), [Meile L](#), [Yu W](#), [Wei Z](#), [Yu L](#), and [Zhihe Z](#). Caffeine may enhance orthodontic tooth movement through increasing osteoclastogenesis induced by periodontal ligament cells under compression. *Archives of Oral Biology*, 2016. 64; pp 51-60.
28. Meikle CM. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. *European Journal of Orthodontics*, 2006.28; pp 221-40.
29. Xie R, Jagtman AMK, and Maltha JC. Osteoclast differentiation during experimentally tooth movement by Short-term applications: An immunohistochemical study in rats, *Acta Odontologica Scandinavica*, 2008. 66; pp: 314-320