

LAPORAN PENELITIAN

Pengaruh Kafein Terhadap Ekspresi RANKL dan Jumlah Osteoklas Pada Pergerakan Gigi Ortodonti

(The effect of Caffeine in RANKL Expression and the Number of Osteoclast in Orthodontic Tooth Movement)

Herniyati

Bagian Ortodonsia , Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

ABSTRACT

Background: Orthodontic tooth movement depends on bone remodeling involving osteoclasts and osteoblasts. RANKL has an important role in osteoclastogenesis and increased during orthodontic tooth movement. Caffeine contained in coffee, tea, and carbonated drinks can increase osteoclastogenesis. **Purpose:** To analyze the effect of caffeine on the expression of RANKL and the number of osteoclasts in orthodontic tooth movement. **Materials and Methods:** The experimental laboratories research used 16 rats were divided into 2 groups: the control group (K): rats given orthodontic mechanical force (OMF) and the treatment group (P): rats given OMF and caffeine at 1,37mg / 100 g twice a day. OMF was conducted by ligature wires were applied on permanent maxillary right first molar and both permanent maxillary incisivus. Subsequently, the permanent maxillary right first molar moved to mesial with Ni-Ti orthodontic closed coil spring. Observations were made by histological examination to calculate the number of osteoclasts and immunohistochemical examination to determine the expression of RANKL. **Result:** the administration of caffeine increased the number of osteoclast in both compression and tension areas ($p < 0.05$). The number of osteoclast in compression area larger than those which in tension area ($p < 0.05$), The administration of caffeine improved the expression of RANKL in both compression and tension areas ($p < 0.05$). The expression of RANKL in compression area larger than those which in tension area ($p < 0.05$), **Conclusion:** The administration of caffeine increased the expression of RANKL and osteoclast numbers on orthodontic tooth movement, therefore it may be an alternative to accelerate orthodontic treatment.

Keywords: RANKL, osteoklastogenesis, orthodontic tooth movement, caffeine

Correspondence: Herniyati, Department of Orthodontist, Faculty of Dentistry, Jember University, Kalimantan 37, Jember, Phone 0331-333536, Email: herniyati@unej.co.id

ABSTRAK

Latar belakang: Pergerakan gigi ortodonti tergantung pada remodeling tulang yang melibatkan osteoklas dan osteoblas. RANKL memiliki peran penting pada osteoklastogenesis dan meningkat selama pergerakan gigi ortodonti. Kafein yang terkandung dalam minuman kopi teh, dan minuman berkarbonasi dapat meningkatkan osteoklastogenesis. **Tujuan:** untuk menganalisis efek pemberian kafein terhadap ekspresi RANKL dan jumlah osteoklas pada pergerakan gigi ortodonti. **Bahan dan Metode:** Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratoris, 16 tikus wistar dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu kelompok K: tikus diberikan gaya mekanis ortodonti (GMO) dan kelompok P: tikus diberikan GMO dan kafein sebesar 1,37mg / 100g BB dua kali sehari pagi dan sore. GMO pada tikus dilakukan dengan cara 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 dengan Niti closed coil spring. Pengamatan dilakukan pada hari ke 15 dengan pemeriksaan histologi untuk menghitung jumlah osteoklas dan pemeriksaan imunohistokimia untuk menentukan ekspresi RANKL. **Hasil:** Pemberian kafein meningkatkan jumlah osteoklas pada daerah tekanan dan daerah tarikan ($p < 0,05$). Jumlah osteoklas pada daerah tekanan lebih besar daripada daerah tarikan ($p < 0,05$). Pemberian kafein meningkatkan ekspresi RANKL pada daerah tekanan dan daerah tarikan ($p < 0,05$). Ekspresi RANKL pada daerah tekanan lebih besar daripada daerah tarikan ($p < 0,05$). **Simpulan:** Pemberian kafein meningkatkan ekspresi RANKL dan jumlah osteoklas pada pergerakan gigi ortodonti, sehingga dapat menjadi alternatif mempercepat perawatan ortodonti.

Kata kunci: RANKL, Osteoclastogenesis, Pergerakan gigi ortodonti, kafein.

Korespondensi: Herniyati, Bagian Ortodonsia, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember, Kalimantan 37, Jember, Telepon 0331-333536, Email: herniyati@unej.co.id

PENDAHULUAN

Pergerakan gigi karena kekuatan ortodonti tergantung pada remodeling ligamen periodontal dan tulang alveolar. Gerakan ortodonti merupakan proses berkelanjutan dan seimbang yang ditandai dengan resorpsi tulang pada daerah tekanan dan deposisi tulang pada daerah tarikan. Kekuatan ortodonti akan mengubah aliran darah dan lingkungan elektrokimia lokal pada ruang periodontal. Perubahan mendadak ini menyebabkan remodeling jaringan yang menggambarkan reaksi biokimia dan seluler yang terjadi pada bagian yang mengalami mineralisasi (tulang alveolar) dan yang tidak mengalami mineralisasi (periodonsium) jaringan parodontal. Beberapa biomarker

mewakili aktivitas ini, yaitu, proses inflamasi, resorpsi dan pembentukan tulang, perubahan ligamen periodontal, pembuluh darah dan respon saraf.¹

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 gaya mekanis ortodonti memadai maka proses resorpsi dan aposisi tulang alveolar ini dalam keadaan seimbang.²

Osteoklas adalah sel yang mendegradasi tulang.³ 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.^{3,4}

RANKL adalah anggota dari keluarga TNF yang diekspresikan oleh sel mesenchymal dari sel keturunan osteoblas dan sel T yang aktif (RANKL yang larut) dalam keadaan inflamasi skeletal.⁵ Ekspresi RANKL dirangsang dalam sel-sel osteoblas oleh banyak faktor yang merangsang dan mengatur pembentukan dan aktifitas osteoklas.⁶ Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi protein RANKL meningkat pada sel ligamen periodontal manusia di daerah tekanan tergantung dari besarnya kekuatan (RANKL meningkat pada sisi tekanan dengan kekuatan 7oz). Temuan ini juga dilaporkan sebelumnya pada sel ligamen periodontal manusia in vitro⁷ dan pada sel ligamen periodontal manusia in vivo,⁸ serta pada sel yang tertekan dalam cairan sulkus manusia,⁹ sehingga temuan ini mendukung peran RANKL dalam osteoklastogenesis yang dimediasi oleh sel PDL yang menerima kekuatan tekan.

Perawatan ortodonti membutuhkan waktu yang relatif lama. Pengembangan metode baru untuk mempercepat pergerakan gigi ortodonti telah dilakukan antara lain dengan obat-obatan, namun sekarang belum ada obat yang aman dapat mempercepat pergerakan gigi ortodonti.¹⁰

Kafein (*1,3,7-methylxanthine*), anggota keluarga *methylxanthine*, merupakan zat psikoaktif yang paling umum dikonsumsi dengan kehadirannya dalam kopi, teh, dan minuman berkarbonasi seperti cola.¹¹ 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 14.¹²

Tujuan penelitian adalah untuk menganalisis efek kafein terhadap ekspresi RANKL dan jumlah osteoklas pada 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 baik. 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) dilarutkan dalam 2ml aquades diberikan dua kali sehari, pagi dan sore. 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/cm^2 dengan *Nickel Titanium Orthodontic closed coil spring* panjang 6 mm¹³. Pengamatan dilakukan dengan cara tikus dikorbkan 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 dan pemeriksaan iminohistokimia untuk menentukan ekspresi RANKL. Data dianalisis dengan menggunakan *Student't-test*, *paired t-test*, dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Pemasangan *closed coil spring* pada tikus ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Pemasangan *closed coil spring* pada tikus

HASIL

Hasil Penghitungan ekspresi RANKL

Hasil penelitian efek kafein pada ekspresi RANKL ditunjukkan pada Tabel 1. Gambar histologi hasil pemeriksaan iminohistokimia ekspresi RANKL pada sel osteoblas pada daerah tekanan dan tarikan ditunjukkan pada Gambar 2.

Tabel 1. Rerata \pm Simpang baku ekspresi RANKL dan hasil uji beda antar kelompok penelitian pada daerah tekanan dan daerah tarikan

Kelompok	n	RANKL (Rerata \pm Simpang baku)		p
		Daerah Tekanan	Daerah Tarikan	
Kontrol (K)	8	$3,88 \pm 0,83$	$2,88 \pm 0,84$	0,007*
Perlakuan (P)	8	$11,75 \pm 1,17$	$3,13 \pm 0,54$	0,000*
p		0,000*	0,559**	

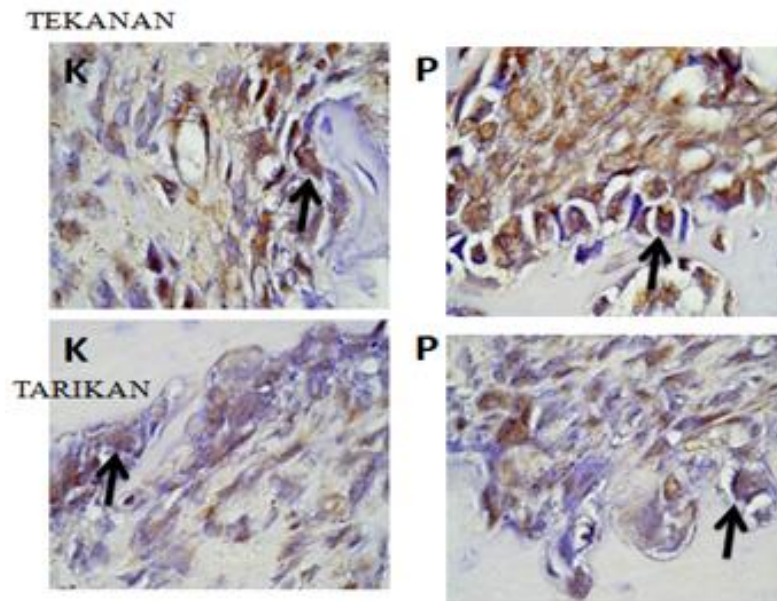
* $p < 0,05$ = signifikan

** $p > 0,05$ = tidak signifikan

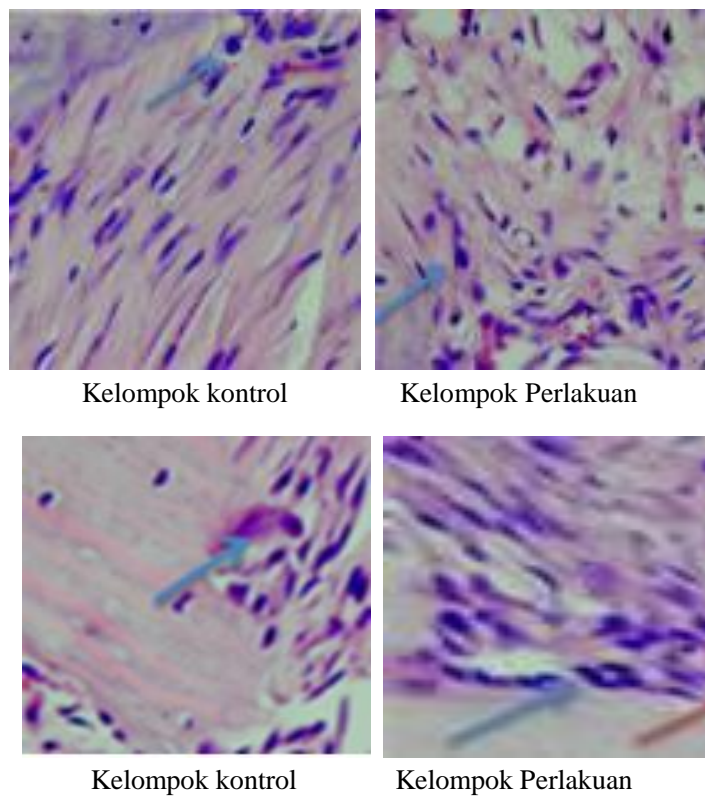
Tabel 1 menunjukkan rerata dan simpang baku ekspresi RANKL pada daerah tekanan dan tarikan. Jumlah ekspresi RANKL pada daerah tekanan pada kelompok K dan kelompok P berturut-turut adalah $3,88 \pm 0,83$ dan $11,75 \pm 0,17$, sedangkan pada daerah tarikan berturut-turut adalah $2,88 \pm 0,84$ dan $3,13 \pm 0,54$.

Pengujian berdasarkan *t-test* pada daerah tekanan menunjukkan

ekspresi RANKL pada kelompok P lebih besar daripada kelompok kontrol ($p < 0,05$), sedangkan pada daerah tarikan pada kelompok P lebih besar daripada kelompok kontrol namun tidak signifikan ($p > 0,05$). Ekspresi RANKL pada kelompok K dan kelompok P menunjukkan pada daerah tekanan lebih besar secara signifikan daripada daerah tarikan ($p < 0,05$).



Gambar 2. Ekspresi RANKL pada osteoblas daerah tekanan dan tarikan kelompok Kontrol (K) dan Perlakuan (P) (Imunohistokimia, pembesaran 400x).



Gambar 3. Osteoklas pada Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan daerah tarikan tulang alveolar tikus. Osteoklas ditandai dengan tanda panah warna biru (Pengecatan HE, pembesaran 400x).

Tabel 2. 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*	

* p < 0,05 = signifikan

** p > 0,05 = tidak signifikan

Tabel 2 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 *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 pada kelompok P jumlah osteoklas pada daerah tekanan lebih besar secara signifikan daripada daerah tarikan ($p < 0,05$). Hasil uji beda 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

PEMBAHASAN

Pergerakan gigi yang disebabkan oleh aplikasi gaya ortodonti ditandai

dengan perubahan perbaikan dalam jaringan gigi dan periodontal.¹⁴ Aplikasi kekuatan ortodonti menghasilkan daerah tekanan dan daerah tarikan pada ligamen periodontal yang mengakibatkan remodeling ligamen, tulang alveolar dan gingiva.⁹ Kekuatan ortodonti menghasilkan respon seluler dan molekuler mengakibatkan pergerakan gigi. Perbedaan pola ekspresi penanda pemodelan tulang dan perubahan histologis terjadi pada daerah tekanan dan daerah tarikan ligamen periodontal yang tergantung pada besar dan durasi kekuatan ortodonti. Respon biologis dalam PDL dan tulang merupakan proses peradangan aseptik yang dimediasi oleh prostaglandin dan cytokines.¹⁵

Kafein meningkatkan ekspresi RANKL pada daerah tekanan maupun daerah tarikan lebih besar dibandingkan dengan yang tidak diberikan kafein. 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 osteoblas.¹⁶ Menurut Lacey reseptor vitamin D merangsang ekspresi RANKL pada sel seperti

osteoblas dan sel stroma sumsum tulang, sedangkan Leibbrandt dan Penninger, 2008¹⁸ menyatakan bahwa RANKL diekspresikan dalam osteoblas dan sel stroma dalam merespon PTH dan stimulasi oleh dihidroksi aktif vitamin D3 (1,25 Vit D3).^{17,18} RANKL selanjutnya akan berikatan dengan RANK pada prekursor osteoklas, yang memicu diferensiasi dan proliferasi osteoklas sehingga osteoklas menjadi aktif. Osteoklas yang aktif akan mengakibatkan resorpsi tulang.¹⁹ Hasil penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa kafein meningkatkan osteoklastogenesis melalui peningkatan RANKL.²⁰ Selanjutnya studi *in vivo* pada hewan juga menunjukkan bahwa kafein mampu mengurangi *bone mineral density* (BMD) pada tikus dengan peningkatan osteoklastogenesis.¹⁸

Peningkatan jumlah osteoklas juga terbukti pada penelitian ini dan peningkatan jumlah osteoklas terjadi pada daerah tekanan maupun daerah tarikan, dan pada daerah tekanan lebih banyak daripada daerah tarikan sebagaimana jumlah ekspresi RANKL pada daerah tekanan yang juga lebih besar dibandingkan daerah tarikan. Studi *in vivo* telah menunjukkan adanya RANKL dan RANK pada jaringan periodontal selama pergerakan gigi molar tikus, dan bahwa sel-sel PDL bawah stres mekanik dapat menginduksi osteoklastogenesis melalui peningkatan regulasi ekspresi RANKL selama pergerakan gigi ortodonti.⁴ Disamping itu Hasil penelitian terdahulu juga menunjukkan bahwa aplikasi kekuatan ortodonti pada daerah tekanan menyebabkan osteoblas meningkatkan ekspresi RANKL yang selanjutnya

meningkatkan osteoklastogenesis, sehingga resorpsi tulang juga meningkat.²¹

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 *makrofas Colony stimulating factor* (M-CSF), di sel prekursor mononuklear, yang mengatur ekspresi RANK.²² RANKL adalah pengatur pembentukan dan aktivasi osteoklas, di mana banyak hormon dan sitokin menghasilkan efek RANKL diekspresikan pada sel osteoblas dan yang mengikat reseptor RANK pada sel osteoklas. Ikatan ini menyebabkan differensiasi yang cepat dari prekursor osteoklas menjadi osteoklas dewasa osteoresorptive.²³ Pembentukan dan aktivasi osteoklas melibatkan peran faktor transkripsi NFATC1. NFATC1 merupakan regulator utama RANKL yang menginduksi diferensiasi osteoklas dan memainkan peran penting dalam fusi dan aktivasi osteoklas melalui peningkatan regulasi berbagai gen yang bertanggung jawab untuk perlekatan osteoklas, migrasi, pengasaman, degradasi anorganik dan organik matriks tulang.²⁴

Osteoklas aktif akan mengakibatkan peningkatan resorpsi tulang.^{19,4} Resorpsi tulang selanjutnya akan menyebabkan pergerakan gigi ortodonti, yang kemudian diikuti oleh remodeling tulang alveolar dan ligamen periodontal.¹⁴ 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 tulang.²⁵

SIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah bahwa pemberian kafein meningkatkan ekspresi RANKL dan jumlah osteoklas pada pergerakan gigi ortodonti, sehingga dapat dijadikan alternatif untuk mempercepat perawatan ortodonti.

DAFTAR PUSTAKA

- Brooks PJ, Nilforoushan D, Manolson MF, Simmons CA, and Gong SG. 2009. Molecular markers of early orthodontic tooth movement. *Angle Orthodontist*, 79(6): 1113–1108.
- Nimeri G, Kau CH, Aboe-kheir NS, and Corona R. 2013. Acceleration of tooth movement during orthodontic treatment – a frontier in Orthodontic. *Progress in Orthodontic*, 42-14.
- Kim JH and Kim N. 2014. Regulation of NFATc1 in Osteoclast Differentiation. *J Bone Metab*, 21(4): 241-233.
- Yamaguchi M. 2009. RANK/RANKL/OPG During Orthodontic Tooth Movement. *Orthod Craniofac Res*, 12: 119-113.
- Teitelbaum SL. 2007. Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *Am J Patho*, 170(2): 427–35.
- Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. 2006. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med*, 12(1) 17–25.
- Zhang F, Wang CL, Koyama Y, Mitsui N, Shionome C, Sanuki R, Suzuki N, Mayahara K, Shimizu N, Maeno M. 2010. Compressive force stimulates the gene expression of IL-17s and their receptors in MC3T3-E1 cells. *Connect Tissue Res*, 51(5): 359–69.
- Garlet TP, Coelho U, Silva JS, Garlet GP. 2007. Cytokine expression pattern in compression and tension sides of the periodontal ligament during orthodontic tooth movement in humans. *Eur J Oral Sci*, 115(5): 355–62.
- Grant M, Wilson J, Rock P, Chapple I. 2013. Induction of cytokines, MMP9, TIMPs, RANKL and OPG during orthodontic tooth movement. *Eur J Orthod*, 35(5): 644–51.
- Shenava S, Nayak KUS., Bhaskar V, Nayak A. 2014. Accelerated Orthodontics-A Review. *International Journal of Scientific Study*, 1(5): 39-35.
- Sukendro S. 2013. Keajaiban Dalam Secangkir Kopi. Yogyakarta: Penerbit Media Pressindo. H. 17.
- Peng S, and Chun HY. 2011. Effect of caffeine on alveolar bone remodeling during orthodontic tooth movement in rats. *Journal of Tongji University (Medical Science)*. 03.
- Sella R.C, de Mendonça MR, Osmar AC OA, Li AT. 2012. Histomorphoc Evaulation of Periodontal Compression and Tensien sides During Orthodontic Tooth Movement in Rats. *J Orthod*, 17(3): 108-17.
- Krishnan V, Davidovitch Z. 2006. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 129(4): 469–e1.
- Tzannetou S, Efstratiadis S, Nicolay O, Gribic J, Lamster I. 2008. Comparison of levels of inflammatory mediators IL-1beta and betaG in gingival crevicular fluid from molars, premolars, and incisors during rapid palatal expansion. *Am J Orthod Dentofac Orthoped*, 133(5): 707-699.
- Reis AS, Riberio LGR, Ocarino NM, Goes ALM, and Serakides R. 2015. Osteogenic potential of osteoblasts from neonatal rats born to mothers treated with caffeine throughout pregnancy. *BMD Musculoskeletal Disorder*, 16: 10.
- Hennemann S, Hoff JWVD, and Maltha JC. 2008. Microbiology of Tooth Movement. *Eur J Orthod*, 30: 306-299.
- Leibbrandt, A. and Penninger JM. 2008. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, 1143: 150-123.
- Meikle CM. 2006. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. *European Journal of Orthodontics*, 28: 221-40.

20. Jianru Yi, Zhang L, Yan B, Yang L, Li Y, and Zhao Z. 2012. 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, 3(2): 75-72.
21. Jianru Y, Boxi Y, Meile L, Yu W, Wei Z, Yu L, and Zhihe Z. 2016. Caffeine may enhance orthodontic tooth movement through increasing osteoclastogenesis induced by periodontal ligament cells under compression. *Archives of Oral Biology*, 64: 60-51.
22. Crockett, JC., Mellis, DJ., Scott DI. and Helfrich MH. 2011. New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: focus on the RANK/RANKL axis. *Osteoporos. In.*, 1: 20-1.
23. Nakano Y, Yamaguchi M, Fujita S, Asano M, Saito K, and Kasai K. 2011. Expressions of RANKL/RANK and M-CSF/c-fms in root resorption lacunae in rat molar by heavy orthodontic force. *Eur J Orthod*, 33(4): 335-43.
24. Zhao Q, Wang Xi, Liu Y, He Aimin, Jia Ruokun. 2010. NFATc1: Functions in osteoclasts, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(5) 579-576.
25. Xie R, Jagtman AMK, and Maltha JC. 2008. Osteoclast differentiation during experimentally tooth movement by Short-term applications: An immunohistochemical study in rats. *Acta Odontologica Scandinavica*, 66: 320-314.